

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

им. М. В. Ломоносова

Химический факультет

Кафедра аналитической химии

Лаборатория хроматографии

Шеболкина Ольга Александровна

**Жидкостная хроматография углеводов и многоатомных спиртов
с использованием катионообменников, насыщенных металлами**

Дипломная работа

Научные руководители:

асп.3 г.о. Лаптев А.Ю.

к.х.н., доц. Рожманова Н. Б.

Научный консультант:

д.х.н., в.н.с. Нестеренко П. Н.

Москва

2023

Перечень сокращений, условных обозначений, символов и терминов

ЖХ – жидкостная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая ВЭЖХ

НФ – неподвижная фаза

ПФ – подвижная фаза

МС – масс-спектрометрия

УФ – спектрофотометрический детектор УФ-диапазона

СП – степень полимеризации углеводов

ПС/ДВБ – полистирол-дивинилбензольные смолы

ДВБ – дивинилбензол

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТГФ – тетрагидрофуран

тТ/м – число теоретических тарелок на метр

Оглавление

Введение.....	5
1. Обзор литературы.....	7
1.1. Общие сведения об углеводах и многоатомных спиртах.....	7
1.2. Катионообменные смолы.....	8
1.3. Механизмы разделения на катионообменных смолах.....	10
1.4. Варьируемые параметры	13
1.4.1. Тип противоиона	13
1.4.2. Комбинирование колонок	16
1.4.3. Степень сшивки.....	18
1.4.4. Температура.....	19
1.4.5. Скорость подвижной фазы.....	21
1.4.6. Элюент	22
1.4.7. Сочетание нескольких параметров	23
1.5. Применение катионообменников в аналитической практике	24
1.6. Выводы из обзора литературы	28
2. Экспериментальная часть	30
2.1. Используемые реактивы и аппаратура.....	30
2.2. Набивка колонки	31
2.3. Методика эксперимента.....	31
2.4. Исследование поверхности сорбента	32
2.5. Структурные формулы тестовых анализов	33
3. Обсуждение результатов	35
3.1. Изучение хроматографического удерживания органических веществ	35
3.1.1. Изучение хроматографического удерживания одноатомных спиртов.....	35
3.1.2. Изучение хроматографического удерживания диолов	38
3.1.3. Изучение хроматографического удерживания альдегидов и кетонов.....	39
3.1.4. Изучение хроматографического удерживания кислот	44
3.1.5. Изучение хроматографического удерживания углеводов	48

3.1.6. Изучение хроматографического удерживания альдитов	52
3.2. Анализ реального объекта	53
3.3. Сравнение исследованного отечественного сорбента с иностранным аналогом	55
Выводы	58
Список литературы	59

Введение

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) — это стандартный метод экспресс-анализа короткоцепочечных органических кислот, алифатических альдегидов, кетонов, спиртов и углеводов, которые являются важными соединениями в пищевой химии, а также в клинических, биологических исследованиях и исследованиях биомассы. Актуальность метода обусловлена простотой пробоподготовки, эффективностью и экспрессностью анализа многокомпонентных проб.

Наибольшее значение в различных областях исследований, таких как биохимия, клиническая химия, биология, фармация, биотехнология и пищевая химия имеют углеводы и многоатомные спирты [1], однако ранее хроматографическое определение и разделение этих соединений проводили на иностранных сорбентах, что в настоящее время труднодоступно.

Изначально моно- и олигосахариды разделяли с помощью жидкостной хроматографии на материалах колонок с аминогруппами, в то время как в обращенно-фазовой ВЭЖХ силикагель с привитыми группами C_{18} использовались для разделения альдегидов, кетонов и спиртов. Позднее для разделения моносахаридов, альдегидов, кетонов, спиртов и олигосахаридов стали применять ионообменную высокоэффективную жидкостную хроматографию [2].

Благодаря разработке новых ионообменных материалов с малым размером частиц, которые стабильны при более высоких давлениях, стало возможным повышение эффективности колонки и сокращение времени удерживания.

Полистирол-дивинилбензолные катионообменные смолы с противоионом металла и водой в качестве элюента оказались полезными для разделения углеводов и олигомеров, тогда как H^+ -форма с кислым элюентом применялась для анализа органических кислот. Впоследствии колонки, заполненные эффективными ионообменными материалами, стали коммерчески доступными, особенно колонки серии НРХ (Bio-Rad Labs., Ричмонд, Калифорния, США), и начали использоваться для разделения углеводов и органических кислот [2, 3].

Цель данной **работы** - изучение хроматографических возможностей отечественного сульфокатионообменника для разделения и определения сахаров, спиртов и других органических соединений в связи с тем, что в настоящее время остро стоит вопрос импортозамещения. В качестве отечественного сорбента был выбран сульфированный сополимер стирола и дивинилбензола (ПС/ДВБ).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить закономерности хроматографического удерживания ряда органических соединений, включая спирты, кислоты, углеводы, многоатомные спирты.
2. Оценить перспективы применения отечественного сорбента для анализа реальных объектов в режиме ионно-эксклюзионной ВЭЖХ с использованием катионообменника и сравнить его возможности с труднодоступными коммерческими зарубежными аналогами.
3. Провести анализ реального объекта.

1. Обзор литературы

1.1. Общие сведения об углеводах и многоатомных спиртах

Углеводы и альдиты – ациклические многоатомные спирты общей формулы $\text{HOCH}_2[\text{CH}(\text{OH})]_n\text{CH}_2\text{OH}$ – могут добавлять в обработанные пищевые продукты для различных технологических целей. Кислотный или ферментативный гидролиз кукурузного крахмала дает глюкозу и короткоцепочечные олигомеры глюкозы с различной степенью полимеризации, такие как мальтоза (СП2) и мальтотриоза (СП3). Полученный кукурузный сироп часто используется вместо сахарозы и инвертного сахара (продукт гидролитического разложения сахарозы на смесь глюкозы и фруктозы) в качестве подсластителя в пищевой промышленности. Ферментативное превращение глюкозы в кукурузных сиропах во фруктозу дает гораздо более сладкий кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы. Лактоза используется в пищевых продуктах для младенцев и выздоравливающих; она также обеспечивает основу для молочнокислого брожения в йогуртах и других продуктах. Ферментативное преобразование лактозы из сыворотки в глюкозу и галактозу дает сладкий сироп, который может заменить кукурузный сироп во многих пищевых продуктах. Молоко с пониженным содержанием лактозы предназначено для людей с непереносимостью лактозы, которые в противном случае избегали бы молока и других молочных продуктов [4].

Синтетические углеводы пользуются популярностью в качестве заменителей сахара. В целом почти все искусственные подсластители в сотни раз слаще сахара. Сукралоза представляет собой дисахарид, состоящий из 1,6-дихлор-1,6-дидезоксифруктозы и 4-хлор-4-дезоксигалактозы. Сукралоза слаще сахарозы примерно в 600 раз. Ее используют в огромном количестве различной продукции, выпечке; в детском, диетическом и диабетическом питании. В большинство продуктов, содержащих сукралозу, добавляют наполнители и дополнительный подсластитель, чтобы довести продукт до соответствующего объема и текстуры эквивалентного количества сахара [5].

В качестве таких наполнителей, добавляющих объем, используют альдиты. Они представляют собой плохо усваиваемые углеводы, полученные путем гидрогенизации

сахара. В отличие от сукралозы, их сладость не достигает сладости сахарозы. Одним из самых популярных многоатомных спиртов является эритрит, используемый в качестве заменителя сахара [6]. Маннит может выступать в качестве стабилизатора, загустителя и агента, предотвращающего слеживание, в то время как сорбит замедляет затвердевание сахаров и действует как секвестрант (хелатирующий объект) в безалкогольных напитках и винах.

Глюкоза и фруктоза встречаются в природе в свободном состоянии во фруктах и других растительных тканях, а также в меде. Свободная глюкоза содержится также в жидкостях животных (кровь, лимфа и спинномозговая жидкость). Моносахариды пентоз, арабинозы, ксилозы и рибозы, и гексоз, маннозы и галактозы редко встречаются в природе в свободном виде, за исключением продуктов распада во время ферментации. Из дисахаридов мальтоза образуется только при синтезе или разложении крахмала; лактоза встречается исключительно в тканях молочной железы, в то время как сахароза повсеместно присутствует в корнеплодах и многих фруктах. Эритрит широко распространен в природе, а также в пищевых продуктах, таких как вино, пиво, грибы, виноград и соевый соус. Сорбит содержится во многих ягодах (но не в винограде), а также в яблоках, грушах, сливах и вишнях, а маннит образуется в продуктах ферментации овощей, таких как квашеная капуста [4].

1.2. Катионообменные смолы

Макропористым материалам ПС/ДВБ посвящено множество исследований из-за простых методов синтеза, регулируемого размера пор и частиц, хорошей механической и химической стабильности и широкой области применения. К настоящему времени макропористые микросферы ПС/ДВБ широко используются во многих областях, в частности, в качестве исходных материалов для процессов разделения, в качестве ионообменных смол, в качестве специфических сорбентов различных методик жидкостной хроматографии и как носители катализаторов [7,8].

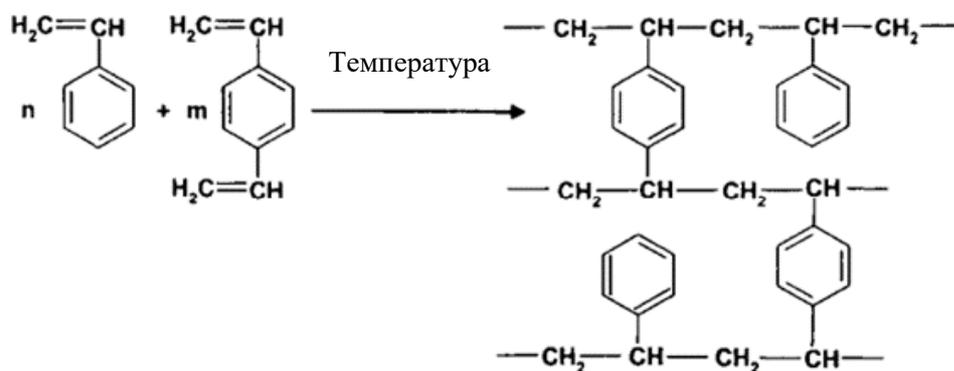


Рис. 1. Структура ПС/ДВБ [1].

ПС/ДВБ можно использовать в ионообменной хроматографии из-за наличия ароматического кольца, которое может взаимодействовать с реагентами с образованием ионообменников в результате включения ионогенных групп. Электрофильное ароматическое замещение, т.е. сульфирование является наиболее распространенной реакцией дериватизации ПС/ДВБ [9].

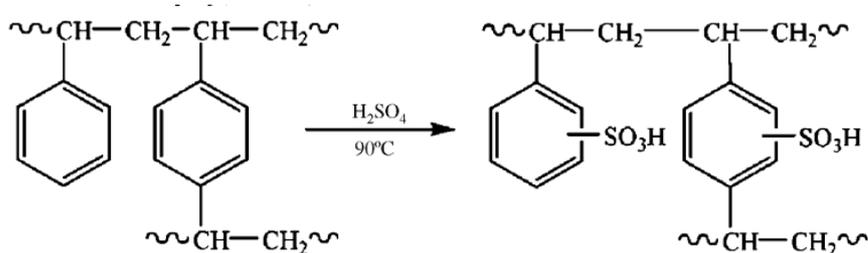


Рис. 2. Реакция сульфирования ПС/ДВБ [9].

Полимерные ионообменники обычно представляют собой сферические гранулы ПС/ДВБ мелкого размера со средним диаметром 8-12 мкм. В зависимости от степени сшивки и процесса полимеризации можно выделить два типа пористых материалов: сополимерные матрицы ПС/ДВБ гелевого типа и сополимерные матрицы ПС/ДВБ макропористого типа. Синтетические смолы гелевого типа обычно содержат в качестве сшивающего реагента 2—12% дивинилбензола. В этих смолах пористость присутствует только в набухшем состоянии и образуются микропоры (набухающая пористость). Если полимеризацию проводить в присутствии не менее 20% неполимеризующегося соединения, растворяющего мономеры, а не полимер, получается продукт с макропористой структурой, которая существует и в сухом

состоянии (постоянная пористость). В таких смолах содержание ДВБ до 65% приводит к высокой степени сшивки и более высокой механической стабильности.

ПС/ДВБ -частицы обычно получают суспензионной полимеризацией в широком диапазоне размеров. Для получения частиц с узким распределением по размерам их нужно отделить от остальных. Это может быть достигнуто седиментацией или центрифугированием, и обычно достигается выход около 30%. [1].

Наиболее простым и в то же время эффективным способом синтеза катионообменников является предложенный еще в 1935 г. Адамсом и Холмсом и успешно применяемый в настоящее время способ прямого сульфирования бензольных колец в сополимере стирола и дивинилбензола. Однако основное внимание в этой области уделено исследованию сополимеров со степенью сшивки 4–12%. К основным преимуществам данной методики синтеза следует отнести доступность оборудования, легкость исполнения, а также устойчивость основных характеристик получаемых катионообменников (ионообменной емкости, селективности и эффективности разделения) в процессе работы. Наибольшую трудность вызывает контроль степени сульфирования при синтезе сорбентов со средним значением (0,3–0,5 мг.экв/г) ионообменной емкости [10].

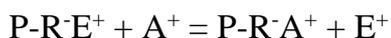
Сульфированные колонки ПС/ДВБ обычно имеют длину 30 см внутренний диаметр 6.5 мм (например, Sugar-PAK I, Waters Chromatography Division) или 7.8 мм (например, линейку Aminex HPX, Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, Hertfordshire, UK). Максимальное обратное давление, которое может быть приложено к колонке размером 30 см x 7.8 мм, со степенью сшивки 8%, содержащей противоион Ca^{2+} или Pb^{2+} , составляет 1500 фунтов на кв. дюйм (103 бар), что обеспечивает максимальную скорость потока 1.2 мл/мин [4].

1.3. Механизмы разделения на катионообменных смолах

С катионообменными смолами в протонированных формах или формах с ионами металлов могут быть одновременно эффективны несколько механизмов удерживания, включая ионный обмен, исключение ионов, исключение размера, ионно-распределительная хроматография, взаимодействие с сульфонатной группой и взаимодействие с матрицей носителя.

- Ионный обмен

Ионообменная хроматография использует различные ионные взаимодействия молекул образца с заряженными функциональными группами матрицы-носителя. Принцип механизма состоит в обмене ионной частицы (E^+) с противоположным зарядом на группу с фиксированным ионным зарядом (R^-) в полимере (P) через другой противоион (A^+). Стехеометрическая реакция этого процесса:



Это равновесие можно использовать для разделения катионов на катионообменной смоле на основе жидкостной хроматографии. При условии, что водный элюент содержит электролит E^+Y^- , а неподвижная фаза находится в форме $P-R-E^+$, два введенных иона пробы A^+ и B^+ будут конкурировать с катионом элюента E^+ за катионообменные центры R^- на сополимере P. Разделение A^+ и B^+ осуществляется за счет их различных ионообменных равновесий, которые также определяют время удерживания аналита [1].

- Эксклюзия ионов

Явление эксклюзии ионов можно объяснить как отталкивание ионов с равнонаправленными зарядами. Нейтральные, незаряженные молекулы проникают в смолу, а одноименно заряженные ионы отталкиваются из-за наличия диссоциированных функциональных групп, иммобилизованных в неподвижной фазе. По аналогии с мембранным равновесием Доннана сетка гидратированной смолы ведет себя как полупроницаемая мембрана между неподвижной и подвижной фазами. За исключением ковалентно связанных функциональных групп, все остальные виды свободно обмениваются через такую гипотетическую мембрану. Поскольку концентрация ионов в стационарной фазе превышает концентрацию ионов в подвижной фазе, осмотические силы имеют тенденцию переносить воду в смолу, что вызывает набухание смолы. Степень набухания уменьшается с увеличением концентрации ионов в подвижной фазе и увеличением сшивки смолы.

Соотношение концентраций ионизированной и нейтральной форм аналита определяется его константой диссоциации и эквивалентно эффективному заряду растворенного вещества. Следовательно, удерживание растворенного вещества

зависит от этой константы. Полностью диссоциированные сильные кислоты отталкиваются электростатически. Как следствие, они элюируются неразделенными в мертвом объеме колонки. С другой стороны, недиссоциированные молекулы способны проникать в смолу. Они удерживаются дольше, что делает возможным их разделение и определение, однако этим методом можно разделить только кислоты средней силы, константы диссоциации которых находятся в диапазоне 10^{-7} - 10^{-2} [11].

- Эксклюзия по размеру частиц

Эксклюзия по размеру частиц основана на уменьшении проницаемости стационарной фазы, состоящей из пористой трехмерной сети, для молекул увеличивающегося размера. Время пребывания каждого компонента в растворе образца зависит от соотношения его молекулярных размеров к диаметру пор в неподвижной фазе. Молекулы, которые слишком велики, чтобы проникнуть в поры, остаются в межтканевой жидкости, когда подвижная фаза проходит через колонку, и элюируются в мертвом объеме V_m . Те, что достаточно малы, чтобы свободно проходить через поры, элюируются в объеме, соответствующем общему объему жидкости в колонке V_t . V_t представляет собой сумму объема пустот и того, что содержится в порах, объем пор V_p . Между этими двумя крайними точками, составляющими верхний и нижний пределы интервала фракционирования неподвижной фазы, лежат те растворенные вещества, которые способны проникать в поры в разной степени, а время их удерживания варьируется в зависимости от доступной доли пор, которая определяет коэффициент распределения K_D . Тогда при отсутствии других механизмов удерживаемый объем равен:

$$V_R = V_m + K_D * V_p [12].$$

- Ионно-распределительная хроматография

Специфика каждого типа сорбента связана с тем, что разные противоионы образуют характерные комплексы с углеводами; удерживающие свойства зависят от стабильности комплекса; порядок элюирования внутри класса углеводов определяется стереохимией молекулы полиола. Использование насыщенных ионами металлов катионитов для разделения полярных неионогенных соединений часто называют ионно-распределительной хроматографией [4].

- Взаимодействие с сульфогруппами

Сульфонатные группы, присоединенные к ПС/ДВБ, способны вызывать удержание молекул образца двояким образом. Во-первых, аналиты могут адсорбироваться за счет диполь-дипольных сил или водородных связей. Во-вторых, вода, связанная внутри частиц, может приобретать более полярную структуру, чем вне матрицы, за счет влияния сульфонатных групп. В таких условиях аналиты могут быть разделены в соответствии с их различной степенью предпочтения более полярной фазы внутри частиц по сравнению с менее полярной подвижной фазой вне частиц. Однако четкое разграничение этих двух механизмов невозможно. Тем не менее, как адсорбция, так и разделение являются основными силами при разделении углеводов на сульфированных сополимерах ПС/ДВБ, когда в качестве элюентов используются вода или разбавленная серная кислота [1].

- Взаимодействие с несущей матрицей

Несущая матрица сульфированной смолы ПС/ДВБ представляет собой неполярную ароматическую сетку, которая позволяет проводить обращенно-фазовое разделение молекул образца между полярной подвижной фазой и основной цепью неполярной смолы. Этот механизм преобладает при разделении с участием таких молекул, как алифатические кислоты и спирты, а также фенолы. Удержание наиболее сильно в случае водных элюентов. Однако элюирование можно ускорить добавлением органических растворителей. В большинстве случаев наблюдается линейная зависимость между временем удерживания и логарифмом содержания органического модификатора в элюенте [1].

1.4. Варьируемые параметры

Механизмы разделения на сульфированной ПС/ДВБ зависят от множества переменных, таких как размер частиц сорбента, сшивка, тип противоиона, температура колонки, состав элюента и скорость потока.

1.4.1. Тип противоиона

На качество разделения углеводов на катионообменных смолах влияет тип противоиона. В то время как одна и та же смола, содержащая Ca^{2+} или Pb^{2+} , успешно

применялась для разделения моно- и олигосахаридов, для анализа олигосахаридов Ag^+ является предпочтительным противоионом. Также, насыщенные Ca^{2+} обменники больше подходят для анализа различных продуктов разложения сахаров, таких как альдегиды и кетоны.

То, что в зависимости от используемого противоиона катионообменные смолы больше подходят либо для разделения олигосахаридов, либо для разделения моносахаридов и продуктов разложения сахара показано в работе [13]. Авторы использовали 3 варианта стационарных фаз и колонок:

(I) Сульфонирующая ПС/ДВБ смола, содержащая Ca^{2+} , 7,5% сшивки, 8 мкм, внутренний диаметр 300×7,8 мм.;

(II) Сульфонирующая ПС/ДВБ смола, содержащая Ag^+ , 4% сшивки, 25 мкм, внутренний диаметр 300×7,8 мм;

(III) Сульфонирующая ПС/ДВБ смола, содержащая Ca^{2+} , 8% сшивки, 9 мкм, внутренний диаметр 100×7,8 мм.

На рис. 3 приведены хроматограммы эталонных соединений в одинаковых условиях для колонок (I), (II) и (III) при температуре 95°C. На колонке (I) было получено хорошее разрешение для моносахаридов глюкозы, ксилозы и арабинозы, но плохое для пары фруктозы и арабинозы. Колонка (II) обеспечивает хорошее разделение олигомерной части вплоть до СП9, но плохое для глюкозы, ксилозы, фруктозы, арабинозы, дигидроксиацетона и этанола.

Чтобы сократить время, необходимое для разделения моносахаридов, альдегидов, кетонов и спиртов, была исследована и оптимизирована короткая колонка (III). Олигосахариды не могут быть отделены от моносахаридов на этой стационарной фазе. Однако целлобиоза, глюкоза, ксилоза, фруктоза, дигидроксиацетон, 1,6-ангидро-β-D-глюкоза и гетероциклические альдегиды, такие как гидроксиметилфурфурол и фурфурол, отделяются в течение 7 мин благодаря высокой скорости потока и температуре колонки 95°C.

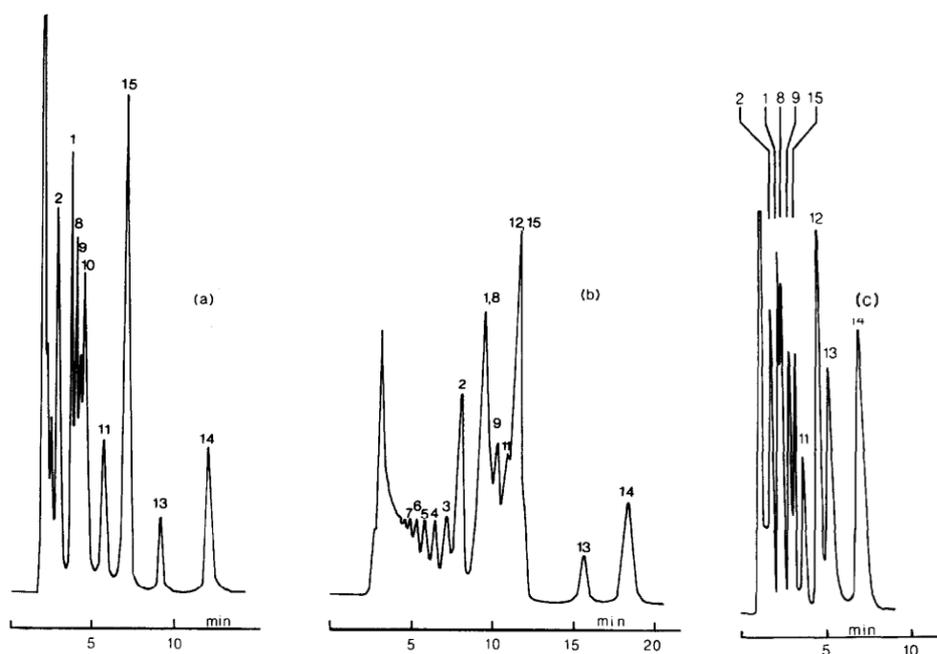


Рис. 3. Хроматографические условия: температура колонки 95°C, подвижная фаза вода; скорость потока 1,2 мл/мин; детектор – рефрактометр. а – колонка (I), б – колонка (II), в – колонка (III) [13].

Пиковый номер соединения:

1. D-Глюкоза
2. СП2
3. СП3
4. СП4
5. СП5
6. СП6
7. СП7
8. D-Ксилоза
9. D-Фруктоза
10. D-Арабиноза
11. Дигидроксиацетон
12. 6-ангидро-β-D-глюкоза

13. Гидроксиметилфурфурол

14. Фурфурол

15. Этанол

1.4.2. Комбинирование колонок

Как видно из работы [13], в то время как одни ионообменные смолы в качестве стационарных фаз позволяют хорошо разделять олигосахариды, но не способны разделять моносахариды и продукты распада сахара в достаточной степени, другие стационарные фазы демонстрируют хорошую способность к разделению моносахаридов и продуктов дальнейшего разложения, но плохую в отношении олигосахаридов. Выбирая подходящие ионообменные смолы для комбинирования в одной подвижной фазе, можно объединить «сильные стороны» их разделения, чтобы получить систему, позволяющую разделить вышеуказанные группы веществ за один аналитический цикл. Для достижения этой цели представляется возможным выполнить последовательное соединение двух или более колонок с начальной стадией деления на первичной колонке и дальнейшим разделением фракций на второй колонке с использованием той же подвижной фазы. При таком расположении длины колонок и стационарные фазы могут варьироваться для достижения приемлемого порядка элюирования [14-16].

- С разными противоионами

Так, в работе [14] последовательное соединение различных ионообменных стационарных фаз с разными противоионами и с водой в качестве элюента обеспечило привлекательную возможность регистрации всего спектра веществ в углеводном процессе за один анализ, начиная с еще недеградировавших олигосахаридов, вплоть до моносахаридов и ангидросахаридов, а также продуктов последующих превращений.

Помимо увеличения числа разделяемых соединений другим преимуществом комбинирования колонок по сравнению с использованием градиентов температуры состоит в том, что колонки не нужно регенерировать после анализа. Это желательно в рутинных операциях. Наряду с коротким временем анализа для комбинированных

колонок следует подчеркнуть сокращение технических затрат по сравнению с использованием отдельных колонок.

- С одинаковыми противоионами

Последовательное соединение колонок с одинаковым противоионом также может быть использовано для улучшения разрешения. Так, в работе [15] описывают простой и быстрый метод анализа гидролизатов, полученных в результате ферментативного расщепления различных полисахаридов.

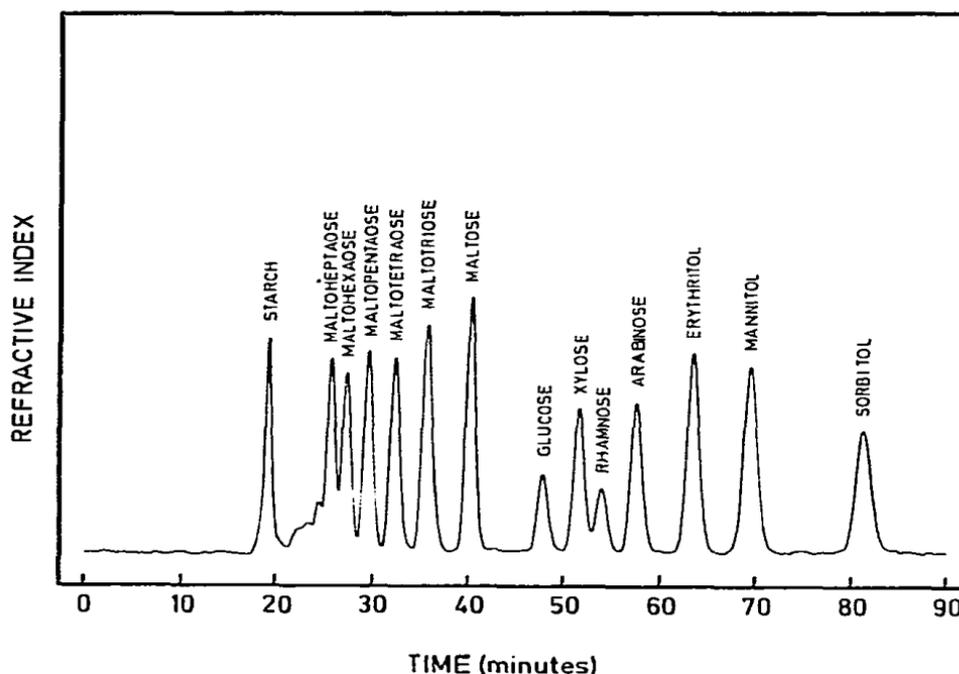


Рис.4. Хроматограмма смеси синтетических углеводов. Колонки 90 x 0,78 см; Аминекс НРХ-47. Температура колонки 85°C; элюент вода; скорость потока 0,5 мл/мин [15].

В работе было изучено разделение синтетической смеси четырнадцати углеводов и альдитов на Aminex НРХ-42 в кальциевой форме с деионизированной водой в качестве подвижной фазы (рис.4). Олигосахариды (от мальтогептаозы до мальтозы) элюируются из слоя смолы в порядке уменьшения молекулярного размера, что аналогично фракционированию олигосахаридов с помощью гель-хроматографии. Моносахариды и альдиты разделяются по механизму аналогичному распределительной хроматографии. Полисахариды немедленно элюируются, а не необратимо связываются с колонкой, что можно наблюдать при ЖХ с обращенной

фазой. Различные моносахариды и олигосахариды до СП9 разделялись в течение 90 минут за одну инъекцию. Высокое разрешение может быть получено только при использовании трех связанных колонок, каждая размером 30 x 0,78 см. После ежедневного использования в течение одного года эти колонки не показали заметного изменения разрешения.

- С анионообменниками

Катионообменные колонки можно использовать также в сочетании с анионообменниками. В работе [16] описано применение высокоэффективной жидкостной хроматографии для количественного анализа органических кислот в технологическом соке сахарного тростника. Разделение этих кислот осуществляется на катионообменных колонках Aminex HPX-87H. Разрешение улучшается за счет последовательного соединения двух колонок и их уравнивания при разных температурах. Кислоты в образце сначала выделяют на анионообменной смоле DEAE-Sephadex A-25, уравновешенной 0,5 М изомасляной кислотой. Затем их элюируют 0,5 М серной кислотой и вводят непосредственно в колонку Aminex HPX-87H после фильтрации через мембрану 0,45 мкм. Этот метод позволяет одновременно определять щавелевую, цис-аконитовую, лимонную, фосфорную, яблочную, транс-аконитовую, янтарную, гликолевую, молочную, муравьиную и уксусную кислоты. Изомасляная кислота также отделяется в этой системе и дает полезное представление о емкости загрузки анионообменной смолы.

1.4.3. Степень сшивки

Наибольший интерес представляют ионообменные смолы со степенью сшивки 4-12 %. Они достаточно устойчивы к давлению и, следовательно, могут использоваться в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии. Если степень сшивки меньше 4%, стабильность давления не обеспечивается при более высоких скоростях потока. Катионообменным смолам с высокой степенью сшивки (содержащим более 50 % ДВБ) в существующей литературе уделено сравнительно мало внимания [17].

Степень сшивки смолы является одним из наиболее важных параметров, поскольку разделение может иметь место только тогда, когда молекулы пробы хотя бы частично проникают в матрицу. По этой причине катионообменные смолы для анализа

олигосахаридов обычно имеют более низкую степень сшивки, чем смолы, оптимизированные для разделения мономеров. Ag^+ в качестве противоиона приводит к особенно высокому разрешению глюкоолигомеров при содержании металла 70% и степени сшивки 4%.

Выбирая степень сшивки и содержание металла можно подобрать условия для разделения различных соединений. Так, в работе [18] изучено разделение олигосахаридов на катионообменных смолах серебряной формы. Рабочие условия, используемые при ВЭЖХ-разделениях с наполненными смолой колонками, следующие: растворитель представляет собой деионизированную воду с непрерывной подачей. Размеры колонки 30 см x 7,8 мм, температура колонки 85°C. Детектор представляет собой дифференциальный рефрактометр, при температуре 45°C.

Проводили разделение три-, тетра- и высших сахаров на смоле в форме серебра. Различные разделения на смолах с 5, 6 и 8% сшивки показаны на рис. 5 правый при оптимальном содержании серебра. Цифры над пиками означают СП.

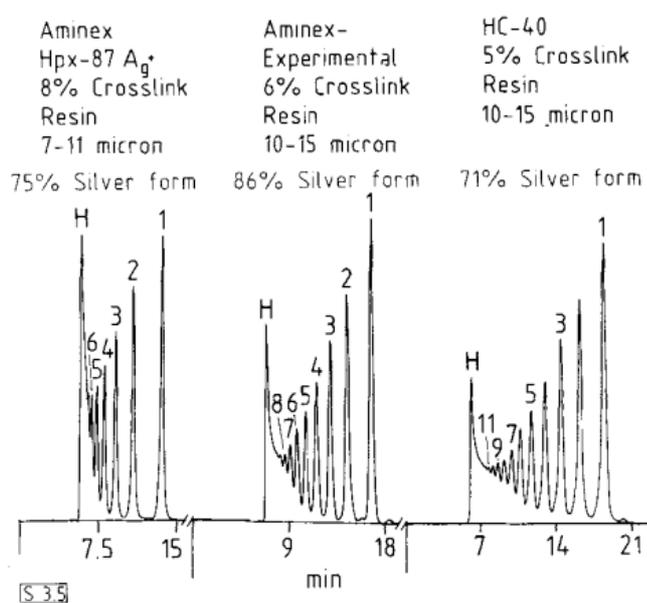


Рис. 5. Разделение сахаридов в сиропе на смоле серебряной формы на 5,6 и 8% сшитых смолах [18].

1.4.4. Температура

Колонки, заполненные сульфированными смолами ПС/ДВБ, требуют работы при высоких температурах (обычно в диапазоне **80-90°C**) для оптимальной

эффективности. Повышенная температура увеличивает скорость массопереноса между подвижной и неподвижной фазами, тем самым уменьшая размывание полос и улучшая разрешение пиков. Результирующее снижение вязкости подвижной фазы снижает противодавление в колонке и, таким образом, позволяет использовать более высокую скорость потока. Повышенная температура также ускоряет мутаротационное вращение и обеспечивает получение только одного пика для каждого редуцирующего сахара [2, 19, 20].

В работе [19] было изучено влияние повышения температуры на хроматографические характеристики на разделение углеводов и альдитов с помощью катионообменной смолы ПС/ДВБ в форме Na^+ с использованием сверхкритической воды в качестве элюента. Разделение проводили на колонке, имеющей внутренний диаметр 2,2 см и длину слоя 26 см. Скорость потока обычно составляла 1 мл/мин, а давление - 1 МПа.

Результаты показали, что повышение температуры влияет на разделение, уменьшая удерживаемый объем и ширину пика, а не улучшая селективность. Сильный катионит хорошо выдерживает докритические условия, но некоторые углеводы начинают разлагаться при 373 К в воде. В зависимости от соединения верхний предел температуры разделения сахаров составляет около 398 К, тогда как изученные альдиты способны выдерживать даже 423 К. Таким образом, было выявлено, что повышенная температура благоприятна для разделения.

Однако было замечено, что влияние температуры может сильно сказываться на изменении времени удерживания одних веществ и незначительно в случае других [2]. Следовательно, выбор определенной температуры колонки часто может улучшить разрешение веществ с неразрешенными пиками и существенно сократить время анализа, поэтому контроль температуры колонки важен для оптимизации анализа с использованием катионообменников.

Помимо того, что изменение температуры может влиять на разрешение, оно может влиять также и на порядок элюирования. Так, в работе [20] при температуре колонки ниже 50 °С этанол элюируется до ацетона и масляной кислоты, а при температуре выше 50 °С - после ацетона и масляной кислоты. Масляная кислота и ацетон совместно элюировались в виде одного пика, когда температура колонки была

установлена ниже 50°C. Сообщалось о разделении этих компонентов при низкой температуре колонки (15 °C), но с уширением пиков. При повышении температуры колонки до 80 °C порядок элюирования следующий: масляная кислота > ацетон > этанол. Это может быть связано с увеличением коэффициента диффузии масляной кислоты и ацетона при более высокой температуре, что снижает сопротивление массопереносу подвижной фазы. При более высоких температурах может также снижаться противодавление в колонке и, следовательно, может быть достигнута лучшая разрешающая способность. Температуры выше 80°C не тестировались, так как дальнейшее повышение температуры колонки могло привести к деградации стационарных фаз.

- **Возможность использования низкой температуры**

Несмотря на то, что предпочтительной считается повышенная температура, возможно определение и разделение веществ и при низких температурах.

В работе [21] была описана усовершенствованная методика разделения и количественного определения углеводов, спиртов и органических кислот в ферментационных смесях, метаболизируемых кишечной микрофлорой. Она была применена для изучения ферментации углеводов кишечной микрофлорой у детей в возрасте до 3 месяцев.

Подвижную фазу – серную кислоту 0,028 М (рН 1,5) - деоксигенировали при пониженном давлении в атмосфере азота. Скорость потока составляла 0,6 мл/мин, а температура колонки составляла **40 °C**. Образцы и стандарты вводили шприцем в объеме 10 мкл. Время выполнения составило 40 мин. Элюат детектировали последовательно с помощью ультрафиолетового детектора и рефрактометра.

В работе [22] изучали определения сахарозы, глюкозы и фруктозы в сырых клубнях *Solanum tuberosum* (картофеля) группы Phugeja. Хроматографический анализ проводили на колонке Aminex HPLX 87H при **18°C**, связанной с рефрактометром при 35°C. Элюент – 10 мМ серная кислота. Условия, установленные для метода, обеспечивали оптимальное разделение сахаров, лимонной и яблочной кислот с разрешающей способностью выше или равной единице.

1.4.5. Скорость подвижной фазы

Увеличение температуры колонки может улучшить разрешение, однако может привести к деградации стационарной фазы, поэтому важен поиск других возможностей улучшения разрешения.

В работе [20] одной из задач было сократить время анализа с улучшением разрешения масляной кислоты, ацетона и этанола и без изменения температуры колонки. Чтобы преодолеть эту проблему, скорость потока элюента была запрограммирована от 0,6 до 0,9 мл/мин. Программирование выполнялось в течение 27, 21, 18, 15 и 13 минут, в результате чего общее время анализа изменилось с 41,10 до 30,47, 25,82, 28,21, 28,13 и 26,31 минут соответственно без какого-либо дрейфа базовой линии. Наилучшее разрешение всех компонентов стандартной смеси было достигнуто при градиенте скорости потока от 0,6 до 0,9 мл/мин в течение 21 мин при общем времени анализа 25,82 мин.

Авторы утверждают, что это первое исследование, в котором общее время анализа было сокращено за счет увеличения разрешения пиков не с помощью изменения полярности подвижной фазы или температуры колонки, а с помощью медленного увеличения скорости потока во время анализа для достижения лучшего разделения.

1.4.6. Элюент

В то время как разбавленные неорганические кислоты, такие как серная кислота, используются для катионообменных смол в форме H^+ , деионизированная вода является предпочтительной подвижной фазой для катионообменных смол, содержащих металлы.

- **Влияние pH**

В работе [2] использовали разбавленную серную кислоту в качестве элюента для смолы в форме H^+ . Предварительные исследования показали, что изменение pH в пределах 1,8-2,3 мало влияет на времена удерживания большинства исследованных веществ, включая кислоты, альдегиды, кетоны, спирты и углеводы.

В работе [20] были опробованы различные концентрации серной кислоты в диапазоне от 1,25 до 8 мМ H_2SO_4 (в воде) для количественного определения основных

продуктов ферментации ацетоно-бутилового брожения (сахаров, летучих жирных кислот, ацетона, этанола и бутанола) с использованием ВЭЖХ. Максимальное разделение было достигнуто при использовании 5 мМ H_2SO_4 в качестве подвижной фазы. Авторами [20] было учтено влияние рН, однако его вклад на разделение веществ был незначительным по сравнению с влиянием температуры колонки.

- **Нестандартные элюенты**

Для разделения на катионообменных смолах чаще всего используют воду или разбавленную серную кислоту, но возможно также использование и других элюентов. В работе [28] была использована 1,6 мМ гептафтормасляная кислота. Был проведен анализ 11 соединений, которые могут встречаться в свежих или ферментированных огурцах: глюкоза, фруктоза, глицерин, этанол, 1-пропанол, яблочная кислота, янтарная кислота, молочная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота и масляная кислота. Эти соединения получилось разделить за 28 минут. Кондуктометрический детектор для определения органических кислот и импульсный амперометрический детектор для анализа сахаров и спиртов были соединены последовательно для анализа этих соединений без помех.

- **Органические модификаторы**

Удерживание можно регулировать добавлением органических модификаторов. Количество органического модификатора, которое можно добавить к подвижной фазе, ограничено, так как он вызывает изменение набухания матрицы носителя. Предпочтительным модификатором для сульфированных смол ПС/ДВБ является ацетонитрил и тетрагидрофуран (ТГФ).

ТГФ представляет собой органический модификатор, чья способность уменьшать хвост пиков и улучшать характеристики колонок на основе ПС/ДВБ признана для хроматографии с обращенной фазой. Благодаря своим свойствам набухания ТГФ может улучшить форму пика образца, поскольку диффузия аналита менее затруднена в набухшем полимере [24-26].

1.4.7. Сочетание нескольких параметров

В работе [27] с использованием метода ВЭЖХ с однократной инъекцией на катионообменной полимерной колонке в тандеме с двойной системой обнаружения, состоящей УФ-детектора и рефрактометра, были разделены более пятидесяти органических кислот, сахаров и спиртов. Разделение столь большого числа соединений стало возможным благодаря варьированию температуры и концентрации элюента.

Сначала водные стандарты веществ хроматографировали по отдельности для определения их времен удерживания, а затем проводили исследования с участием смесей стандартов, которые распределяли при различных температурах и комбинациях ионной силы, чтобы максимизировать разрешение пиков и минимизировать интерференцию. Когда присутствовала фруктоза в отсутствие галактозы и молочной кислоты, оптимальное разрешение было получено при концентрации подвижной фазы 0,0065 М H₂SO₄ при температуре колонки 25°C. Нагрев колонки до 55°C позволил разделить молочную и янтарную кислоты при двух различных концентрациях подвижной фазы (0,0065 М H₂SO₄ и 0,0080 М) с помощью системы УФ-детектирования. Лактоза, лимонная кислота, яблочная кислота, галактоза, метанол, пропионовая кислота, этанол и изомасляная кислота обнаруживались при 0,0065 М. Используя ту же температуру, но 0,0080 М H₂SO₄, яблочную кислоту, галактозу, метанол, пропионовую кислоту, этанол и изомасляную кислоту совместно разделяли с использованием рефрактометра. Время анализа составило 45 минут.

1.5. Применение катионообменников в аналитической практике

- Лесохимия

Содержание гемицеллюлозы - растительных гомо- и гетерополисахаридов с меньшей, чем у целлюлозы, молекулярной массой, состоящие из остатков разных пентоз и гексоз- является фактором, влияющим на характеристики химической целлюлозы. Общее содержание сахара имеет важное значение в некоторых лесохимических продуктах. Следовательно, необходим надежный метод разделения и количественного определения древесных сахаров. В течение многих лет рутинно использовалась нисходящая бумажная хроматография [28]. Пять древесных сахаров (глюкоза, манноза, галактоза, арабиноза и ксилоза) могут быть определены в любом

соотношении в различных образцах путем применения спектроскопии диффузного отражения. Основным недостатком метода является длительность анализа. Линейный диапазон зависимости «концентрация сахаров — коэффициент отражения» узок, поэтому невозможно исследование соединений с высокой концентрацией. Необходимость повторного хроматографирования для разбавленных образцов увеличивает время анализа до 4 или 5 дней.

ВЭЖХ позволяет анализировать те же сахара, но быстрее и для больших концентраций. Для разделения древесных сахаров используют колонки для анализа углеводов на основе смолы от Bio-Rad Laboratories [29].

В работе [30] разделение древесных сахаров проводили изократически со скоростью 0,6 мл/мин, используя в качестве элюента фильтрованную, дистиллированную, дегазированную воду. Колонку нагревали до 85°C для максимальной эффективности. Для анализа гемицеллюлозы, оставшейся в целлюлозе, целлюлозу гидролизовали в две стадии с использованием серной кислоты.

Начальная работа была выполнена с помощью колонки для анализа углеводов Aminex HPLC-85P. Порядок элюирования сахаров получился следующим: глюкоза, ксилоза, галактоза, арабиноза, манноза. Для модельной смеси при одинаковой концентрации сахаров пики имели плохое разрешения, но количественное определение было возможно. Однако при анализе гидролизата целлюлозы пик ксилозы терялся в большом пике глюкозы из-за того, что соотношение глюкозы к ксилозе в этом образце составляет приблизительно 100:1.

В Bio-Rad была изготовлена экспериментальная колонка Aminex HPLC-87P для анализа углеводов, оптимизированная для разделения глюкозы и ксилозы (Г/Кс). Она была изготовлена специально для этой работы и отличается от колонки HPLC-85P размером частиц смолы и ионной формой. Размер частиц катионообменной смолы полистирол/дивинилбензол был уменьшен с 13 до 9 мкм для повышения эффективности колонки. Ионная форма смолы также была оптимизирована для наилучшего разделения глюкозы и ксилозы. На колонке HPLC-87P (Г/Кс) стало возможно разделять глюкозу, ксилозу и галактозу при любом соотношении. Однако многие образцы содержат арабинозу и маннозу в соотношении 1:100, и эти два сахара

при таком соотношении не были разделены ни на одной из колонок. Арабиноза терялась в большом пике маннозы.

Для решения этой проблемы была создана колонка НРХ-87Р (А/М), оптимизированная для разделения арабинозы/маннозы. Комбинация колонок НРХ-87Р (Г/Кс) и НРХ-87Р (А/М) позволяет определять все 5 древесных сахаров в любом соотношении в продуктах лесохимии.

- Молочные продукты

Для созревания сыра очень важно выделение сахаров и органических кислот. Фактически они прямо или косвенно определяют химический состав, а также органолептические характеристики, а значит, и качество. Основной проблемой при одновременном определении кислот и сахаров в молочных продуктах является плохое разрешение пиков лимонной и оротовой кислот, лактозы и лимонной кислот, а также мочевой и муравьиной кислот [31-34].

Работа [35] посвящена определению углеводов и органических кислот для того, чтобы можно оценить развитие микробного брожения и одновременно степень созревания сыра. Сахара (лактоза, глюкоза и галактоза), нелетучие кислоты (лимонная, оротовая, пировиноградная, молочная, оссаловая и гиппуровая), некоторые свободные жирные кислоты (муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, изомаляновая, валериановая и изовалериановая), диацетил и ацетоин разделяли на колонке Aminex НРХ-87Н с использованием простого метода изократической ВЭЖХ и идентифицировали по временам удерживания с помощью детектора ультрафиолетового излучения и рефрактометра.

Анализы проводились изократически при 0,8 мл/мин и 65°C на катионообменной колонке (Aminex НРХ-87Н) с внутренним диаметром 300×7,8 мм. Подвижная фаза представляла собой 0,013 М Н₂SO₄, полученную путем разбавления серной кислоты дистиллированной водой, фильтрации через мембранный фильтр 0,45 мкм и дегазации под вакуумом.

Время анализа составило всего 30 минут, а давление в системе было очень низкое (60 фунтов на кв. дюйм). С этой колонкой и 0,013 М Н₂SO₄ в качестве подвижной фазы разрешение пиков было улучшено, что позволило напрямую

определять сахара, кислоты, диацетил и ацетоин с помощью УФ-детектора и рефрактометрического детектора.

- Энология

В энологии (науке о виноделии) определение макросоединений, таких как карбоновые кислоты, сахара и спирты, требуется для оценки качества и характеристики сусле и вин. Из-за явления эксклюзии ионов порядок элюирования различных кислот в значительной степени зависит от их рКа, причем более сильные аналиты элюируются раньше более слабых. Кроме того, для нейтральных или неполярных веществ могут происходить гидрофобные взаимодействия со стационарной фазой, что приводит к модификации предсказуемого времени элюирования и большему уширению хроматографического пика, а также появлению его хвоста. Этот факт отражается в плохом разрешении таких соединений, как яблочная кислота и фруктоза или молочная и фумаровая кислоты. Более того, янтарная и шикимовая кислоты полностью не разрешаются.

В работе [36] удалось одновременного количественно определить основные карбоновые кислоты (включая лимонную, винную, яблочную, шикимовую, янтарную, молочную, фумаровую и уксусную кислоты), сахара (глюкозу и фруктозу) и спирты (глицерин и этанол) в виноградном сусле и вине. Также улучшенное разделение соэлюирующихся соединений (например, фруктозы по сравнению с яблочной кислотой и янтарной по сравнению с шикимовой кислотой) достигается умеренным добавлением ТГФ (4%) или н-пропилового спирта (5%) в качестве органического модификатора в подвижной фазе.

- Пивоварение

В продуктах пивоварения могут содержаться индивидуальные олигосахариды (СП4 - СП13), а также ферментируемые сахара, такие как мальтотриоза (трисахариды), мальтоза (дисахариды), глюкоза и фруктоза. В работе [37] анализировали ячмень, солод, хмель, торрефицированную пшеницу, пивоваренный сироп, сусле и пиво на трех различных колонках с чистой водой в качестве элюента.

Использование колонки Aminex HPX-87 является экспрессным способом и рекомендуется для общего применения при анализе углеводов, глицерина и этанола в пивоваренных субстратах.

Колонка Dextropak представляет собой еще один экспресс-метод, особенно полезный для определения СПЗ и более высоких олигосахаридов. Его недостатки заключаются в том, что анализ полисахаридов свыше СП5 невозможен, а ферментируемые сахара плохо растворяются. Эта колонка не так универсальна в использовании, как Aminex HPX-87.

На колонке Aminex HPX-42 возможно определение ферментируемых сахаров, как и на колонке Aminex HPX-87. Кроме того, она лучше разделяет неферментируемые углеводы, чем Aminex HPX-87 (хотя разделение не так хорошо, как при использовании Dextropak). Aminex HPX-42 рекомендуется использовать, когда содержание СПЗ представляет особый интерес (например, при окончательном брожении пива).

1.6. Выводы из обзора литературы

- Катионообменные смолы на основе ПС/ДВБ применяют для анализа органических соединений в различных областях исследований.
- С катионообменными смолами в протонированных формах или формах с ионами металлов могут быть одновременно эффективны несколько механизмов удерживания.
- Катионообменные смолы, содержащие Ca^{2+} или Pb^{2+} , применяют для разделения моно- и олигосахаридов, а также для анализа продуктов разложения сахара; для анализа олигосахаридов Ag^+ является предпочтительным противоионом.
- Колонки, заполненные сульфированными смолами ПС/ДВБ, требуют работы при высоких температурах (обычно в диапазоне 80-90°C) для оптимальной эффективности.
- Наибольший интерес представляют катионообменные смолы со степенью сшивки 4-12 %.

- В то время как разбавленные неорганические кислоты, такие как серная кислота, используются для катионообменных смол в форме H^+ , деионизированная вода является предпочтительной подвижной фазой для катионообменных смол, содержащих металлы.

2. Экспериментальная часть

2.1. Используемые реактивы и аппаратура:

Если не указано иное, использовали стандарты соединений для хроматографии марки Реахим (Россия, хч): деионизованная вода (Портлаб, Россия), серная кислота (Уралхиминвест, Россия), глицерин, метанол (Merck, Германия, $\geq 99.97\%$), этанол (Ферейн, Россия, $\geq 95\%$), пропанол-1, изопропанол для хроматографии (LiChrosolv, Германия, $\geq 99.9\%$), бутанол-1, втор-бутанол, трет-бутанол, изобутанол, этандиол-1,2 (Fluca, Switzerland, $\geq 99\%$), пропандиол-1,2, пропандиол-1,3, бутандиол-1,3, бутандиол-1,4, ацетон, метилэтилкетон, диэтилкетон (Sigma-Aldrich, США, $\geq 99\%$), метилбутилкетон, метилизобутилкетон, формальдегид, ацетальдегид, бутаналь, пентаналь, арабиноза, мальтоза, ксилоза (Merck, Германия, $\geq 99.97\%$), рамноза, лактоза, глюкоза, мальтотриоза, фруктоза, манноза, галактоза, щавелевая к-та, винная к-та, глиоксиловая к-та (Sigma-Aldrich, США, $\geq 99\%$), гликолевая к-та (Sigma-Aldrich, США, $\geq 99\%$), молочная к-та (Союз Реактив, Россия, $\geq 95\%$), муравьиная к-та, уксусная к-та, пропионовая к-та (Кемикал Лайн, Россия, $\geq 99.5\%$), иннозит, маннит, дульцит, сорбит, эритрит (ООО «DopDrops»), сукралоза (ООО «Spirulina Food»), коммерческий продукт: сахарозаменитель «Fit Parad».

Эксперименты проводились на жидкостном хроматографе «Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014», снабженном вакуумном дегазатором, градиентным насосом, термостатом колонок и рефрактометрическим детектором. Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программы «Хроматэк Аналитик» версии 3.1.

Колонка:

- Длина: 250 мм
- Внутренний диаметр: 4,6 мм
- Материал: нержавеющей сталь

Сорбент:

- Сульфированный ПС/ДВБ в H^+ -форме
- Компания: «БиоХиммак СТ», Москва
- Степень сшивки: 8 вес. %
- Размер частиц: 10 мкм

- Весовая емкость сульфокислых групп: 4.6-5.0 мэкв/г
- Объемная емкость: 1.6-2.0 мэкв/мл
- Влажность: 44-48 вес. %
- Интервал pH: 0-14

2.2. Набивка колонки

Использовали 27 мл аликвоты 10% суспензии катионообменной смолы ПС/ДВБ в растворе, содержащем 20% 0.2 М ацетате аммония и 80% метанола. Заполнение колонки проводили при постоянной скорости потока 1 мл/мин с тем же раствором ацетата аммония и метанола в качестве элюента.

2.3. Методика эксперимента

В качестве подвижной фазы использовали раствор 0,005 М серной кислоты. Подвижную фазу, используемую для работы, готовили путем смешивания 0,05 М серной кислоты с деионизованной водой. Также для дегазации подвижной фазы использовали ультразвук. Скорость подвижной фазы 0,1 мл/мин. При большей скорости давление превышает 10 МПа, что является максимальным давлением для данного сорбента. Объем каждой введенной пробы составлял 20 мкл. Температура колонки составляла 80 °С, температура рефрактометра 35 °С.

Перед каждым введением раствора в хроматограф, шприц промывали соответствующим раствором 3 раза, а затем 20 мкл раствора вводили в хроматограф через 6-ходовой кран. После этого анализ и обработка образцов проводилась с помощью программного обеспечения «Хроматек Аналитик 3.1».

Растворы углеводов и альдитов готовили путем растворения точных навесок чистых веществ; растворы одноатомных спиртов, диолов, кислот, альдегидов и кетонов готовили разбавлением их концентрированных растворов. Измерения проводили на аналитических весах с точностью до $\pm 0,0002$ г. В качестве растворителя использовали деионизованную воду. Растворы готовили в виалах объемом 1,5 мл или колбах объемом 25 мл. При неполном растворении навески растворы обрабатывали на ультразвуковой ванне. Все исходные концентрированные растворы хранили при +4°C. Концентрации рабочих растворов индивидуальных соединений составили 2 мг/мл для

углеводов и альдитов, 1 мг/мл для диолов и 0,05 мг/мл для кислот, спиртов, альдегидов и кетонов. Растворы смесей соединений готовили исходя из отклика детектора, добиваясь сопоставимых высот пиков. Концентрации веществ в смеси составляли: углеводы – 1 мг/мл, кислоты – 0,01 мг/мл, кетоны – 0,05 мг/мл, спирты – 0,05 мг/мл.

Для определения низкого содержания сукралозы в комбинированном подсластителе на основе эритрита «Fit Parad» был использован способ стандартных добавок.

Для этого в виале вместимостью 12 мл на аналитических весах взвешивали 2 г исследуемого образца. В виалу с навеской добавляли 10 мл деионизированной воды, закрывали крышкой и тщательно перемешивали в течении нескольких минут. Далее обрабатывали в УЗВ в течение 5 мин. Затем пять виал, вместимостью 1,5 мл, наполняли 250 мкл полученного раствора, вносили 0, 25, 50, 100, 250 мкл стандартного раствора сукралозы с концентрацией 2 мг/мл, и доводили водой до объема 500 мкл. Полученные растворы до анализа хранили в холодильнике при +4-6 °С.

2.4. Исследование поверхности сорбента

Изучение морфологии поверхности сорбента /сульфированный ПС/ДВБ в Н⁺-форме/ проводили методом СЭМ на электронном микроскопе Hitachi Tabletop Microscope TM3030Plus (Hitachi, Japan) с напряжением 15 кВ на ускоряющем электроде.

По данным СЭМ получено, что данная фракция сорбента однородна по размеру и представлена сферическими моночастицами с диаметром 10 мкм (рис.6).

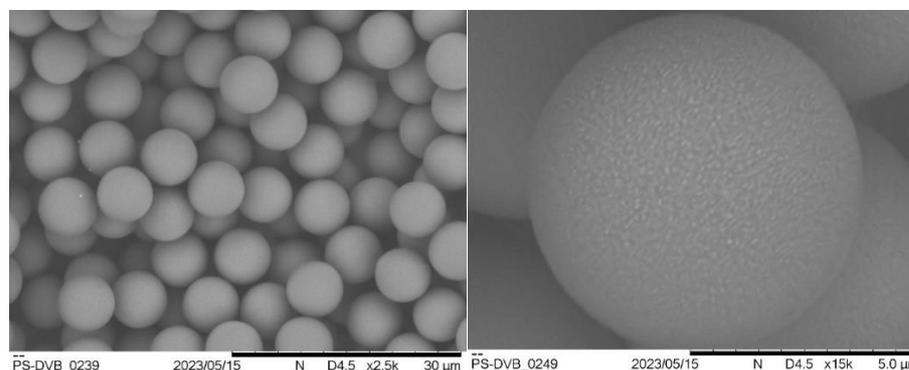
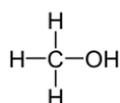


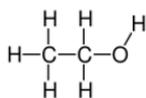
Рис. 6. Фотография катионообменника, полученная с помощью СЭМ при различных увеличениях.

2.5. Структурные формулы тестовых аналитов

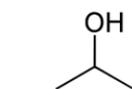
- Одноатомные спирты



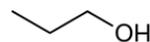
метанол



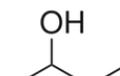
этанол



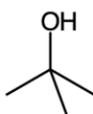
изопропанол



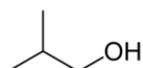
пропанол-1



изобутанол



трет-бутанол

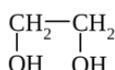


втор-бутанол

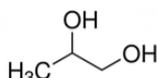


бутанол-1

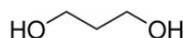
- Диолы



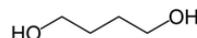
этандиол-1,2



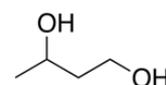
пропандиол-1,2



пропандиол-1,3

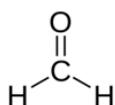


бутандиол-1,4

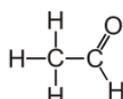


бутандиол-1,3

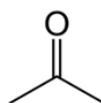
- Альдегиды и кетоны



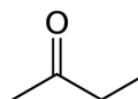
формальдегид



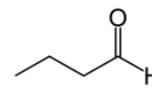
ацетальдегид



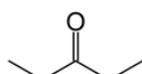
ацетон



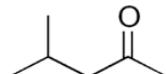
метилэтилкетон



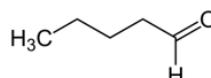
бутаналь



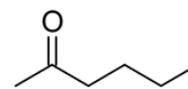
диэтилкетон



метилизобутилкетон

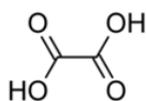


пентаналь

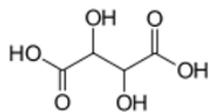


метилбутилкетон

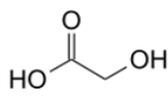
• Кислоты



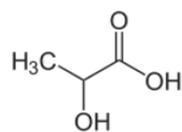
щавелевая



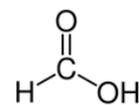
винная



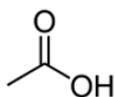
молочная



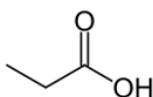
гликолевая



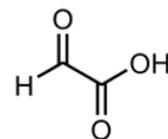
муравьиная



уксусная

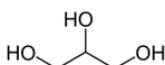


пропионовая

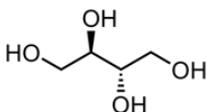


глиоксильная

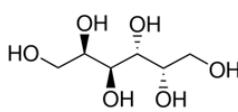
• Альдиты



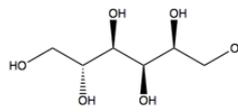
глицерин



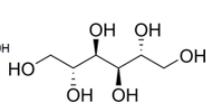
эритрит



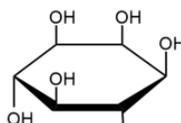
дульцит



сорбит

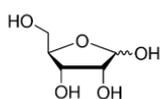


маннит

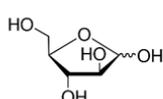


иннозит

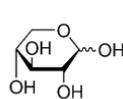
• Углеводы



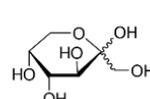
рибоза



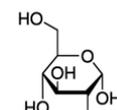
арабиноза



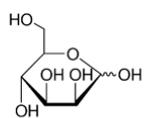
ксилоза



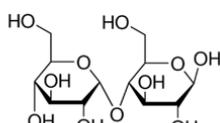
фруктоза



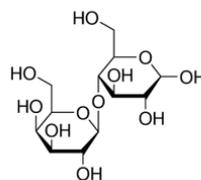
глюкоза



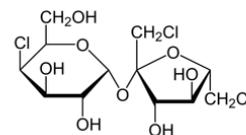
манноза



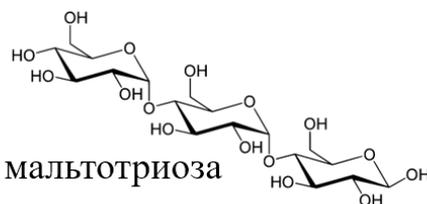
мальтоза



лактоза



сукралоза



мальтотриоза

3. Обсуждение результатов

3.1. Изучение хроматографического удерживания органических веществ

3.1.1. Изучение хроматографического удерживания одноатомных спиртов

Было изучено хроматографическое удерживание восьми одноатомных спиртов: метанола, этанола, изопропанола, трет-бутанола, пропанола-1, втор-бутанола, изобутанола, бутанола-1. По каждой из полученных хроматограмм рассчитаны фактор удерживания (k') и эффективность хроматографического разделения (N). Рассчитанные значения, а также времена удерживания (t_R), площадь (S), высота (h) и ширина (W) пиков приведены в табл. 1.

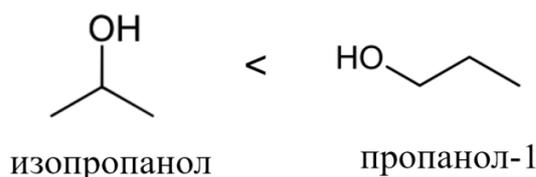
Мертвое время составляет 7.7 минут, оно было определено по времени удерживания серной кислоты. По механизму эксклюзии ионов, полностью диссоциированные сильные кислоты отталкиваются электростатически. Как следствие, они элюируются неразделенными в мертвом объеме колонки. В дальнейшем это не будет указываться.

Таблица 1. Хроматографические характеристики одноатомных спиртов.

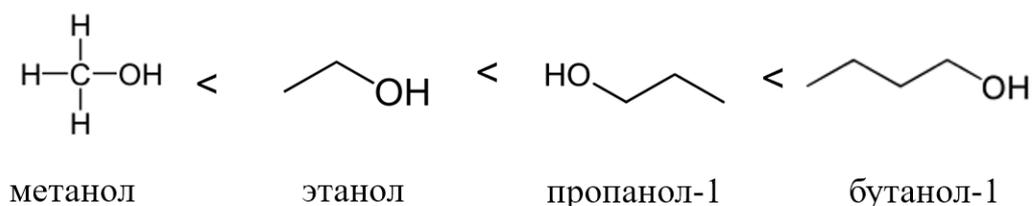
Спирты, 0,05 мг/мл						
Соединение	t_R , мин	S	h	W , мин	k'	N , тт/м
Метанол	30.54	5961	42	2.34	2.97	3790
Этанол	34.84	11921	74	2.60	3.52	3970
Изопропанол	38.69	12251	71	2.92	4.02	3880
Трет-бутанол	41.10	14552	82	2.58	4.34	5470
Пропанол-1	44.33	12097	60	3.13	4.76	1110
Втор-бутанол	51.33	18344	84	3.21	5.67	5670
Изобутанол	54.07	16083	69	3.68	6.02	4790
Бутанол-1	61.04	16008	59	4.41	6.93	4250

Исходя из полученных хроматографических характеристик можно выявить следующие закономерности удерживания одноатомных спиртов:

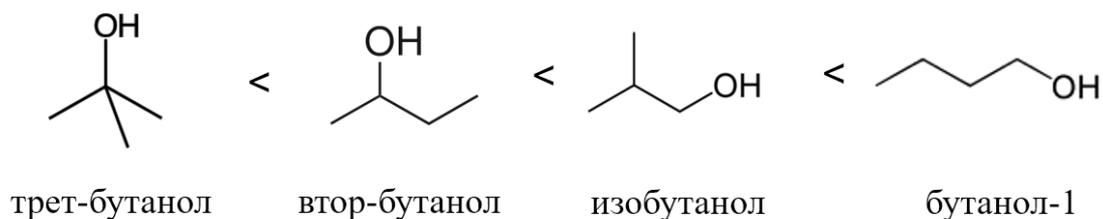
- ❖ Соединения, содержащие концевую функциональную группу, имеют большее время удерживания, чем вторичные или третичные изомеры. Такое влияние на порядок элюирования демонстрируют, например, пропанол-1 и его вторичный изомер изопропанол.



- ❖ Увеличение времени удерживания с увеличением длины цепи, наблюдаемое для линейных спиртов, обусловлено обращенно-фазовым механизмом. Такое влияние на порядок элюирования демонстрируют, например, метанол, этанол, пропанол-1 и бутанол-1.



- ❖ Соединения с разветвленной цепью имеют более короткое время удерживания, чем соответствующие изомеры с прямой цепью. Такое влияние на порядок элюирования демонстрируют изомеры бутанола: трет-бутанол, втор-бутанол, изобутанол, бутанол-1.



В ходе проведенного исследования удалось разделить модельную смесь спиртов, состоящую из глицерина и пяти одноатомных спиртов: метанола, изопропанола, пропанола-1, втор-бутанола, бутанола-1. Время анализа составило 65 минут. Полученная хроматограмма представлена на рис. 7.

Отрицательные пики на седьмой и тридцать четвертой минуте являются систематическими, присутствуют на всех хроматограммах и возникают в результате того, что проба растворена в воде, а не в подвижной фазе.

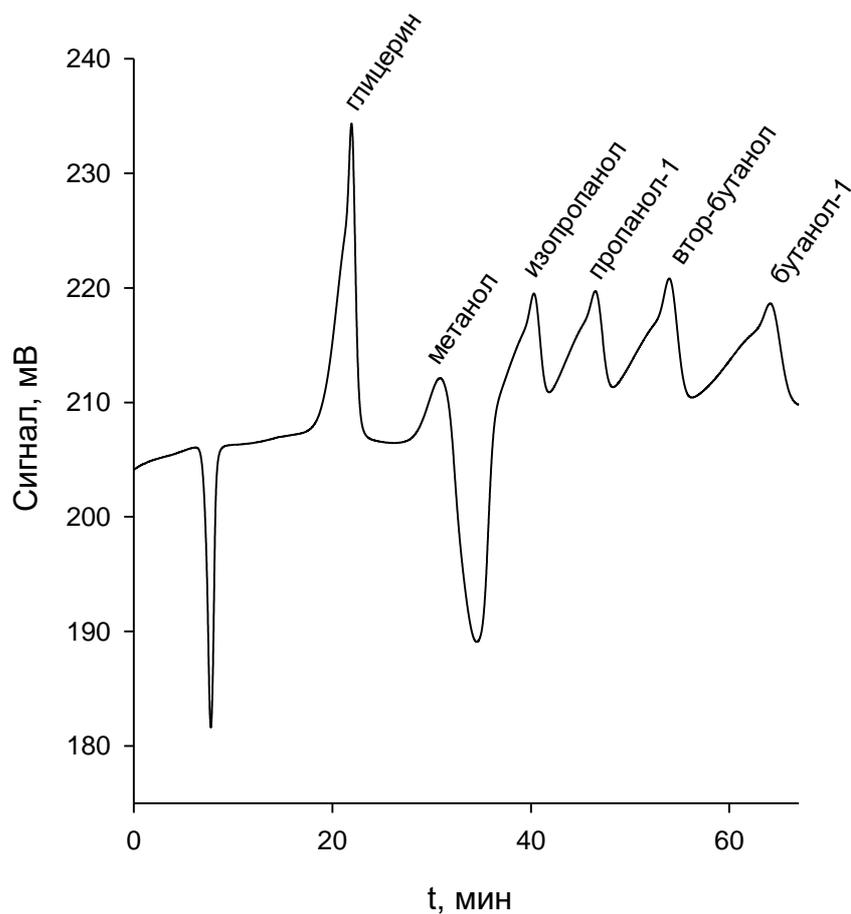


Рис. 7. Хроматограмма разделения модельной смеси спиртов с концентрацией 0,05 мг/мл: глицерин, метанол, изопропанол, пропанол-1, втор-бутанол, бутанол-1. Хроматографические условия: температура колонки – 80°C, ПФ – разб. серная кислота (5 мМ), скорость потока – 0,1 мл/мин, детектор – рефрактометр.

Для модельной смеси одноатомных спиртов рассчитаны эффективность хроматографического разделения (N), разрешение (R_s) и асимметрия (A_s), полученные значения приведены в табл.2.

Таблица 2. Хроматографические параметры модельной смеси одноатомных спиртов и глицерина.

Соединение	N, тт/м	R _s	A _s
Глицерин	3830	2.56	0.28
Метанол	3560	2.35	0.41
Изопропанол	6750	1.43	0.39
Пропанол-1	6100	1.45	0.35
Втор-бутанол	6110	1.51	0.29
Бутанол-1	4180	-	0.28

3.1.2. Изучение хроматографического удерживания диолов

Было изучено хроматографическое удерживание диолов: этандиол-1,2, пропандиол-1,2, пропандиол-1,3, бутандиол-1,3, бутандиол-1,4. По каждой из полученных хроматограмм рассчитаны фактор удерживания (k') и эффективность хроматографического разделения (N). Рассчитанные значения, а также времена удерживания (t_R), площадь (S), высота (h) и ширина (W) пиков приведены в табл.3.

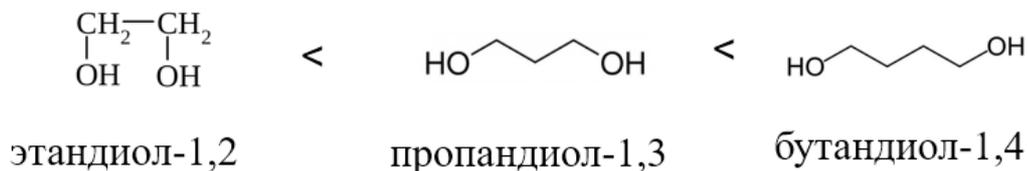
Таблица 3. Хроматографические характеристики диолов.

Диолы, 1 мг/мл						
Соединение	t_R , min	S	h	W, min	k'	N, тт/м
Этандиол-1,2	26.91	1229	10	1.96	2.50	3520
Пропандиол-1,2	28.78	1243	10	1.10	2.74	3280
Пропандиол-1,3	29.15	909	7	1.92	2.79	3180
Бутандиол-1,3	31.94	1198	9	1.84	3.15	3960
Бутандиол-1,4	35.72	702	6	1.92	3.64	6340

Исходя из полученных хроматографических характеристик можно выявить следующие закономерности удерживания диолов:

- ❖ Увеличение времени удерживания с увеличением длины цепи, наблюдаемое для линейных спиртов, обусловленное обращенно-фазовым механизмом. Такое

влияние на порядок элюирования демонстрируют этандиол-1,2 < изомеры пропандиола < изомеры бутандиола.



3.1.3. Изучение хроматографического удерживания альдегидов и кетонов

Было изучено хроматографическое удерживание пяти кетонов: ацетон, метилэтилкетон, диэтилкетон, метилизобутилкетон, метилбутилкетон; и четырех альдегидов: формальдегид, ацетальдегид, бутаналь, пентаналь. По каждой из полученных хроматограмм рассчитаны фактор удерживания (k') и эффективность хроматографического разделения (N). Рассчитанные значения, а также времена удерживания (t_R), площадь (S), высота (h) и ширина (W) пиков приведены в табл.4. для кетонов и табл.5 для альдегидов.

Таблица 4. Хроматографические характеристики кетонов.

Кетоны, 0,05 мг/мл						
Соединение	t_R , мин	S	h	W , мин	k'	N , тт/м
Ацетон	35.48	8019	57	2.17	3.61	5940
Метилэтилкетон	45.12	12966	64	3.24	4.86	4290
Диэтилкетон	59.58	14073	55	3.72	6.74	5680
Метилизобутилкетон	70.27	13132	45	3.69	8.13	8020
Метилбутилкетон	84.65	14314	39	4.90	9.99	6610

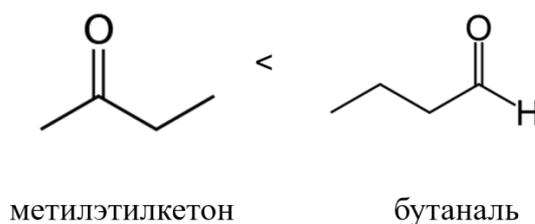
Таблица 5. Хроматографические характеристики альдегидов.

Альдегиды 0.05 мг/мл						
Соединение	t _R , мин	S	h	W, мин	k'	N, тт/м
Формальдегид 1	23.14	19176	168	1.81	2.01	3630
Формальдегид 2	31.130	816	6	2.22	3.04	4430
Ацетальдегид 1	25.89	11096	97	1.75	2.36	4880
Ацетальдегид 2	31.440	8750	59	2.45	3.08	3630
Бутаналь 1	39.38	221	3	2.13	4.11	7430
Бутаналь 2	53.19	2680	10	5.26	5.91	2270
Пентаналь 1	45.54	1135	6	2.20	4.91	9450
Пентаналь 2	65.34	3029	11	3.82	7.49	6470

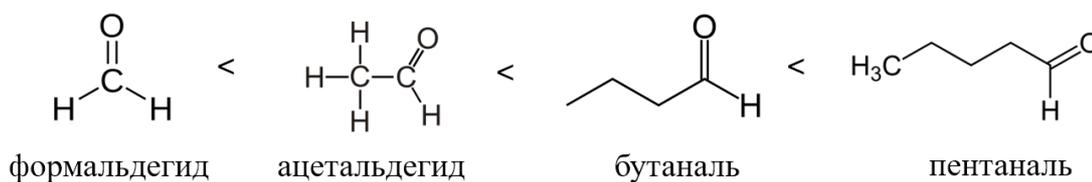
1 – Гидратированная, 2 – Негидратированная формы альдегидов.

Исходя из полученных хроматографических характеристик можно выявить следующие закономерности удерживания альдегидов и кетонов:

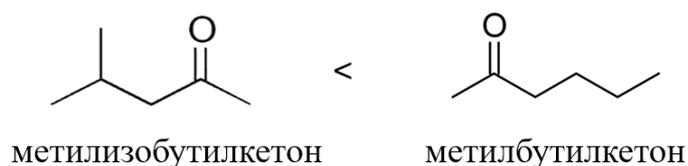
- ❖ Альдегиды имеют большее значения времен удерживания, чем соответствующие кетоны с той же длиной цепи. Например, метилэтилкетон элюируется раньше, чем бутаналь.



- ❖ Увеличение времени удерживания с увеличением длины цепи, наблюдаемое для линейных альдегидов и кетонов, обусловленное обращенно-фазовым механизмом. Так, порядок элюирования альдегидов следующий: формальдегид, ацетальдегид, бутаналь, пентаналь.



- ❖ Соединения с разветвленной цепью имеют более короткое время удерживания, чем соответствующие изомеры с прямой цепью. Такое влияние на порядок элюирования демонстрируют метилизобутилкетон и метилбутилкетон.



На основе полученных данных хроматографического исследования растворов индивидуальных соединений удалось разделить модельную смесь, состоящую из пяти кетонов. Время анализа составило 90 минут. Полученная хроматограмма представлена на рис. 8.

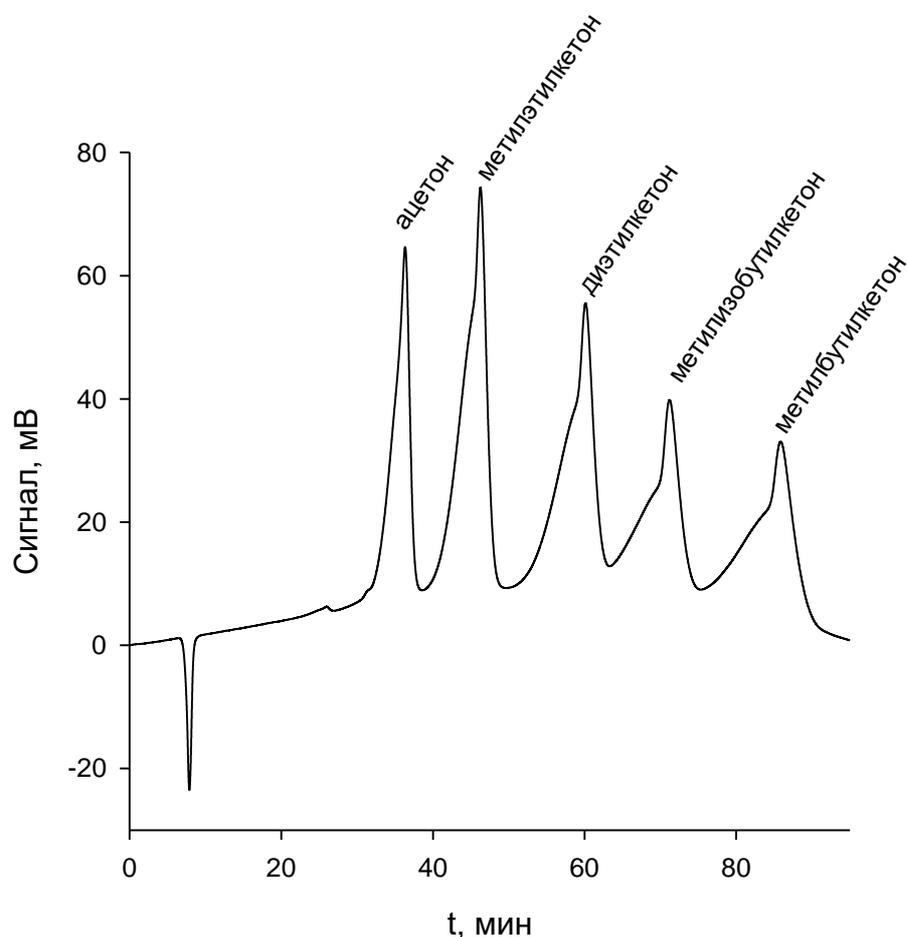


Рис. 8. Хроматограмма разделения модельной смеси кетонов с концентрацией 0,05 мг/мл: ацетон, метилэтилкетон, диэтилкетон, метилизобутилкетон,

метилбутилкетон. Хроматографические условия: температура колонки – 80°C, ПФ – разб. серная кислота (5 мМ), скорость потока – 0,1 мл/мин, детектор – рефрактометр.

Для модельной смеси кетонов на основе экспериментальных данных рассчитаны эффективность хроматографического разделения (N), разрешение (R_s) и асимметрия (A_s). Полученные значения приведены в табл.6.

Таблица 6. Хроматографические параметры модельной смеси кетонов.

Соединение	N , тт/м	R_s	A_s
Ацетон	1620	2.27	0.42
Метилэтилкетон	1290	2.60	0.41
Диэтилкетон	1900	2.19	0.51
Метиизобутилкетон	3760	2.46	0.58
Метилбутилкетон	2220	-	0.65

Для каждого из исследуемых индивидуальных растворов альдегидов на хроматограмме присутствуют два пика, что не позволяет полностью разделить смесь рассматриваемых альдегидов. Хроматограмма ацетальдегида приведена на рис. 9.

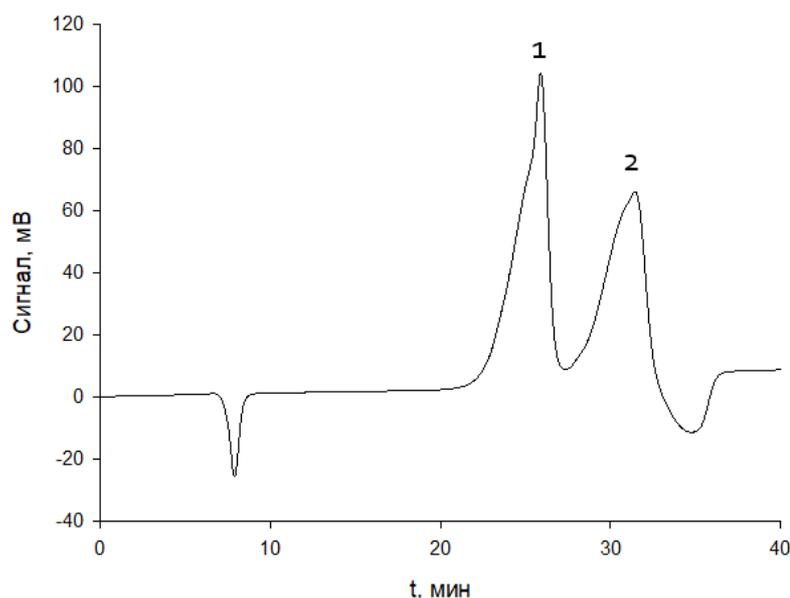


Рис. 9. Хроматограмма ацетальдегида с концентрацией 0.05 мг/мл. 1 – гидратированная, 2 – негидратированная формы ацетальдегида. Хроматографические

условия: температура колонки – 80°C, ПФ – разб. серная кислота (5 мМ), скорость потока – 0,1 мл/мин, детектор – рефрактометр.

Можно предположить, что наличие двух пиков (рис.9) обусловлено явлением гидратации карбоксильных соединений. Гидроксильная группа молекулы воды присоединяется к основному атому углерода, а протон - к атому кислорода, как показано ниже для гидратации формальдегида на рис. 10. Реакционная способность в таких реакциях уменьшается от альдегидов к кетонам, что объясняет одинарный пик в случае последних [37].

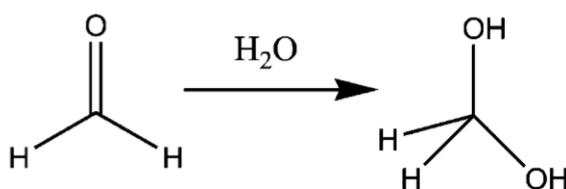


Рис. 10. Гидратация формальдегида [38].

Для того, чтобы подтвердить данное предположение было найдено процентное содержание гидратированной формы по площадям двух пиков и проведено сравнение с литературными данными.

Бутаналь был исключен из сравнения так как один из пиков попал на отрицательный систематический пик из-за чего его площадь не может быть рассчитана верно.

Таблица 7. Процентные содержания гидратированной формы альдегидов, полученные в результате эксперимента и приведенные в литературе.

Вещество	Рассчитанные значения	Литературные данные [39]
Формальдегид	99.96%	≈100%
Ацетальдегид	55.91%	≈58%
Пентаналь	27,25%	≈30%

Сравнение показало, что наличие двух пиков на хроматограммах альдегидов действительно возникает из-за процесса гидратации.

3.1.4. Изучение хроматографического удерживания кислот

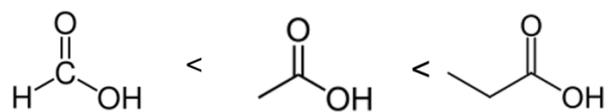
Было изучено хроматографическое удерживание органических кислот: щавелевой, винной, глиоксиловой, гликолевой, молочной, муравьиной, уксусной, пропионовой. По каждой из полученных хроматограмм рассчитаны фактор удерживания (k') и эффективность хроматографического разделения (N). Рассчитанные значения, а также времена удерживания (t_R), площадь (S), высота (h) и ширина (W) пиков приведены в табл. 8.

Таблица 8. Хроматографические характеристики кислот.

Кислоты, 0,5 мг/мл						
Соединение	t_R , мин	S	h	W , мин	k'	N , тт/м
Щавелевая	8.87	21	0.6	0.53	0.15	6120
Винная	14.28	83	1.1	1.30	0.85	2670
Глиоксиловая	16.57	34860	416	1.28	1.15	3690
Гликолевая	21.56	20897	173	1.83	1.80	2220
Молочная	22.06	25085	193	2.10	1.86	2440
Муравьиная	24.16	14410	105	2.28	2.14	2480
Уксусная	25.97	22367	180	1.90	2.37	4150
Пропионовая	31.10	17486	120	2.25	3.04	4230

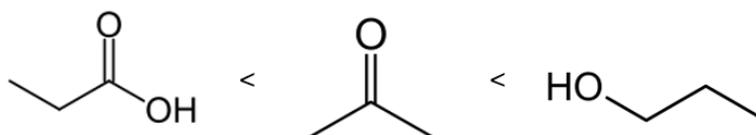
Исходя из полученных хроматографических характеристик можно выявить следующие закономерности удерживания кислот:

- ❖ Время удерживания кислот зависит от pK_a . С увеличением силы кислоты значение времени удерживания уменьшается. При одинаковой pK_a время удерживания кислот зависит от их параметра гидрофобности ($\log P$), что согласуется со значениями pK_a и $\log P$ кислот, приведенных в табл. 9.
- ❖ Увеличение времени удерживания с увеличением длины цепи, наблюдаемое для линейных кислот, обусловленное обращенно-фазовым механизмом. Так, порядок элюирования следующий: муравьиная, уксусная, пропионовая кислоты.



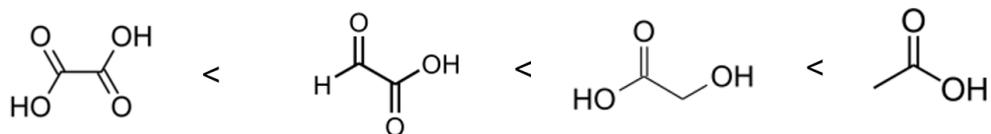
муравьиная уксусная пропионовая

- ❖ Тип функциональной группы определяют факторы удерживания соединений с одинаковой длиной цепи. Порядок элюирования $\text{RCOOH} < \text{RCHO/RCOR}' < \text{ROH}$ наглядно демонстрирует, например, ряд пропионовая кислота < ацетон < изомеры пропанола.



пропионовая к-та ацетон пропанол

- ❖ Последовательность $\text{RCOOH} < \text{RCHO/RCOR}' < \text{ROH}$ остается неизменной при введении карбоксильной, карбонильной или гидроксильной группы в молекулу, уже содержащую определенную функциональность. Таким образом, когда уксусная кислота рассматривается как исходное вещество, применяется следующий порядок элюирования: щавелевая < глиоксиловая < гликолевая кислота.



щавелевая глиоксиловая гликолевая уксусная

Таблица 9. pKa и logP кислот

(рассчитано с помощью XLogP3 3.0)

Соединение	k'	pKa	logP
Щавелевая	0.15	1.25	-0.3
Винная	0.85	3.04	-1.9
Глиоксиловая	1.15	3.33	-0.3
Гликолевая	1.80	3.83	-1.1
Молочная	1.86	3.86	-0.7
Муравьиная	2.14	3.75	-0.4
Уксусная	2.37	4.76	-0.2
Пропионовая	3.04	4.87	0.3

Исходя из полученных хроматографических характеристик растворов индивидуальных соединений, удалось разделить смесь кислот, состоящую из четырех соединений: глиоксиловой, молочной, уксусной, пропионовой. Время анализа составило 40 минут. Полученная хроматограмма представлена на рис. 11.

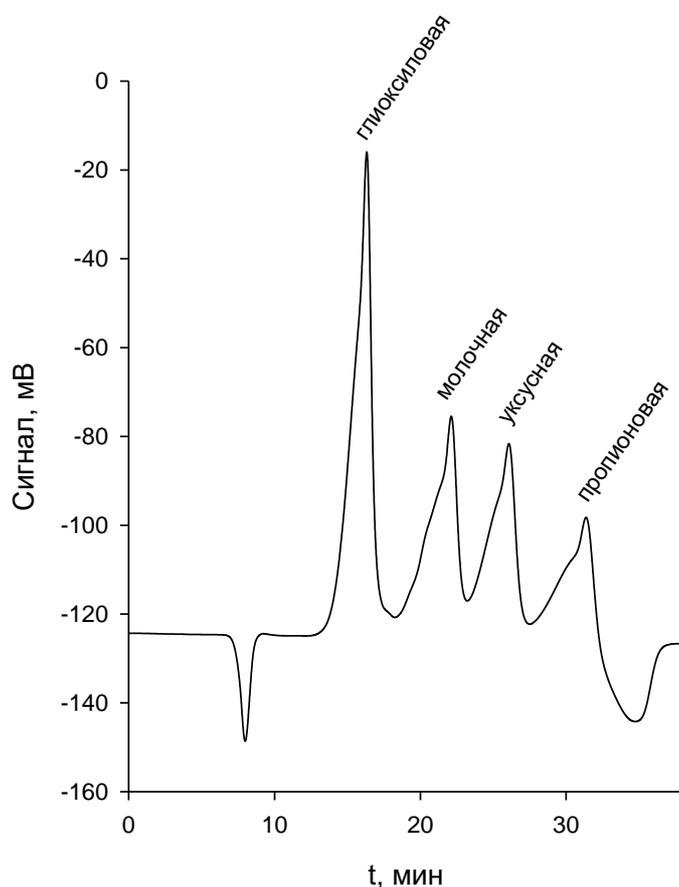


Рис. 11. Хроматограмма разделения модельной смеси кислот с концентрацией 0,01 мг/мл: глиоксиловой, молочной, уксусной, пропионовой. Хроматографические условия: температура колонки – 80 °С, ПФ – разб. серная кислота (5 мМ), скорость потока – 0,1 мл/мин, детектор – рефрактометр.

Для модельной смеси кислот рассчитаны эффективность хроматографического разделения (N), разрешение (R_s) и асимметрия (A_s). Полученные значения приведены в табл. 10.

Таблица 10. Хроматографические параметры модельной смеси кислот.

Соединение	N , тт/м	R_s	A_s
Глиоксиловая	3730	2.34	0.37
Молочная	3940	1.35	0.28
Уксусная	4740	1.60	0.30
Пропионовая	4830	-	0.21

3.1.5. Изучение хроматографического удерживания углеводов

Было изучено хроматографическое удерживание углеводов:

- трисахарид – мальтотриоза;
- дисахариды – мальтоза, лактоза, сукралоза
- моносахариды – глюкоза, галактоза, манноза, ксилоза, фруктоза, рамноза, арабиноза.

По каждой из полученных хроматограмм рассчитаны фактор удерживания (k') и эффективность хроматографического разделения (N). Рассчитанные значения, а также времена удерживания (t_R), площадь (S), высота (h) и ширина (W) пиков приведены в табл. 11.

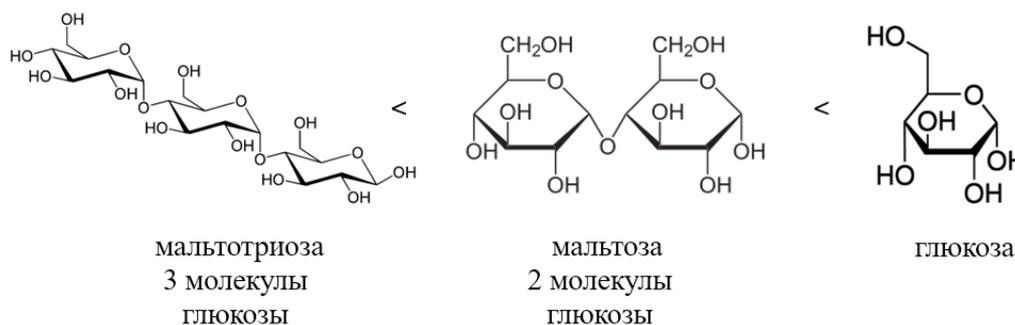
Таблица 11. Хроматографические характеристики углеводов.

Углеводы, 2 мг/мл						
Соединение	t_R , мин	S	h	W , мин	k'	N , тг/м
Мальтотриоза	9.80	3519	63	0.76	0.27	3710
Мальтоза	11.53	3506	53	0.81	0.50	4470
Лактоза	11.54	4012	64	0.78	0.50	4850
Глюкоза	15.41	4084	55	0.91	1.00	6400
Галактоза	16.30	3726	47	0.97	1.12	6320
Манноза	16.82	3624	45	0.98	1.18	3880
Ксилоза	16.85	4126	50	1.04	1.19	5780
Фруктоза	16.99	3854	48	0.99	1.21	6680
Рамноза	17.57	3256	39	1.01	1.28	6660
Арабиноза	18.53	4501	52	1.06	1.41	6790
Сукралоза	20.98	4032	27	2.14	1.53	2130

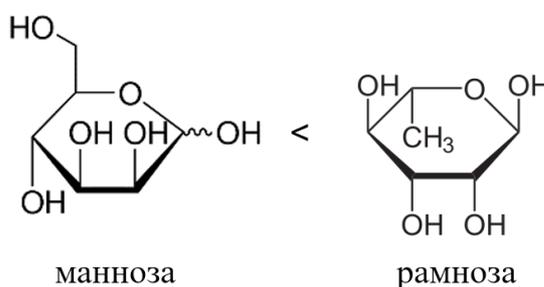
Исходя из полученных хроматографических характеристик, можно выявить следующие закономерности удерживания углеводов:

- ❖ Трисахариды удерживаются меньше, чем дисахариды, а дисахариды, в свою очередь меньше, чем моносахариды в соответствии с механизмом эксклюзии по

размеру. Эта закономерность верна, например, для ряда мальтотриоза < мальтоза < глюкоза.



- ❖ Время удерживания дезоксисахаров больше, чем у соответствующих им углеводов с той же структурой, но содержащих гидроксильную группу. Рамноза удерживается дольше, чем манноза.



Другие закономерности удерживания углеводов установить сложно, однако полученный порядок элюирования совпадает с порядком, полученным в других работах на аналогичную тематику [2, 20-22, 30]. Считается, что порядок элюирования моносахаридов и альдитов обусловлен взаимодействием с сульфонатными группами на поверхности ПС/ДВБ по адсорбционному механизму.

Все изученные углеводы элюируются в очень узком диапазоне фактора удерживания. Из-за низкой селективности колонки по этому классу веществ разделение более чем трех сахаров вряд ли возможно, причем эти вещества должны иметь разную степень полимеризации. Хроматограмма разделения мальтотриозы, мальтозы и глюкозы представлена на рис. 12. Углеводы элюируются в течение 20 минут, демонстрируя лишь небольшие различия по временам удерживания

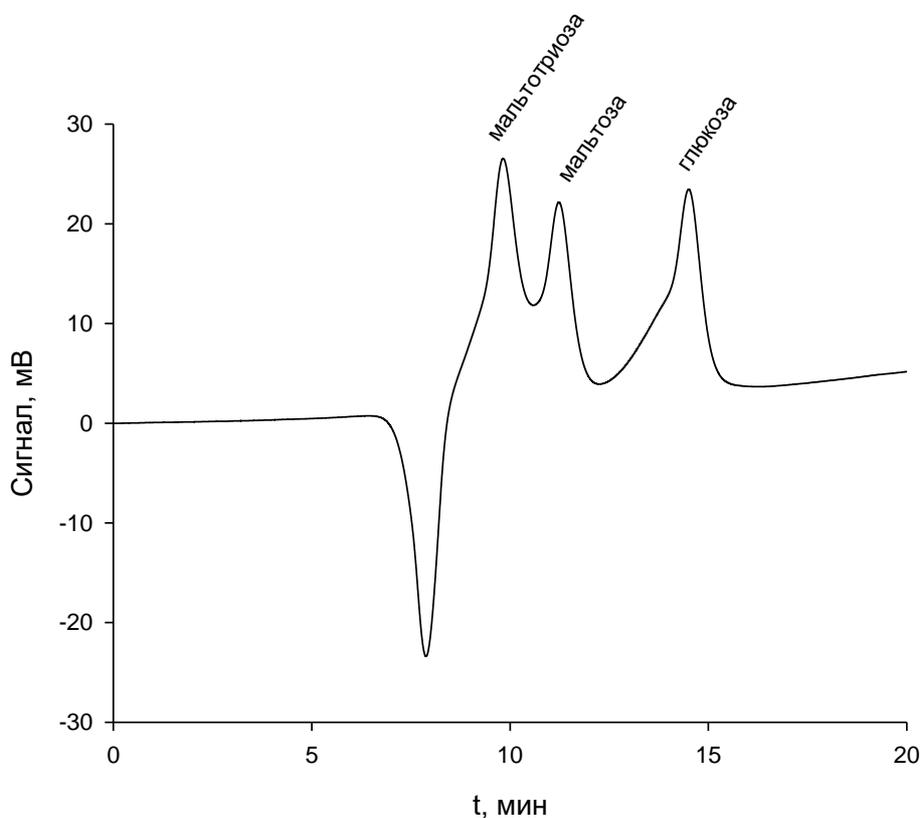


Рис. 12. Хроматограмма разделения модельной смеси углеводов с концентрацией 1 мг/мл: мальтотриоза, мальтоза, глюкоза. Хроматографические условия: температура колонки – 80°C, ПФ – разб. серная кислота (5 мМ), скорость потока – 0,1 мл/мин, детектор – рефрактометр.

Для модельной смеси углеводов рассчитаны эффективность хроматографического разделения (N), разрешение (R_s) и асимметрия (A_s). Полученные значения приведены в табл.12.

Таблица 12. Хроматографические параметры модельной смеси углеводов.

Соединение	N , тт/м	R_s	A_s
Мальтотриоза	760	1.04	0.65
Мальтоза	1190	2.51	0.96
Глюкоза	1970	-	0.42

При попытке разделения моносахаридов только пара глюкоза/арабиноза, имеющая наибольшую разницу во временах удерживания, показала разрешение больше значения 1.5. Разделение проходит за 25 минут. Хроматограмма представлена на рис. 13.

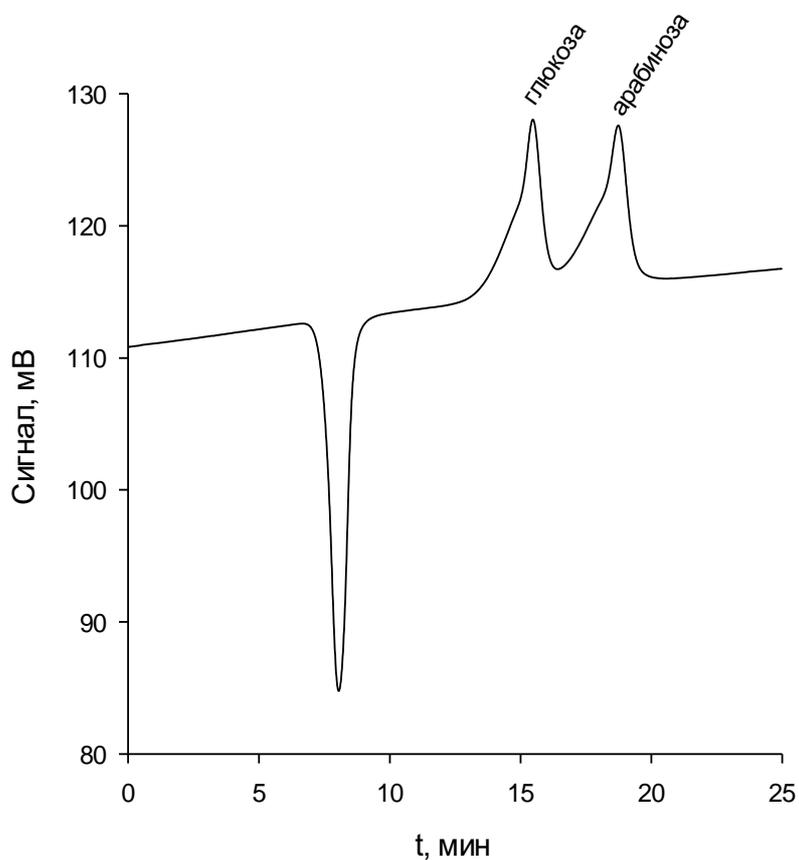


Рис. 13. Хроматограмма разделения смеси модельной смеси моносахаридов с концентрацией 1 мг/мл: глюкоза и арабиноза. Хроматографические условия: температура колонки – 80°C, ПФ – разб. серная кислота (5 мМ), скорость потока – 0,1 мл/мин, детектор – рефрактометр.

Для модельной смеси моносахаридов рассчитаны эффективность хроматографического разделения (N), разрешение (R_s) и асимметрия (A_s), полученные значения приведены в табл.13.

Таблица 13. Хроматографические параметры модельной смеси моносахаридов.

Соединение	N , тт/м	R_s	A_s
Глюкоза	6090	1.88	0.53
Арабиноза	6330		0.38

3.1.6. Изучение хроматографического удерживания альдитов

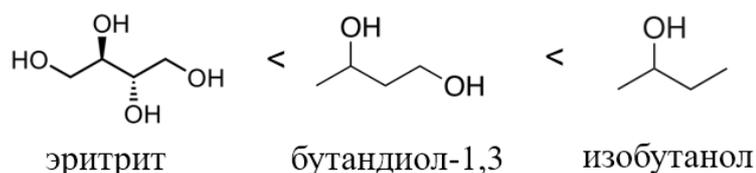
Было изучено хроматографическое удерживание альдитов: глицерин, иннозит, маннит, дульцит, сорбит, эритрит. По каждой из полученных хроматограмм рассчитаны фактор удерживания (k') и эффективность хроматографического разделения (N). Рассчитанные значения, а также времена удерживания (t_R), площадь (S), высота (h) и ширина (W) пиков приведены в табл. 14.

Таблица 14. Хроматографические характеристики альдитов.

Альдиты, 1 мг/мл						
Соединение	t_R , мин	S	h	W , мин	k'	N , тт/м
Инозит	15.66	4109	59	0.93	1.03	6240
Маннит	15.94	3793	52	0.87	1.07	7310
Дульцит	16.28	3836	52	0.87	1.11	7820
Сорбит	16.33	3639	49	0.93	1.12	6780
Эритрит	19.02	3577	43	1.30	1.47	4740
Глицерин	21.18	19109	177	1.64	1.75	4050

Исходя из полученных хроматографических характеристик можно выявить следующие закономерности удерживания альдитов:

- ❖ Возрастающее число одинаковых функциональных групп уменьшает время удерживания. Эритрит, содержащий 4 гидроксильные группы, удерживается меньше, чем изомеры бутандиола, а изомеры бутандиола меньше, чем изомеры бутанола.



3.2. Анализ реального объекта

В качестве объекта исследования был выбран заменитель сахара «Fit Parad» на основе эритрита, инулина и сукралозы. Содержание эритрита, используемого как основной компонент продукта с целью увеличения объема, во много раз превышает содержание сукралозы. Хроматограмма сахарозаменителя «Fit Parad» представлена на рис. 14.

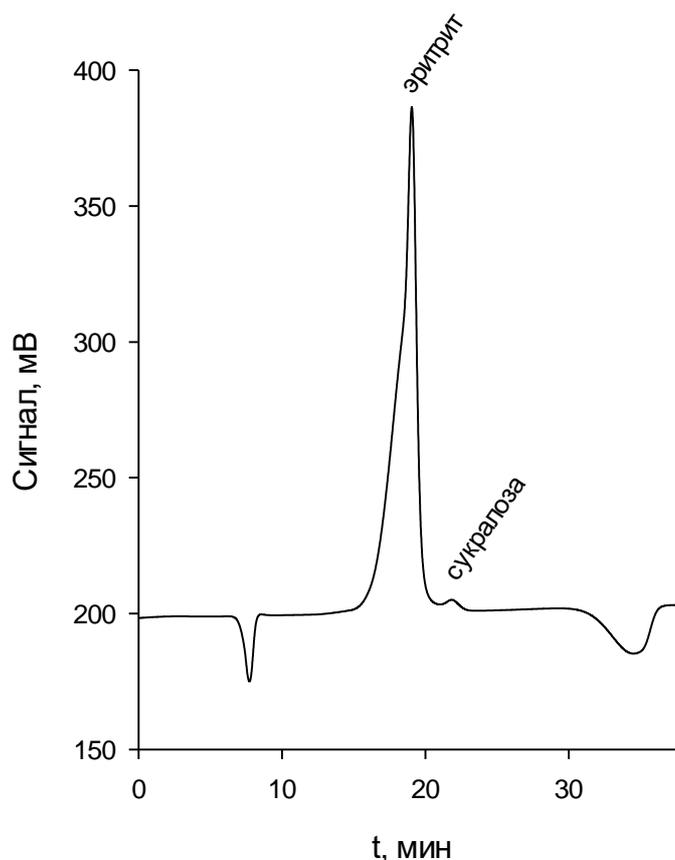


Рис. 14. Хроматограмма раствора сахарозаменителя «Fit Parad» с концентрацией 100 мг/мл. Хроматографические условия: температура колонки – 80°C, ПФ – разб. серная кислота (5 мМ), скорость потока – 0,1 мл/мин, детектор – рефрактометр.

Для хроматограммы сахарозаменителя «Fit Parad» рассчитаны эффективность хроматографического разделения (N), разрешение (R_s) и асимметрия (A_s). Полученные значения приведены в табл.15.

Таблица 15. Хроматографические параметры эритрита и сукралозы в сахарозаменителе «Fit Parad».

Соединение	N, тт/м	R _s	A _s
Эритрит	5430	1.27	0.31
Сукралоза	1410		1.30

Для определения содержания сукралозы на фоне больших количеств эритрита, использовали способ стандартных добавок. На основании полученных хроматограмм были рассчитаны площади пиков и по экспериментальным данным построена градуировочная зависимость (рис. 15)

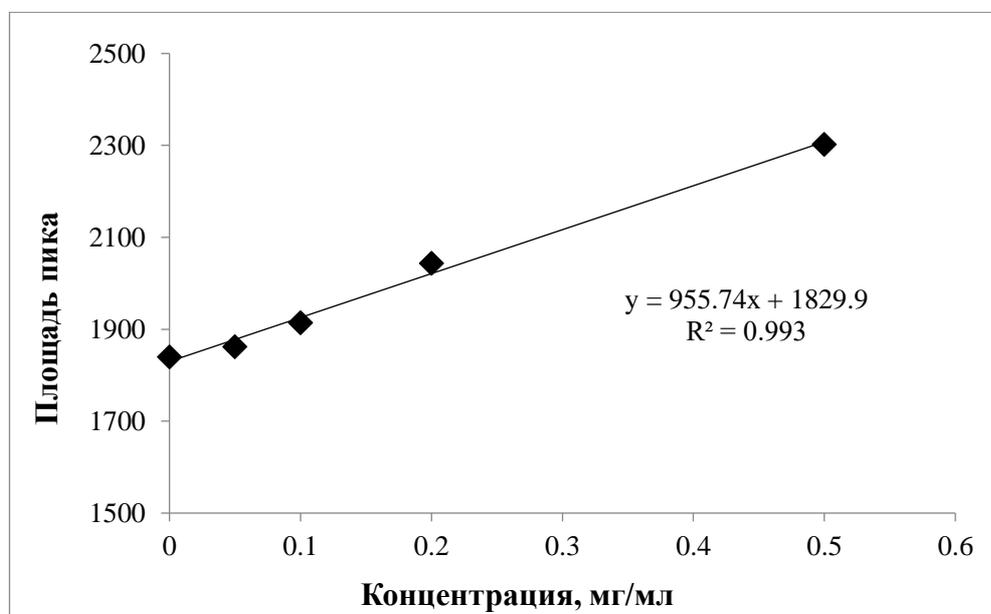


Рис. 15. Градуировочная зависимость концентрации сукралозы от площади пика.

Найденные значения концентраций сукралозы в смеси подсластителя были обработаны методами математической статистики, рассчитан предел обнаружения. Полученные результаты представлены в табл. 16.

Таблица 16. Результаты определения содержания сукралозы в комбинированном подсластителе «Fit Parad» (n=3, P=0,95).

Объект	Комбинированный подсластитель «Fit Parad»
Определяемое вещество	Сукралоза
Уравнение градуировочной зависимости	$y = (955 \pm 147)x + (1830 \pm 36)$
R ² , коэффициент корреляции	R ² = 0.993
Диапазон линейности градуировочной зависимости, мг/мл	0 – 0.5
Предел обнаружения C _{min} мг/мл	6×10^{-2}
Найдено % масс.	1,9 ± 0,3

Таким образом, исследуемый подсластитель содержит большую часть эритрита, доля сукралозы в образце составила лишь около двух массовых процента.

В лаборатории сахарозаменитель «Fit Parad» был проанализирован также методом гидрофильной хроматографии на силикагеле с привитыми группами иминодиуксусной кислоты с координированным ионом лантана. Полученное значение составило (2.1±0.2) масс.%, что подтверждает правильность полученных результатов разработанной методики с использованием отечественного катионообменника на основе ПС/ДВБ.

Определение сукралозы методом гидрофильной хроматографии требует ее предварительного концентрирования. В предложенной методике с использованием сульфированного катионообменника нет необходимости в этой процедуре, что упрощает пробоподготовку.

3.3. Сравнение исследованного отечественного сорбента с иностранным аналогом

Таблица 17. Сравнение с иностранным сорбентом [3].

	Отечественный	Иностранный
Компания	«Техносорбент», Россия	Bio-Rad, США
Сорбент	Сульфированный ПС/ДВБ в Н ⁺ -форме	Сульфированный ПС/ДВБ в Н ⁺ -форме
Длина и внутр. диаметр	250мм x 4,6 мм	300 x 7,8 мм
Сшивка	8%	8%
Размер частиц	10 мкм	10 мкм
Скорость	0.1 мл/мин	0.7 мл/мин
Элюент	5 мМ Н ₂ SO ₄	5 мМ Н ₂ SO ₄
Температура	80 °С	80 °С
Форма пиков	Ассиметричны	Симметричны
Количество разделяемых компонентов в смеси кислот	4	9
Количество разделяемых компонентов в смеси спиртов	6	9
Количество разделяемых компонентов в смеси кетонов и альдегидов	5	13
Количество разделяемых компонентов в смеси углеводов	3	7

Проведенное сравнение показало:

1. Порядок элюирования изученных соединений на сульфированном ПС-ДВБ катионообменнике полностью согласуется с литературными данными для зарубежных аналогов. Соответственно, по селективности отечественный сорбент соответствует мировым стандартам.

2. Невысокая эффективность хроматографической колонки и высокая асимметрия пиков обусловлены недостаточно разработанной процедурой набивки колонки. Однако, это скорее технологическая проблема, которая должна быть решена соответствующими специалистами.
3. Изученный сорбент можно рекомендовать для разделения органических соединений, включая одноатомные спирты, диолы, органические кислоты, углеводы, кетоны, альдегиды, альдиты.

Выводы

1. Изучены закономерности хроматографического удерживания ряда органических соединений, включая одноатомные спирты, диолы, органические кислоты, углеводы, кетоны, альдегиды, альдиты.
2. Показана возможность разделения модельной смеси органических кислот: глиоксиловой, молочной, уксусной, пропионовой.
3. Показана возможность разделения модельной смеси спиртов: глицерин, метанол, изопропанол, пропанол-1, втор-бутанол, бутанол-1.
4. Показана возможность разделения модельной смеси углеводов: мальтотриоза, мальтоза, глюкоза.
5. Показана возможность разделения модельной смеси кетонов: ацетона, метилэтилкетона, диэтилкетона, метилизобутилкетона, метилбутилкетона.
6. Проведено сравнение полученных характеристик отечественного сорбента с зарубежным аналогом. Установлено, что порядок элюирования изученных соединений на сульфированном ПС-ДВБ катионообменнике полностью согласуется с литературными данными для зарубежных аналогов.
7. Определено содержание сукралозы на фоне больших количеств эритрита в заменителе сахара «Fit Parad». Оно составило $1,9 \pm 0,3$ масс.%. Разработанная методика характеризуется простотой выполнения, не требует предварительной пробоподготовки.

Список литературы

1. Huber C. G., Bonn G. K. HPLC of Carbohydrates with Cation- and Anion-Exchange Silica and Resin-Based Stationary Phases // *Carbohydrate Analysis*. 2021. P. 125–155.
2. Pecina R., Bonn G., Burtscher, E. High-performance liquid chromatographic elution behaviour of alcohols, aldehydes, ketones, organic acids and carbohydrates on a strong cation-exchange stationary phase // *Journal of Chromatography A*. 1984. V. 287. P. 245–258.
3. Jandera, P., Churáček, J. Ion-exchange chromatography of nitrogen compounds // *Journal of Chromatography A*. 1974. V. 98. P. 1–54.
4. Ball G. F. M. The application of HPLC to the determination of low molecular weight sugars and polyhydric alcohols in foods: A review // *Food Chemistry*. 1990. V. 35. № 2. P. 117–152.
5. Kubica P., Namieśnik J., Wasik A. Comparison of hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the determination of eight artificial sweeteners and common steviol glycosides in popular beverages // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016. V. 127. P. 184–192.
6. Arrigoni E., Brouns F., Amadò R. Human gut microbiota does not ferment erythritol // *British Journal of Nutrition*. 2007. V. 94. № 5. P. 643–646.
7. Garcia-Diego C., Cuellar J. // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2005. V. 44. P. 8237
8. Liu Q., Wang L., Xiao, A. Research progress in macroporous styrene-divinylbenzene co-polymer microspheres // *Designed Monomers and Polymers*. 2007. V. 10. № 5. P. 405–423.
9. De Rezende S. M., de Castro Reis M., Reid M. G. Transesterification of vegetable oils promoted by poly(styrene-divinylbenzene) and poly(divinylbenzene) // *Applied Catalysis A: General*. 2008. V. 349. № 1–2. P. 198–203.
10. Hart M., Fuller G., Brown D. R. Sulfonated poly(styrene-co-divinylbenzene) ion-exchange resins: acidities and catalytic activities in aqueous reactions // *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2002. V. 182. P. 439–445.
11. Glód B. K. *Neurochemical Research*. V. 22. № 10. P. 1237–1248.

12. Churms S. C. Chapter 8 Modern size-exclusion chromatography of carbohydrates and glycoconjugates. *Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis*. 2002. P. 267–303.
13. Bonn G. High-performance liquid chromatographic elution behaviour of oligosaccharides, monosaccharides and sugar degradation products on series-connected ion-exchange resin columns using water as the mobile phase // *Journal of Chromatography A*. 1985. V. 322. P. 411–424.
14. Dadic M., Belleau G. Application of High Performance Liquid Chromatography in Brewing. I. Determination of Carbohydrates and Alcohol // *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1982. V. 40. № 4. P. 141–146.
15. Schmidt J., John M., Wandrey C. Rapid separation of malto-, xylo- and cello-oligosaccharides (DP 2–9) on cation-exchange resin using water as eluent // *Journal of Chromatography A*. 1981. V. 213. №1. P. 151–155.
16. Blake J. D., Clarke M. L., Richards G. N. Determination of organic acids in sugar cane process juice by high-performance liquid chromatography: improved resolution using dual aminex HPX-87H cation-exchange columns equilibrated to different temperatures // *Journal of Chromatography A*. 1987. V. 398. P. 265–277.
17. Pirogov A. V., Chernova M. V., Shpigun, O. A. Sulfonated and sulfoacylated poly(styrene-divinylbenzene) copolymers as packing materials for cation chromatography // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003. V. 376. № 5. P. 745–752.
18. Brobst K. M., Scobell H. D. Modern Chromatographic Methods for the Analysis of Carbohydrate Mixtures // *Starch – Stärke*. 1982. V. 34. № 4. P. 117–121.
19. Tiihonen J., Peuha E.-L., Latva-Kokko M. Subcritical water as eluent for chromatographic separation of carbohydrates using cation-exchange resins // *Separation and Purification Technology*. 2005. V. 44. № 2. P. 166–174.
20. Vohra M. H., Jain P., Jha T. Separation of acetone and butyric acid for simultaneous analysis of sugars, volatile fatty acids, acetone and alcohols by HPLC using flow programming // *Analytical Methods*. 2015. V. 7. № 18. P. 7618–7624.

21. Fischer R. L., Chapital D. C. Simultaneous Determination of Carbohydrates and Products of Carbohydrate Metabolism in Fermentation Mixtures by HPLC // *Journal of Chromatographic Science*. 1987. V. 25. № 3. P. 112–117.
22. Duarte-Delgado D., Narváez-Cuenca C.-E., Restrepo-Sánchez L.-P. Development and validation of a liquid chromatographic method to quantify sucrose, glucose, and fructose in tubers of *Solanum tuberosum* Group Phureja // *Journal of Chromatography B*. 2015. V. 975. P. 18–23.
23. Chinnici F., Spinabelli U., Amati A. Simultaneous determination of organic acids, sugars, and alcohols in musts and wines by an improved ion-exclusion hplc method // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2002. V. 25. № 16. P. 2551–2560.
24. Tanaka N., Ebata T., Hashizume K. Polymer-based packing materials with alkyl backbones for reversed-phase liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*. 1989. V. 475. № 2. P. 195–208.
25. Ells B., Wang Y., Cantwell F. F. Influence of solvent uptake and swelling by poly(styrene–divinylbenzene) column packings on sample sorption rate and band broadening in reversed-phase liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*. 1999. V. 835. № 1-2. P. 3–18.
26. Bowers L. D., Pedigo S. Solvent strength studies on polystyrene-divinylbenzene columns // *Journal of Chromatography A*. 1986. V. 371. P. 243–251.
27. Doyon G., Gaudreau G., St-Gelais D. Simultaneous HPLC Determination of Organic Acids, Sugars and Alcohols // *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 1991. V. 24. № 1-2. P. 87–94.
28. Jeffery J.E., Partlow E.V., Polglase W.J. Chromatographic estimation of sugars in wood cellulose hydrolyzates // *Anal. Chem*. 1960. V. 32. P. 774-777.
29. Majors R. E. Recent Advances in HPLC Packings and Columns // *Journal of Chromatographic Science*. 1980. V. 18. № 10. P. 488–511.
30. Wentz F. E., Marcy A. D., Gray, M. J. Analysis of Wood Sugars in Pulp and Paper Industry Samples by HPLC // *Journal of Chromatographic Science*. 1982. V. 20. № 8. P. 349–352.

31. Lombardi A. M., Bevilacqua A. E., Califano, A. N. Variation in organic acids content during ripening of Reggiano Cheese in airtight sealed bags // Food Chem. 1994. V. 51. P. 221-226.
32. González de Llano D., Rodríguez, A., Cuesta, P. Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening. Analysis by HPLC // J. Appl. Bacteriol. 1996. V. 80. P. 570-576.
33. Mullin W. J.; Emmons D. B. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography // Food Res. Int. 1997. V. 30. P. 147-151.
34. Panari G., Filippi S. Free fatty acids in Parmigiano- Reggiano cheese determined by HPLC // Sci. Tec. Latt.- Casearia. 1997. V. 48. P. 283-288.
35. Zeppa G., Conterno L., Gerbi V. Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. V. 49. № 6. P. 2722–2726.
36. Dadić M., Belleau G. Application of High-Performance Liquid Chromatography in Brewing. I. Determination of Carbohydrates and Alcohol // Journal of the American Society of Brewing Chemists. 1982. V. 40. № 4. P. 141–146.
37. Hilal S. H., Bornander L. L., Carreira L. A. Hydration Equilibrium Constants of Aldehydes, Ketones and Quinazolines // QSAR & Combinatorial Science. 2005. V. 24. № 5. P. 631–638.
38. Ogata Y., Kawasaki A. The Chemistry of the Carbonyl Group. 1970. V.2. P. 1 – 69.
39. Львов И. Б. Гидратация карбонильных соединений // Образовательный портал «Справочник». – Дата последнего обновления статьи: 24.02.2023. URL: https://spravochnick.ru/himiya/aldegidy_i_ketony/gidrataciya_karbonilnyh_soedineniy/ (дата обращения: 16.05.2023).