



УДК 541.64:547.82

## Новый тип сорбционной монолитной фазы на основе N-алкилированного 4-винилпиридина для капиллярной электрохроматографии

Павлова Л.Д., Маерле К.В., Ильин М.М., Даванков В.А.

*Институт элементорганических соединений им. А.Н.Несмеянова, Москва*

### Аннотация

Исследован процесс получения монолитных фаз путем взаимодействия 4-винилпиридина с пара-ксилилен-дигалоидными производными. Обсуждаются факторы, влияющие на скорость реакции, а также определяющие пористую структуру монолита. Показана возможность использования новой монолитной фазы в капиллярной электрохроматографии (КЭХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

**Ключевые слова:** монолиты; 4-винилпиридин; капиллярная электрохроматография; высокоэффективная жидкостная хроматография

The process of forming monolithic phases by the interaction of 4-vinylpyridine with *p*-xylilene-dihalide has been investigated. Factors that have an influence on the reaction rate and define the porous structure of monolith are considered. Application of the new monolithic stationary phase for CEC and HPLC has been shown

### Введение

Все более широкое применение монолитных сорбционных фаз, получаемых полимеризацией мономеров непосредственно в хроматографической колонке, доказало перспективность использования этих относительно новых сорбционных материалов в самых разнообразных аналитических и препаративных процессах [1]. В частности, в капиллярных колонках монолиты не только успешно конкурируют, но даже вытесняют сферические сорбенты [2].

Основные преимущества использования монолитов заключаются в том, что отпадают трудоемкие процедуры получения монодисперсных микросферических сорбентов, набивки колонки и изготовления фритт. Методика получения монолитов в капиллярах проста, реактивы относительно недороги. Заполненные монолитами капилляры могут быть любой требуемой длины, причем при нарезке легко удаляются дефекты фазы, имеющиеся, как правило, на торцах монолитов [3].

Немалый интерес в последнее время привлекает к себе капиллярная электрохроматография с применением монолитов, как эффективный метод анализа, в том числе, экспресс анализа [4, 5].

## Теоретическая часть

Капиллярная электрохроматография – метод анализа, основанный на сочетании принципов высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза. Поток подвижной фазы создается электрическим напряжением, а разделение веществ происходит как за счет взаимодействия со стационарной фазой, так и за счет различия в их электрофоретической подвижности. Преимущество нового метода перед микро-ВЭЖХ заключается в плоском профиле потока подвижной фазы, создаваемого напряжением, а не давлением, и, как следствие, меньшем размытии хроматографических зон.

Несмотря на множество работ, посвященных монолитам в КЭХ, неисследованными остаются монолиты с высокой плотностью заряда. В процессах синтеза монолитов мономеры, несущие ионогенные группы, как правило, сильно разбавляются нейтральными мономерами [6].

Целью настоящей работы является изучение свойств и возможностей применения в КЭХ новой гидрофильной монолитной фазы с исключительно высокой плотностью положительного заряда (четвертичные аммонийные группы в каждом мономерном звене полимерной цепи).

В работе [7] описана спонтанная полимеризация 4-винилпиридина (4-ВП) в процессе его алкилирования моногалоидалкилами. Использование бифункциональных алкилирующих агентов в реакции с 4-ВП открывает широкие возможности для получения полимерных сеток, одновременно являющихся высокоосновными анионообменниками. Осуществляя реакцию 4-ВП с бис-галоидалкилами в условиях, отвечающих главным принципам синтеза сверхсшитых сетчатых полимеров [8] (формирование жесткой сетки в присутствии сольватирующего растворителя), удалось получить уникальный гидрофильный сверхсшитый материал. Он одинаково хорошо набухает как в полярных, так и неполярных средах [9]. Эта особенность дает существенные преимущества при практическом использовании такого монолита в колонке или капилляре, позволяя переходить при необходимости от водных сред к органическим и наоборот, с сохранением высокой проницаемости полимерной фазы. Кроме того, описываемый тип полимера с четвертичными пиридиниевыми группами позволяет нивелировать такой наиболее часто упоминающийся недостаток силикагельных монолитов, как нестабильность в сильноокислых или щелочных средах.

Схематически структуру полимера можно представить следующим образом (рис. 1):

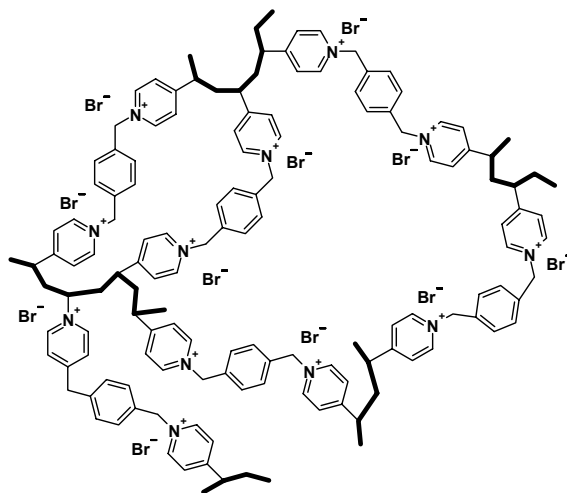


Рис. 1. Структура полимерной сетки

Упрощенная схема реакции синтеза представлена на рис. 2:

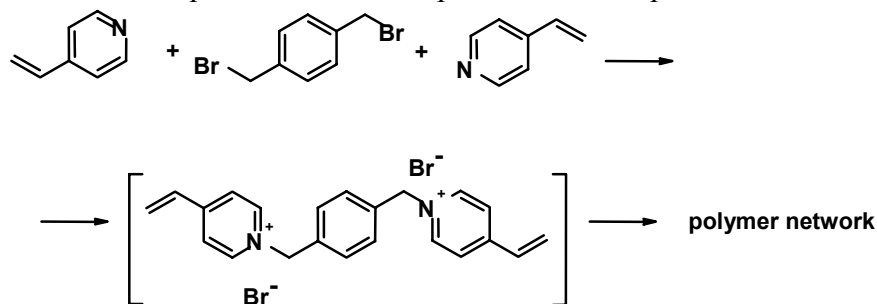


Рис. 2. Формирование полимера при взаимодействии пара-ксилилендигбромида с двукратным количеством винил пиридина

4-Винилпиридин - самый реакционноспособный представитель винилпиридинов - легко вступает в реакцию с галоидалкилами. Атом азота вследствие алкилирования превращается в четвертичное аммонийное основание и приобретает положительный заряд, который, перераспределяясь в системе сопряженных двойных связей, приводит к поляризации винильной группы, вызывая спонтанную ионную полимеризацию, в которой участвует только N-алкилированный 4-ВП. Ионная полимеризация не только не требует инициирования, но и не ингибируется стабилизаторами, содержащимися в техническом 4-ВП для подавления радикальной полимеризации. Немаловажно, что реагенты - 4-ВП и пара-ксилилендигалоид - являются доступными коммерческими продуктами.

Скорость формирования полимерной сетки легко регулируется. Ее можно увеличивать, вводя избыточное количество 4-ВП или используя более полярные растворители, или замедлять, повышая долю инертного разбавителя в системе. Возможность ускорения или замедления процесса особенно важна при работе с капиллярами. Капилляр легко заполняется раствором - гомогенной подвижной реакционной смесью, которая вскоре теряет текучесть, превращаясь в гель, что облегчает дальнейшие манипуляции с капилляром.

Скорость реакции N-алкилирования возрастает пропорционально концентрации 4-ВП и вследствие этого большее число заряженных пиридиновых «звеньев» в единицу времени вовлекаются в ионную полимеризацию. Это четко прослеживается по сокращению времени гелеобразования в зависимости от избытка 4-ВП при его смешении с раствором 1 моля п-ксилилендихлорида в ГМФА (фактор разбавления 5) при температуре 50 °С в присутствии каталитических количеств NaI (рис. 3). При проведении синтеза исключительно в среде 4-ВП реакция протекает слишком быстро с выделением синерезисной жидкой фазы (избыточный 4-ВП), а монолит получается в виде слабо связанных между собой агрегированных частиц.

Структура сорбентов, как известно, должна содержать как крупные транспортные поры, так и мелкие, ответственные за удерживание анализируемых веществ. Создание оптимальной бимодальной пористости монолитной матрицы - одна из основных задач, решаемых на стадии синтеза за счет использования инертных разбавителей. Транспортные поры в сетке образуются при микрофазовом распаде системы, содержащей плохой (с термодинамической точки зрения) по отношению к полимеру растворитель. Для получения микропор требуется наличие хорошего растворителя. Общий объем пор определяется степенью разбавления реагентов порогенами.

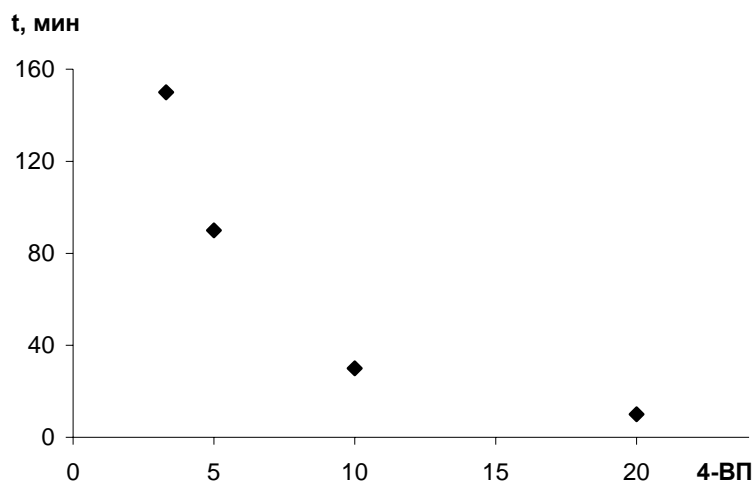


Рис. 3. Зависимость времени гелеобразования (мин) от мольного избытка 4-ВП

Так как в полимерные цепи включается только алкилированный 4-ВП, то избыток 4-ВП выше эквимольного является таким (термодинамически хорошим) разбавителем, изменяющим морфологию сетки. По мере увеличения избытка 4-ВП степень набухания образующихся полимеров слегка падала практически во всех растворителях. Это косвенно свидетельствует о повышении плотности сшивки.

Еще один фактор, позволяющий варьировать размер пор монолитов, – температурный режим полимеризации. Реакция достаточно полно протекает за 6-8 часов при 60-80 °С или в течение суток при умеренных (комнатных) температурах, а также в крио-варианте (-8-18 °С). Криоструктурирование с учетом его закономерностей [10] дает возможность получения высокопроницаемых монолитных матриц. Монолиты одного и того же состава, полученные в разных условиях, существенно отличаются по своим физико-химическим свойствам.

### Обсуждение результатов

Для изучения физико-химических свойств сверхсшитых полимеров с N-алкилпиридиниевыми группами и выбора пригодных для КЭХ монолитов был осуществлен синтез модельных полимеров.

Оказалось, что монолиты (99, 100, 101, 143), полученные исключительно в полярных растворителях - диметилсульфоксиде (ДМСО), диметилформамиде (ДМФА), гексаметилтриамиде фосфорной кислоты (ГМФА) и N-метил-2-пирролидоне при комнатной температуре или при 70-80 °С, несмотря на высокое разбавление реакционной смеси, не проницаемы для жидкости без приложения давления. По своей структуре сетки близки к гелевым, хотя и непрозрачны.

Структура монолитов, полученных в капиллярах, не является точной копией макрообразцов, вероятно, из-за особенностей ионной полимеризации на поверхности кварца. Так, монолит, синтезированный в капилляре с использованием ДМСО в качестве растворителя, удалось промыть органическим растворителем, хотя и под давлением в 40 атм.

Для получения высокопористых (проницаемых) монолитов использовалась смесь хорошего и, как минимум, 50% плохого растворителей. Так, при добавлении к

ДМСО или ДМФА толуола или бензола были получены монолиты (104-106, 110), содержащие транспортные поры, с хорошими физико-механическими свойствами (прочность, упругость, адгезия к стеклу). В то же время эти монолиты содержали и мелкие поры, о чем свидетельствует появление внутренней удельной поверхности (табл. 1). Относительно низкие значения удельной поверхности предположительно объясняются тем, что при высушивании образцов определенная доля микро пор (возможно весьма значительная) теряется из-за «схлопывания». Возможно, жесткость поливинилпиридиниевых сверхсшитых сеток ниже жесткости аналогичных сверхсшитых полистиролов. Во всяком случае, объемная усадка монолита при высушивании от растворителя достаточно велика. О необратимом уплотнении свидетельствует и существенное падение величин набухания сухих образцов во всех испытанных растворителях по сравнению с монолитами, не подвергавшимися высушиванию. Даже, если сушка производилась в самых мягких условиях, как, например, лиофильная.

Таблица 1. Условия синтеза и удельная поверхность термомонолитов

№	110	118	121	122	119	113	111	120	99
S, м <sup>2</sup> /г	21	21	20	15	7,5	9	7	5	2
Алкилирующий агент	КДБ *		КДХ **		КДБ				
избыток 4-ВП	1,7	4	4	4	4	4,7	4,7	4	8,5
разбавление	9,6	7,4	7,4	7,4	7,4	9,6	9,6	7,4	10
хороший:плохой растворитель	ДМФА: толуол 1:1	ДМСО: бензол 1:1,8	ДМСО: бензол 1:1,3	ДМСО: бензол 1:1,3	ДМФА: СНCl <sub>3</sub> 1:1	ДМФА: ацетон 1:1	ДМСО: бензол 1:1	ДМСО	ДМСО

\* КДБ – пара-ксилилен-дибромид

\*\* КДХ – пара-ксилилен-дихлорид

Таблица 2. Условия синтеза и удельная поверхность криомонолитов

№	124	126	125
S, м <sup>2</sup> /г	24	10	6
алкилирующий агент	КДБ *		
избыток 4-ВП	3,5	2	4
разбавление	15	14	15
растворитель	ДМСО		

Однако высокопроницаемые монолиты могут быть получены и в среде полярного растворителя, если реакцию осуществлять в крио-варианте, например, используя легко замерзающий ДМСО (образцы 124-126 и 142). Интересно, что и в этом случае монолиты (124-126) наряду с макропорами содержат микропоры (табл. 2), которые, вероятно, образуются на той стадии, когда после кристаллизации большей части ДМСО реакция протекает в жидкой фазе, включающей незамерзающие в данных условиях компоненты (некоторая часть растворителя и 4-ВП). Чем выше доля кристаллизующегося при охлаждении растворителя, тем большее количество крупных пор в монолите и тем быстрее протекает через него жидкость даже без приложения давления. Монолиты 124-127 отличаются малым сопротивлением потоку.

Испытания новой монолитной фазы - крио-монолита 142 в условиях классической ВЭЖХ показали, что взаимодействия неорганических ионов с

высокоемкой анионообменной матрицей слишком сильны, что приводит к слишком большим временам удерживания анионов и уширению их пиков. Чтобы ослабить электростатические взаимодействия и снизить время удерживания такого рода аналитов, пришлось использовать буфер высокой концентрации (вплоть до 0,5 М). Характеристики удерживания приведены в таблице 3.

Что касается органических кислот, аминокислот и нейтральных органических соединений, то, несмотря на приемлемое время выхода соединений в водно-органических системах с высоким содержанием 0,25 М буфера, пики оставались широкими. Применение данного монолита для разделения смесей в опробованных условиях оказалось неэффективным. Однако на основании полученных результатов можно рекомендовать использование такого рода анионообменных монолитов для очистки нейтральных веществ от примесей, имеющих кислотный характер.

Таблица 3. Время удерживания соединений на криомонолите 142 в условиях ВЭЖХ. Колонка: внут. диаметр 5 мм, высота 150 мм; V = 1,5 мл/мин, P = 51 бар

Соединение	Условия	Время удерживания, мин.
неорганические анионы		
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,5М КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	4,0
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		4,5
Br <sup>-</sup>		11,9
CNS <sup>-</sup>		51,0
органические кислоты		
α-бромизовалериановая кислота	0,2М КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> + 10 %v CH <sub>3</sub> CN	1,09
α-бромизомасляная		1,11
Бромуксусная		1,40
Бензойная		2,25
Итаконовая кислота		2,33
Аскорбиновая кислота		2,89
Лимонная кислота		7,28
Фталевая кислота		8,70
аминокислоты		
Arg	0,25 М NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 10 %v CH <sub>3</sub> CN	0,74
Phe		0,76
Tyr		0,92
Trp		1,02
DOPA		1,35
органические соединения		
Ацетон	0,25 М NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 10 %v CH <sub>3</sub> CN	0,73
Толуол		0,91
Фенол		1,24

Эффективность данной колонки для аминокислот и нейтральных органических соединений оказалась весьма низкой, число теоретических тарелок в расчете на один метр не превышало 220.

Было решено исследовать применимость монолитов данного типа в условиях капиллярной электрохроматографии.

Чтобы избежать экструдирования монолита из капилляра, его ковалентно пришивали к стенкам капилляра. Для этого капилляр был предварительно модифицирован (бромметил)-диметил-хлорсиланом, активная бромметильная

группировка которого участвует в реакции с 4-ВП по выше описанному механизму, и формирующийся монолит оказывается связан с внутренней поверхностью кварцевого капилляра С-N связью.

Схема реакции представлена на рис 4:

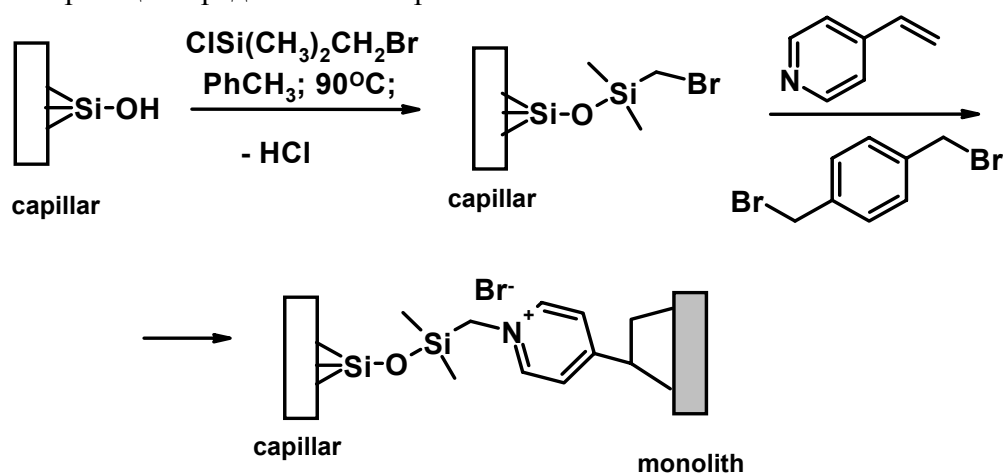


Рис. 4. Схема ковалентного закрепления монолита на поверхности кварца

Монолиты, полученные в капиллярах, в зависимости от типа растворителя и присутствия линейного поливинилпиридина в исходном мономере, отличались по морфологическим свойствам. Так, при использовании чистого 4-ВП и ДМСО в качестве растворителя формируется достаточно однородная структура по всей длине капилляра. В других растворителях, например, в ДМФА или его смеси с толуолом наблюдается явно гетерогенная макроструктура, состоящая из прозрачных и непрозрачных зон, четко различаемых под микроскопом. Однако, если брать технический 4-ВП, то в тех же условиях однородность структуры во всем объеме получаемого монолита заметно улучшается. Вероятно, за счет изначального присутствия полимерных цепей в исходной смеси изменяются условия микрофазового распада.

При работе с монолитом в условиях КЭХ в ацетатном буфере в качестве подвижной фазы наблюдалась линейная зависимость силы тока от концентрации электролита, что вполне закономерно (рис. 5).

Также фиксировали время выхода ацетона в зависимости от концентрации буфера. Монотонное возрастание этой функции, вероятно, объясняется тем, что с повышением ионной силы раствора уменьшается скорость электроосмотического потока; с другой стороны, может проявляться эффект высаливания ацетона, так что время удерживания его слегка возрастает.

Изучив поведение колонок в электрическом поле, мы перешли к делению модельной смеси из 5 компонентов. Первые опыты показали возможность эффективного разделения нейтральных органических соединений и слабых органических кислот в водных буферных растворах. Длина монолита в этих экспериментах составляла всего 7 см. На электрофореграмме разделяются пики ацетона, его гомолога – метилэтилкетона, нитробензола, фенола и гидрохинона (рис. 6). Гидрохинон удерживается значительно дольше других соединений, возможно, за счет частичного перехода в анионную форму.

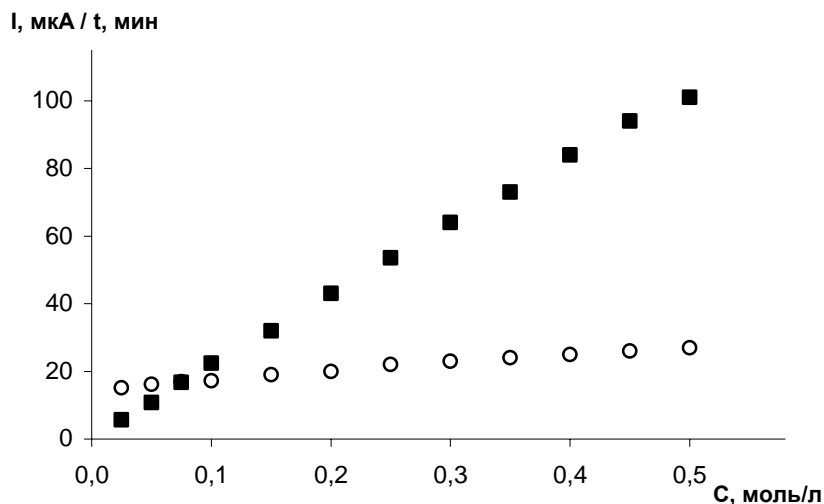


Рис. 5. Зависимость силы тока (■, I, мкА) и времени выхода ацетона (○, t, мин) от концентрации электролита в КЭХ.

Колонка: общая длина колонки - 36 см, длина монолитной фазы - 25 см, эффективная длина колонки - 27 см.  
 Электролит: смесь  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa} = 1:1$  (моль). Напряжение: -7 кВ.  
 Температура: 20°C

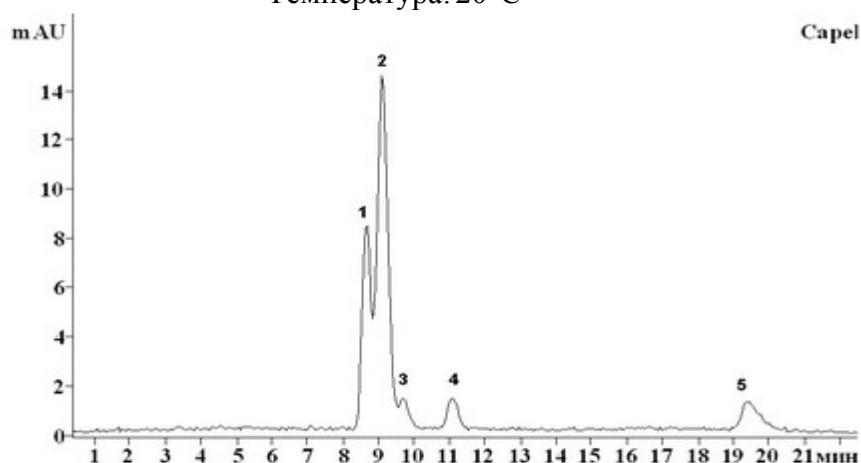


Рис. 6. Разделение стандартной смеси аналитов (1 – ацетон, 2 – нитробензол, 3 – метилэтилкетон, 4 – фенол, 5 – гидрохинон) методом КЭХ.

Колонка: общая длина колонки - 36 см, длина монолитной фазы - 7 см, эффективная длина колонки - 27 см. Электролит: 0,05М смесь  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa} = 1:1$  (моль). Напряжение: -5 кВ. Температура: 20°C.  
 Ввод пробы: 70 кВ·сек

## Экспериментальная часть

### Реагенты и используемые материалы.

Используемые растворители – ДМСО, ДМФА и толуол высушивались над молекулярными ситами марки 4 А, а в случае синтеза монолитов в капиллярах дополнительно подвергались вакуумной перегонке. 4-ВП очищался пропусканием через колонку с нейтральной окисью алюминия. Для очистки 4-ВП от высокомолекулярной примеси коммерческий продукт выливали в серный эфир и



после отделения осадка полимера эфир испаряли в вакууме. Пара-ксилилен-дибромид очищали перекристаллизацией из бензола.

Полый кварцевый капилляр в полиимидном покрытии, внутренний диаметр 75 мкм, внешний диаметр 375 мкм приобретен в Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

#### *Приборы.*

ВЭЖХ-анализы проводились на приборе «Agilent 1100». Эксперименты КЭХ проводились на системе для капиллярного электрофореза «Капель-105» (Россия), оснащенного УФ детектором и системой жидкостного охлаждения колонки. Промывка капиллярных колонок осуществлялась при помощи жидкостного насоса для ВЭЖХ с адаптером для подсоединения капилляра. Баллон с азотом использовали для сушки капилляров. Дегазацию всех растворов проводили в ультразвуковой бане.

Удельная площадь поверхности сухих образцов рассчитана по уравнению БЭТ из адсорбции/десорбции аргона.

#### *Синтезы*

Синтез модельных монолитов проводился в стеклянных трубках диаметром 0,5 см и высотой 10 см.

Монолиты 104, 105, 106: объемная доля растворителя 9-11, мольный избыток 4-ВП 5-кратный, ДМСО: толуол = 0.7:1 и 1:1.

Монолит 110: ДМФА:толуол 1:1.

Монолиты 124-127: объемная доля растворителя 14-15 на 1 вес. долю реагентов.

Крио-монолит 142, полученный замораживанием раствора мономера и сшивателя в ДМСО (фактор разбавления 8,5) при  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  за 35 часов в хроматографической колонке (параметры колонки: вн. диаметр 5мм, высота 150 мм), анализировался на жидкостном хроматографе марки «Agilent 1100» (скорость потока 1,5 мл/мин., давление 51 бар, UV-детектор).

Модификация внутренней поверхности капилляра проводилась по следующей методике: после последовательной промывки 1 М раствором гидроксида натрия и дистиллированной водой, высушенный капилляр обрабатывали 10 %-ным раствором (бромметил)-диметил-хлорсилана в толуоле при  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 6 часов. Постоянный ток реакционной смеси через капилляр осуществлялся за счет разницы в уровнях высот входного и выходного конца капилляра.

Для получения монолитов в капиллярах использовали 14-кратный избыток 4-ВП в среде ДМФА-толуол. В смесь, содержащую 1 объем толуола и 1 объем технического 4-ВП, добавляли раствор пара-ксилилен-дибромида в 1,5 объемах ДМФА. Выдерживали в ультразвуковой бане 10 секунд.

Заполнение капилляра реакционной смесью до определенного уровня проводили двумя способами. В первом случае на определенной высоте капилляра создавали локальную зону высокой температуры ( $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), в которой быстро образуется полимерная пробка. Второй способ заключался в визуальном контроле уровня заполнения с помощью микроскопа при подаче смеси в капилляр. После заполнения капилляр с обоих концов закрывали пробками и термостатировали 6 часов при  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  для полноты протекания реакции.

Сжиганием полиимидного покрытия, формировали окно детектирования. Перед проведением КЭХ колонку последовательно промывали ДМФА и электролитом.

## Заключение

Разработан метод получения новой монолитной фазы на основе N-алкилированного 4-ВП, ковалентно пришитой к стенкам капилляра.

Исследованы способы регулирования пористой структуры данного типа монолитов.

В условиях КЭХ продемонстрирована возможность использования буферов низкой концентрации без снижения эффективности колонки. Монолитная фаза эффективна даже при малой длине капилляра в опытах по разделению смесей нейтральных органических соединений и слабо диссоциирующих кислот, что свидетельствует о перспективности ее дальнейшего изучения.

## Список литературы

1. «Advances in monoliths» J. Chromatogr. A . 2006. V.1109. Iss. 1.
2. Gusev I., Huang X., Horváth C. Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography// J. Chromatogr. A. 1999. V.855. Iss.1. P.273-290
3. Хмельницкий И.К., Карцова Л.А. Капиллярная хроматография (обзор)// Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т.7. Вып.6.С.917-925.
4. Lämmerhofer M., Svec F., Fréchet J.M.J., Lindner W. Capillary electrochromatography in anion-exchange and normal-phase mode using monolithic stationary phases // J. Chromatogr. A 2001. V.925. Iss. 1-2. P.265-277.
5. Shediak R., Ngola S.M., Throckmorton D.J., Anex D.S., Shepodd T.J., Singh A.K. Reversed-phase electrochromatography of aminoacids and peptides using porous polymer monoliths// J. Chromatogr. A 2001. V.925. Iss. 1-2. P.251-263.
6. Bedair M., Rassi Z. El. Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases. Preparation of cationic stearyl-acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization// J. Chromatogr. A. 2003. V.1013. Iss.1-2. P.35-45.
7. Каргин В.А., Кабанов В.А., Алиев К.В., Е.Ф. Разводовский Специфическая полимеризация солей 4-винилпиридина// ДАН. 1965. Т.160. №3. С. 604-607.
8. Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Hypercrosslinked polymers: basic principle of preparing the new class of polymeric materials //React. Funct. Polym. 2002. V.53. P.193-203.
9. Павлова Л.А., Павлов М.В., Даванков В.А. Первые представители сверхсшитых гидрофильных сеток: алкилирование и полимеризация 4-винилпиридина в ионной жидкости// ДАН. 2006. Т.406. №2. С.200-202.
10. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения// Успехи химии.2002. т.71.(6).С.559-583.