



УДК 543.544.5.068.7

Синтез и хроматографические свойства монолитных колонок на основе сополимеров дивинилбензола и винилэтилбензола с гидроксиалкилметакрилатами

Смирнов К.Н., Дьячков И.А., Пирогов А.В., Шпигун О.А.

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

Поступила в редакцию 2.09.2011 г.

Аннотация

Термоиницируемой свободнорадикальной полимеризацией внутри стеклянных трубок размером 150×3 мм синтезированы монолитные неподвижные фазы на основе сополимеров дивинилбензола (ДВБ) и винилэтилбензола (ВЭБ) с различными гидроксиалкилметакрилатами. Установлено, что использование гидроксибутилметакрилата вместо гидроксиэтилметакрилата (ГЭМА) позволяет в 1,6 раза поднять проницаемость колонки при снижении эффективности на 5–10%. Изучено влияние температуры при разделении на хроматографические характеристики поли(ДВБ–ВЭБ–ГЭМА) монолита. Повышение температуры с 25°C до 80°C увеличивает эффективность колонки и максимальную скорость потока элюента, а также снижает влияние фактора удерживания сорбата на уширение хроматографических пиков. При 80°C на скоростях до 3,7 мм/с для алкилбензолов эффективность составляет 19000–20000 ТТ/м.

Ключевые слова: монолитная колонка, дивинилбензол, гидроксиалкилметакрилат, ВЭЖХ

Monolithic stationary phases based on copolymers of divinylbenzene (DVB) and ethylvinylbenzene (EVB) with various hydroxyalkyl methacrylates were synthesized via thermally initiated free-radical polymerization inside glass tubes with dimensions of 150×3 mm. The use of hydroxybutyl methacrylate instead of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) was found to increase the column permeability by a factor of 1,6 with 5–10% drop in efficiency. The effect of column temperature on separation using poly(DVB-co-EVB-co-HEMA) monolith was studied. Raising the temperature from 25°C to 80°C increased the efficiency of the column and maximum flow rate of the mobile phase and reduced the influence of retention factor on peak broadening. At 80°C and velocities up to 3,7 mm/s the efficiency for alkylbenzenes was 19000–20000 plates/m.

Keywords: monolithic column, divinylbenzene, hydroxyalkyl methacrylate, HPLC

Введение

Монолитные диски и капиллярные монолитные колонки на основе органических полимеров успешно применяют в жидкостной хроматографии для экспрессного разделения смесей биологических макромолекул в режиме градиентного элюирования [1–3]. В то же время синтез полимерных монолитов для изократического разделения смесей низкомолекулярных органических веществ является актуальной задачей, решению которой посвящено большое число работ [4–

8]. Другая важная проблема — получение высокоэффективных полимерных монолитных колонок стандартного аналитического диаметра (2–4,6 мм) [8–10].

Недавно нами были получены монолитные колонки размером 150×3 мм на основе сополимера дивинилбензола (ДВБ), винилэтилбензола (ВЭБ) и 2-гидроксиэтилметакрилата (ГЭМА) [11]. Установлено, что при использовании додеканол-1 в качестве порогена увеличение молярной доли ГЭМА в исходной смеси мономеров с 10,5 до 14,7% приводит к уменьшению гидродинамической проницаемости монолитов на два порядка величины (с $1,1 \times 10^{-12}$ до $1,8 \times 10^{-14}$ м²) и росту эффективности колонок с 4000–5000 до 12000–20000 ТТ/м при разделении низкомолекулярных соединений при температуре 25°C.

Целью данной работы было синтезировать монолиты с применением новых гидроксиалкилметакрилатов и сравнить их с сорбентом, содержащим ГЭМА, а также исследовать влияние повышенной температуры при разделении на эффективность и селективность поли(ДВБ–ВЭБ–ГЭМА) колонки.

Эксперимент

Реагенты.

Для синтеза монолитов использовали 2-гидроксиэтилметакрилат (97%), гидроксипропилметакрилат (ГПМА, 97%, смесь изомеров), гидроксибутилметакрилат (ГБМА, 94%, смесь изомеров) (рис. 1), технический дивинилбензол (смесь, содержащая 80% 1,3- и 1,4-ДВБ и 20% 1-винил-3-этилбензола и 1-винил-4-этилбензола), 3-(триметоксисилил)пропилметакрилат (ТПМА, 98%), додеканол-1 (>98%) как пороген и 2,2'-азо-*бис*-изобутиронитрил (АИБН, >98%) как инициатор полимеризации (все «Sigma-Aldrich», США).

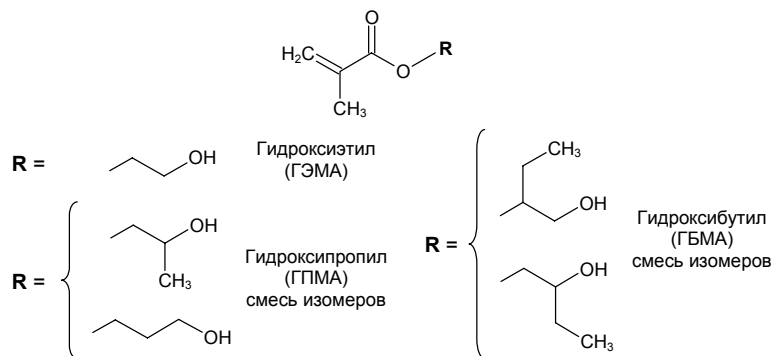


Рис. 1. Структуры гидроксиалкилметакрилатов, использованных для синтеза монолитов

В качестве сорбатов для изучения хроматографических свойств колонок использовали урацил ($\geq 99\%$), 4-винилпиридин (4-ВП, 95%), нитробензол ($>99\%$), этилбензол ($\geq 99\%$), пропилбензол (98%), бутилбензол ($\geq 99\%$) (все «Sigma-Aldrich», США), толуол (х.ч.) («Реахим», Россия), пиридин (ч.д.а.) и бензол (ч.д.а.). В качестве органического модификатора подвижной фазы (ПФ) использовали ацетонитрил (для градиентной ВЭЖХ) («Panreac», Испания). Все вещества применяли без дополнительной очистки. Для хроматографических экспериментов готовили раствор, содержащий 40 мг/л урацила, 200 мг/л 4-ВП, 500 мг/л нитробензола и по 1000 мг/л пиридина, бензола и алкилбензолов в смеси вода/ацетонитрил (4:6). Урацил использовали как неударживаемый компонент.

Синтез монолитных колонок

Монолиты синтезировали термоинициируемой свободнорадикальной полимеризацией внутри стеклянных трубок номинальным размером 150×3 мм (действительная длина — 148 мм, внутренний диаметр — 3,2–3,4 мм) («Tessek», Чехия), как описано в работе [11]. Для обеспечения ковалентной прививки монолитов к стенкам колонок поверхность стекла модифицировали ТМПМА [11]. Для того чтобы компенсировать усадку полимера в ходе синтеза и предотвратить отрыв монолита от стенок, полимеризацию проводили под давлением азота (4 бар). Поскольку в ходе синтеза происходит уменьшение объема полимеризационной смеси, а также с целью уменьшить влияние границы раздела между газовой фазой и жидкостью на структуру монолита, к основной колонке присоединяли стеклянную предколонку (30×3 мм).

Готовили раствор, содержащий 38 мас.% смеси мономеров, 62 мас.% додеканол-1 и 0,8 мол.% (от количества мономеров) АИБН. Смесь мономеров включала 14,7 мол.% одного из гидроксилалкилметакрилатов и 85,3 мол.% дивинилбензола (техн.). Полимеризационный раствор в течение 10 мин продували азотом для удаления растворенного кислорода. Далее колонку с предколонкой помещали в стальной кожух, заполняли полимеризационной смесью, через капилляр соединяли с баллоном с азотом и помещали в вертикальном положении в водный термостат, нагретый до температуры $60,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Синтез проводили в течение 22 ч. После синтеза монолит охлаждали в течение 20 мин до $30\text{--}40^\circ\text{C}$, удаляли излишки полимера с концов и помещали колонку в стальной кожух. Далее монолит промывали ацетонитрилом для удаления порога и непрореагировавших мономеров.

Изучение хроматографических свойств монолитов

Свойства полученных колонок изучали на хроматографе «Agilent 1200» («Agilent», Германия), снабженном насосом с дегазатором подвижной фазы, термостатом колонки, автоматизированной системой ввода пробы и спектрофотометрическим детектором. Все хроматографические данные были исправлены с учетом внеколоночного объема (57 мкл). Значения высоты эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) рассчитывали по формуле:

$$H = L \frac{w_{1/2}^2 - w_{1/2,e}^2}{5,545(t_R - t_e)^2},$$

где H — ВЭТТ, L — длина колонки, t_R — время удерживания вещества, $w_{1/2}$ — ширина пика на половине высоты, t_e и $w_{1/2,e}$ — время удерживания соединения и ширина пика на половине высоты, соответственно, измеренные с переходником нулевого объема, установленным вместо хроматографической колонки [11]. Гидродинамическую проницаемость монолитов рассчитывали по уравнению Дарси [1] из тангенса угла наклона зависимости перепада давления на колонке от скорости потока ПФ.

Обсуждение результатов

Влияние структуры гидроксилалкилметакрилата на свойства монолитов

На рис. 2 представлены хроматограммы смеси низкомолекулярных ароматических соединений на полученных колонках. Все колонки позволяют в использованных условиях полностью разделить тестовую смесь. Параметры разделения приведены в табл. 1. При переходе от монолита «ГЭМА» к монолиту

«ГБМА» факторы удерживания алкилбензолов увеличиваются на 10%, что, по-видимому, связано с повышением гидрофобности сорбентов за счет увеличения числа атомов углерода в структуре гидроксиалкилметакрилатов. Зависимости десятичного логарифма факторов удерживания бензола и алкилбензолов от числа CH_2 -групп в молекулах сорбатов линейны ($r^2 > 0,999$) и имеют тангенс угла наклона, равный 0,16 для всех монолитов, то есть метиленовая селективность колонок одинакова. Эффективность колонки «ГПМА» в среднем на 5–10% выше, а колонки «ГБМА» — ниже эффективности колонки «ГЭМА» (табл. 1). Таким образом, применение ГПМА и ГБМА вместо ГЭМА мало влияет на эффективность и селективность колонок.

Более заметный эффект изменение структуры мономеров оказывает на гидродинамические свойства монолитов. Коэффициенты гидродинамической проницаемости колонок «ГЭМА», «ГПМА», «ГБМА» равны, соответственно, $1,7 \times 10^{-14} \text{ м}^2$ ($1,8 \times 10^{-14} \text{ м}^2$ для аналогичной колонки, полученной нами ранее в [11]), $1,3 \times 10^{-14} \text{ м}^2$ и $2,8 \times 10^{-14} \text{ м}^2$, и в условиях, указанных на рис. 2, перепад давления на колонках составляет 64, 72 и 38 бар.

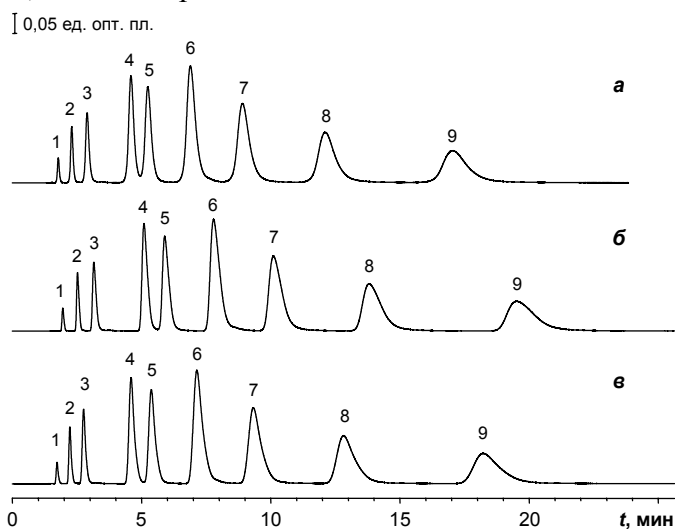


Рис. 2. Хроматограммы смеси ароматических соединений на монолитных колонках (150 × 3 мм), полученных полимеризацией смесей, содержащих ГЭМА (а), ГПМА (б), ГБМА (в). ПФ — вода/ацетонитрил (4:6), скорость потока — 0,5 мл/мин ($u = 1,3\text{--}1,5 \text{ мм/с}$). Температура колонки — 25°C. Объем пробы — 1 мкл. $\lambda = 210 \text{ нм}$.

Пики: урацил (1), пиридин (2), 4-винилпиридин (3), нитробензол (4), бензол (5), толуол (6), этилбензол (7), пропилбензол (8), бутилбензол (9)

В качестве порогена при синтезе монолитов использовали додеканол-1, который является «плохим» растворителем для стирольных полимеров. Однако наличие гидроксильной группы в молекуле додеканола делает его хорошим сольватирующим агентом для гидроксиалкилметакрилатов. В работе [11] показано, что увеличение доли ГЭМА в смеси мономеров приводит к снижению размеров микроглобул, образующих монолит, и, как следствие, уменьшает ширину проточных пор монолита. Это объясняется лучшей сольватацией порогеном полимера, содержащего большее количество ОН-групп.

Таблица 1. Факторы удерживания компонентов смеси ароматических соединений и эффективность полученных монолитных колонок. ПФ — вода/ацетонитрил (4:6), скорость потока — 0,5 мл/мин ($u = 1,3\text{--}1,5 \text{ мм/с}$), температура колонки — 25°C

Компонент	Монолит					
	«ГЭМА»		«ГПМА»		«ГБМА»	
	k'	N , ТТ/м	k'	N , ТТ/м	k'	N , ТТ/м
Урацил	0	22600	0	24700	0	18900
Пиридин	0.31	20100	0.31	22600	0.31	19200
4-ВП	0.67	15200	0.66	16300	0.64	15300
Нитробензол	1.7	16500	1.7	18000	1.8	16100
Бензол	2.1	15400	2.1	16900	2.3	15500
Толуол	3.1	13300	3.2	13900	3.3	13000
Этилбензол	4.3	12300	4.4	12700	4.7	12000
Пропилбензол	6.2	11300	6.5	11500	6.9	10900
Бутилбензол	9.2	10700	9.6	10700	10.2	10200

В данной работе замена ГЭМА на эквимольное количество ГПМА понизила проницаемость монолита на 20%. Вероятно, большая длина углеродной цепи в молекуле одного из изомеров ГПМА по сравнению с ГЭМА (рис. 1) облегчает в ходе синтеза взаимодействие гидроксильной группы порогена с гидроксильными группами на поверхности формирующихся полимерных микроглобул. Это приводит к снижению размера пор монолита и проницаемости. Применение коммерчески доступной смеси изомеров ГБМА равнозначно введению в структуру ГЭМА этильного заместителя, который создает стерические препятствия взаимодействию ОН-групп на поверхности полимера с порогеном. В результате размер пор монолита при использовании ГБМА увеличивается, и проницаемость колонки возрастает в 1,6 раза. Это позволяет работать с данной колонкой при более высоких скоростях потока ПФ и уменьшить продолжительность разделения.

Влияние температуры колонки на разделение

Проведение хроматографического разделения при повышенной температуре является одним из способов увеличения эффективности колонки и сокращения продолжительности анализа [4,12]. В табл. 2 приведены параметры разделения тестовой смеси ароматических соединений на колонке «ГЭМА» при скорости потока ПФ 0,5 мл/мин и различных температурах. Повышение температуры с 25°C до 80°C снижает факторы удерживания сорбатов и сокращает продолжительность разделения смеси в 2 раза. Зависимости десятичного логарифма факторов удерживания бензола и алкилбензолов от числа атомов углерода в боковой цепи линейны ($r^2 > 0,999$) при всех изученных значениях температуры. При увеличении температуры тангенс угла наклона зависимостей уменьшается с 0,16 до 0,14, метиленовая селективность снижается. Однако эффективность с ростом температуры существенно возрастает: для наиболее удерживаемого компонента (бутилбензола) число теоретических тарелок увеличивается с 10700 до 19600 ТТ/м, то есть в 1,8 раза (табл. 2).

Увеличение температуры с 25°C до 80°C также в 1,8 раза снижает вязкость ПФ. В результате перепад давления на колонке при скорости потока ПФ 0,5 мл/мин уменьшается с 64 до 35 бар. Снижение вязкости элюента позволяет использовать более высокую скорость потока при заданном максимальном давлении на входе в колонку.

Таблица 2. Факторы удерживания компонентов смеси ароматических соединений и эффективность колонки «ГЭМА» при различных температурах. ПФ — вода/ацетонитрил (4:6), скорость потока — 0,5 мл/мин ($u = 1,5$ мм/с)

Компонент	Температура колонки							
	25°C		40°C		60°C		80°C	
	k'	N , ТТ/м	k'	N , ТТ/м	k'	N , ТТ/м	k'	N , ТТ/м
Урацил	0	22600	0	21600	0	21200	0	21200
Пиридин	0.31	20100	0.30	20400	0.28	20800	0.27	21600
4-ВП	0.67	15200	0.61	17400	0.54	19200	0.48	21000
Нитробензол	1.7	16500	1.5	18200	1.2	20100	1.0	21800
Бензол	2.1	15400	1.8	17500	1.5	19300	1.2	21200
Толуол	3.1	13300	2.6	15700	2.1	18300	1.7	20700
Этилбензол	4.3	12300	3.7	14800	2.9	17500	2.3	20200
Пропилбензол	6.2	11300	5.2	13900	4.1	16800	3.2	19900
Бутилбензол	9.2	10700	7.6	13400	5.9	16500	4.5	19600

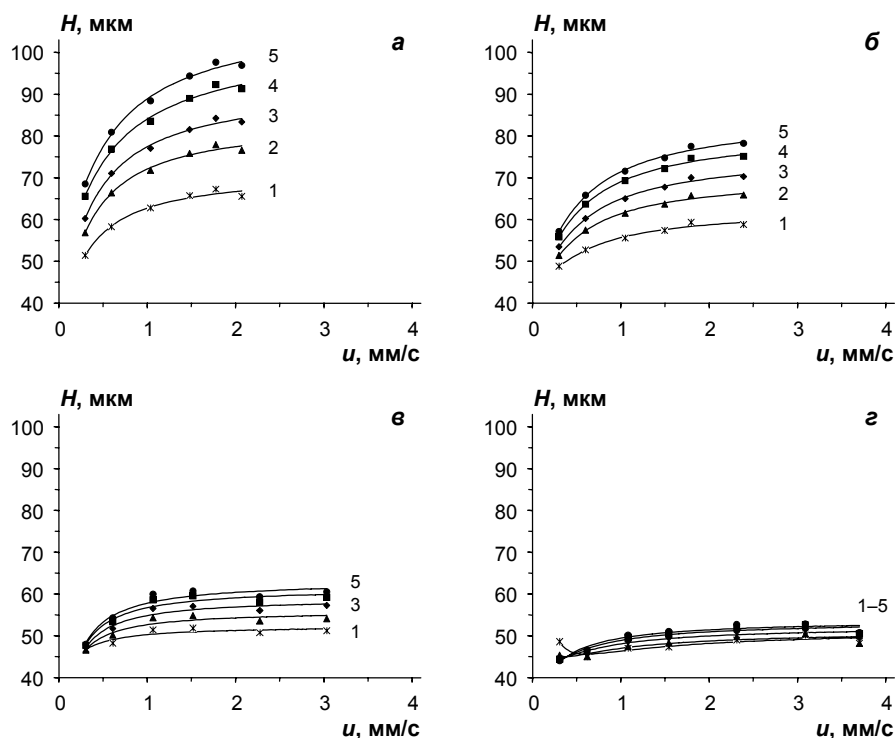


Рис. 3. Зависимости ВЭТТ (H) бензола (1), толуола (2), этилбензола (3), пропилбензола (4) и бутилбензола (5) от линейной скорости потока ПФ (u) при температуре колонки 25°C (а), 40°C (б), 60°C (в) и 80°C (г) для колонки «ГЭМА».

ПФ — вода/ацетонитрил (4:6). Объем пробы — 1 мкл

Для проведения экспрессных разделений, однако, также необходимо, чтобы при больших скоростях потока эффективность колонки оставалась высокой. На рис. 3 изображены зависимости ВЭТТ бензола и алкилбензолов от хроматографической линейной скорости потока ПФ для монолита «ГЭМА». Максимальная скорость была ограничена давлением в хроматографе 100 бар, выше которого монолиты механически неустойчивы. ВЭТТ были рассчитаны из

хроматограмм, полученных при последовательном увеличении, снижении и снова увеличении скорости потока ПФ при каждом значении температуры. Относительное стандартное отклонение ВЭТТ, определенных из трех вводов пробы, не превышает 6,1%, что говорит о стабильности колонки в работе. Полученные кривые $H-u$ выпуклы вверх, что свидетельствует о малой скорости диффузионного массопереноса в колонке и значительном вкладе неоднородности потока элюента в размывание хроматографических зон в исследованном интервале скоростей ПФ. При температуре 25°C (рис. 3, а) повышение скорости с 0,3 до 2,1 мм/с приводит к росту ВЭТТ на 30–40%, и для более удерживаемых сорбатов эффективность заметно ниже, чем для менее удерживаемых. Повышение температуры до 80°C увеличивает коэффициенты диффузии разделяемых компонентов. Как результат, кривые $H-u$ становятся более пологими, а влияние фактора удерживания на уширение хроматографических пиков уменьшается (рис. 3, з). При 80°C на скоростях до 3,7 мм/с для всех производных бензола ВЭТТ не превышает 53 мкм ($N > 19000$ ТТ/м).

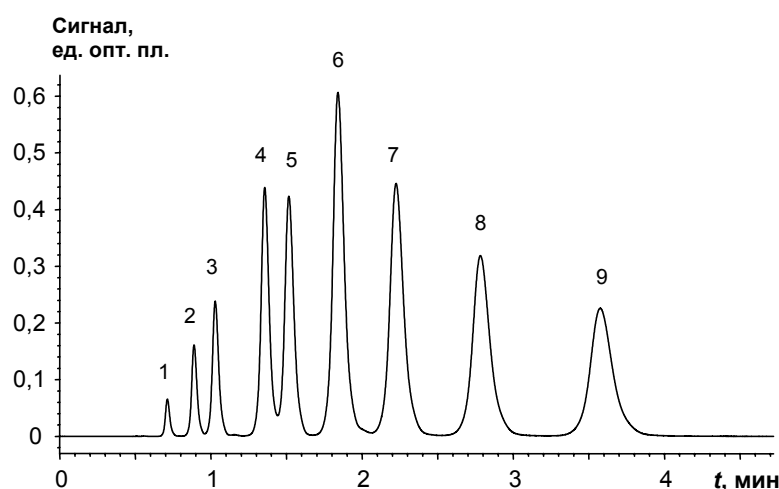


Рис. 4. Хроматограмма смеси ароматических соединений на монолитной колонке «ГЭМА» (150 × 3 мм) при температуре колонки 80°C и скорости потока ПФ 1,2 мл/мин ($u = 3,7$ мм/с, $\Delta p = 84$ бар). ПФ — вода/ацетонитрил (4:6). Объем пробы — 1 мкл. $\lambda = 210$ нм. Пики: урацил (1), пиридин (2), 4-винилпиридин (3), нитробензол (4), бензол (5), толуол (6), этилбензол (7), пропилбензол (8), бутилбензол (9)

Уменьшение коэффициентов распределения сорбатов, рост эффективности колонки и повышение максимальной скорости элюента позволяют при температуре 80°C и скорости потока ПФ 1,2 мл/мин ($u = 3,7$ мм/с) с использованием монолита «ГЭМА» проводить разделение тестовой смеси из девяти компонентов менее чем за четыре минуты (рис. 4).

Заключение

В данной работе синтезированы новые монолитные колонки на основе сополимеров ДВБ и ВЭБ с гидроксипропил- и гидроксibuтилметакрилатами. Установлено, что использование гидроксibuтилметакрилата вместо гидроксietилметакрилата позволяет в 1,6 раза поднять проницаемость монолита при снижении эффективности на 5–10%. Показано, что повышение температуры с 25°C

до 80°C в 1,8 раза увеличивает эффективность и максимальную скорость потока ПФ при разделении на поли(ДВБ–ВЭБ–ГЭМА) колонке, а также снижает влияние фактора удерживания на уширение хроматографических пиков. При температуре 80°C на скоростях до 3,7 мм/с для алкилбензолов эффективность составляет 19000–20000 ТТ/м.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-03-00215-а).

Список литературы

1. Guiochon G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1168. № 1–2. P. 101–168.
2. Svec F. Porous polymer monoliths: amazingly wide variety of techniques enabling their preparation // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 6. P. 902–924.
3. Vlakh E.G., Tennikova T.B. Applications of polymethacrylate-based monoliths in high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. № 13. P. 2637–2650.
4. Urban J., Svec F., Fréchet J.M.J. Hypercrosslinking: new approach to porous polymer monolithic capillary columns with large surface area for the highly efficient separation of small molecules // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 52. P. 8212–8221.
5. Nischang I., Teasdale I., Brüggemann O. Towards porous polymer monoliths for the efficient, retention-independent performance in the isocratic separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 48. P. 7514–7522.
6. Greiderer A., Trojer L., Huck C.W., Bonn G.K. Influence of the polymerisation time on the porous and chromatographic properties of monolithic poly(1,2-bis(*p*-vinylphenyl))ethane capillary columns // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. № 45. P. 7747–7754.
7. Викторова Е.Н., Канатьева А.Ю., Королев А.А., Курганов А.А. Монолитные капиллярные колонки на основе дивинилбензола в капиллярной жидкостной хроматографии // Журн. физич. химии. 2007. Т. 81. № 3. С. 507–511.
8. Матусова С.М., Иванова К.И., Дьячков И.А., Смоленков А.Д., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Полиалкилметакрилатные монолитные колонки для ВЭЖХ // Изв. АН. Сер. химич. 2008. № 12. С. 2503–2509.
9. Trojer L., Lubbad S.H., Bisjak C.P., Wieder W., Bonn G.K. Comparison between monolithic conventional size, microbore and capillary poly(*p*-methylstyrene-*co*-1,2-bis(*p*-vinylphenyl)ethane) high-performance liquid chromatography columns. Synthesis, application, long-term stability and reproducibility // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1146. № 2. P. 216–224.
10. Mayr B., Hölzl G., Eder K., Buchmeiser M.R., Huber C.G. Hydrophobic, pellicular, monolithic capillary columns based on cross-linked polynorbornene for biopolymer separations // Anal. Chem. 2002. V. 74. № 23. P. 6080–6087.
11. Smirnov K.N., Dyatchkov I.A., Telnov M.V., Pirogov A.V., Shpigun O.A. Effect of monomer mixture composition on structure and chromatographic properties of poly(divinylbenzene-*co*-ethylvinylbenzene-*co*-2-hydroxyethyl methacrylate) monolithic rod columns for separation of small molecules // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. № 30. P. 5010–5019.

12. Huo Y., Schoenmakers P.J., Kok W.T. Efficiency of methacrylate monolithic columns in reversed-phase liquid chromatographic separations // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1175. № 1. P. 81–88.

Смирнов Константин Николаевич – аспирант, МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии, Москва, тел. (495) 939-46-08

Дьячков Иван Александрович – мл. науч. сотр., МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии, Москва, тел. (495) 939-46-87

Пирогов Андрей Владимирович – докт. хим. наук, вед. науч. сотр., МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии, Москва

Шпигун Олег Алексеевич – член-корр. РАН, докт. хим. наук, проф., МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии, Москва

Smirnov Konstantin N. – PhD student, Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Analytical Chemistry Division, Moscow, e-mail: smirnov-const@yandex.ru

Dyatchkov Ivan A. – junior researcher, Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Analytical Chemistry Division, Moscow

Pirogov Andrey V. – doctor of science, major researcher, Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Analytical Chemistry Division, Moscow

Shpigun Oleg A. – corresponding member of Rus. Acad. Sci., doctor of science, prof., Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Analytical Chemistry Division, Moscow