

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА**

**ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

*На правах рукописи*



**ЧИКУРОВА НАТАЛЬЯ ЮРЬЕВНА**

**НОВЫЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ НЕПОДВИЖНЫЕ  
ФАЗЫ С АМИДНЫМИ ГРУППАМИ И  
МАКРОМОЛЕКУЛАМИ В ФУНКЦИОНАЛЬНОМ СЛОЕ  
ДЛЯ ГИДРОФИЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Специальность – 1.4.2 – Аналитическая химия

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
к.х.н. Чернобровкина А.В.

Москва  
2023

## Оглавление

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
1.1. Создание новых неподвижных фаз для ГИХ .....	15
1.2. Матрицы сорбентов для ГИХ.....	18
1.3. Подходы к созданию гидрофильных функциональных слоев.....	20
1.3.1. Использование клик-химии для формирования новых слоев .....	22
1.3.1.1. Реакция Уги .....	23
1.3.1.2. Использование реакции Уги для формирования новых слоев. ....	28
1.3.2. Использование полимеров для формирования новых слоев .....	30
1.3.3. Использование антибиотиков для формирования новых слоев .....	35
1.4. Характеризация неподвижных фаз для ГИХ.....	38
1.4.1. Характеризация по коэффициентам селективности. Тест Танака .....	39
1.4.2. Характеризация по удерживанию тестовых аналитов .....	45
Вывод из обзора литературы .....	52
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	53
2.1. Аппаратура .....	53
2.2. Реактивы и материалы.....	54
2.3. Синтез сорбентов .....	61
2.4. Характеризация сорбентов физико-химическими методами.....	65
2.5. Заполнение хроматографических колонок .....	66
2.6. Условия хроматографического разделения .....	66
2.7. Уравновешивание колонок.....	67
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	68
ГЛАВА 3. Сравнение свойств 3-аминопропилсиликагеля с различным содержанием азота.....	69
ГЛАВА 4. Сорбенты, синтезированные с помощью многокомпонентной реакции Уги .....	78
4.1. Влияние условий реакции Уги .....	78
4.2. Влияние пространственного удаления функционального слоя, полученного по реакции Уги.....	84
4.3. Влияние природы изоцианида .....	86
4.4. Влияние природы карбонильного компонента .....	89
4.5. Влияние природы кислотного соединения.....	95
4.5.1. Использование бифункциональных аминокислот.....	95
4.5.2. Использование полимерных кислот.....	98
4.5.2.1. Влияние поликислоты .....	98
4.5.2.2. Изменение способа закрепления функционального слоя .....	101
4.5.2.3. Сравнение выхода реакции при использовании полиакриловой кислоты и сополимера акриловой кислоты и акрилата натрия.....	103
4.5.2.4. Увеличение числа карбоксильных групп .....	104
4.5.2.5. Увеличение молекулярной массы полимерной кислоты.....	106

4.5.2.6. Включение амидных групп в функциональный слой сорбентов .....	107
4.5.2.7. Увеличение соотношения матрица:полимер по массе .....	108
4.5.2.8. Гидрофобные взаимодействия .....	111
4.6. Сравнение мономерного и полимерного слоя, полученного по реакции Уги .....	115
ГЛАВА 5. Сорбенты на основе различных матриц, модифицированных эремоницином .....	121
5.1. Гидрофильность и ионообменные селективности .....	122
5.2. Эффективность и разделяющая способность модифицированных сорбентов .....	127
5.3. Многофункциональные возможности сорбентов .....	130
ГЛАВА 6. Сравнение способов конструирования слоев сорбентов .....	134
ГЛАВА 7. Классификация свойств сорбентов .....	137
7.1. Электростатические взаимодействия .....	137
7.2. Сравнение с коммерчески доступными колонками .....	138
ГЛАВА 8. Изучение механизмов удерживания .....	145
ГЛАВА 9. Анализ реальных объектов .....	149
9.1. Определение углеводов в кофе и вине .....	150
9.2. Определение витаминов в БАД и детоксикационном киселе .....	153
9.3. Определение примесей противовирусного препарата .....	155
9.4. Определение кетокислоты в питательном растворе .....	156
9.5. Определение аминокислот и витаминов в тонизирующем напитке .....	157
9.6. Определение аминокислот в почве в режиме ГИХ-МС .....	159
9.7. Изучение кинетики ферментативной реакции .....	161
ВЫВОДЫ .....	164
Приложение .....	165
Список литературы .....	176

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ОФ ВЭЖХ	Обращенно-фазовая ВЭЖХ
НФ ВЭЖХ	Нормальнофазовая ВЭЖХ
ГИХ	Гидрофильная хроматография
МС	Масс-спектрометрия
УФ	Спектрофотометрический детектор УФ-диапазона
НФ	Неподвижная фаза
ПФ	Подвижная фаза
1,4-БДДГЭ	1,4-Бутандиолдиглицидиловый эфир
ПС-ДВБ	Полистирол-дивинилбензол
КБЗ	Бензилоксикарбонил

### Условные обозначения буферных растворов

ААБ	Аммонийно-ацетатный буферный раствор
АФБ	Аммонийно-формиатный буферный раствор
ФБ	Фосфатный буферный раствор

### Условные обозначения сахаров

Fru	Фруктоза	Rib	Рибоза
Glu	Глюкоза	Xyl	Ксилоза
Suc	Сахароза	Ara	Арабиноза
Lact	Лактоза	Man	Манноза
Mal	Мальтоза	Raf	Рафиноза

### Условные обозначения аминокислот

Phe	Фенилаланин	Leu	Лейцин
Tyr	Тирозин	Ile	Изолейцин
Ser	Серин	Val	Валин
Asn	Аспарагин	Pro	Пролин
Met	Метионин	Ala	Аланин

### Условные обозначения гербицидов, фосфоновых, галогенуксусных кислот

AMPA	Аминометилфосфоновая кислота	BPA	Бутилфосфоновая кислота
GLU	Глюфосинат	MCAA	Хлоруксусная кислота
GYPH	Глифосат	DCAA	Дихлоруксусная кислота
ETN	Этефон	TCAA	Трихлоруксусная кислота
MPPA	3-(гидроксиметилфосфинил)-пропионовая кислота	MBAA	Бромуксусная кислота
t-BPA	Трет-бутилфосфоновая кислота	DBAA	Дибромуксусная кислота

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Гидрофильная хроматография (ГИХ) – современный метод определения и разделения полярных соединений, играющий незаменимую роль во многих областях и демонстрирующий неограниченный потенциал развития благодаря созданию различных неподвижных фаз. Актуальность гидрофильной хроматографии также определяется разнообразной селективностью, альтернативной обращенно-фазовой хроматографии селективностью, низкой вязкостью используемых подвижных фаз, высокой чувствительностью в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием, упрощением пробоподготовки. Ввиду появления новых задач и наличия реальных объектов со сложными матрицами растет потребность в широком арсенале неподвижных фаз, обеспечивающих высокую селективность по отношению к разным классам веществ. Дополнительным преимуществом является экономичность и простота их получения. Разработка новых гидрофильных сорбентов может обеспечить более чувствительный и селективный анализ сложных биологических образцов, объектов пищевой и фармацевтической промышленности.

Новые способы конструирования функциональных слоев гидрофильных сорбентов: применение клик-химии, модифицирование полимерными соединениями и молекулами большого размера – могут привести к экранированию различных матриц, к увеличению гидрофильности, эффективности и селективности получаемых фаз. Использование гибких стратегий, таких как многокомпонентные реакции, открывает возможность создавать абсолютно разные структурные фрагменты, в том числе полимерные. В свою очередь, благодаря исследованию разработанных фаз с помощью хроматографических методов можно обнаружить закономерности между определенными структурными фрагментами фазы и свойствами сорбента, что обеспечит управление их селективностью. Использование больших гидрофильных молекул для дизайна новых фаз, например, гликопептидных антибиотиков — популярных хиральных селекторов, — актуально не только для разделения оптически активных, но и полярных соединений. Кроме того, всестороннее изучение известных хиральных сорбентов позволит расширить области их применения.

Таким образом, актуальность работы определяется потребностью в новых гидрофильных сорбентах для разделения широкого круга веществ, а также в высокоэффективных, быстрых и гибких стратегиях их получения.

**Цель работы** — разработка и применение новых способов конструирования функциональных слоев для создания новых сорбентов, а также изучение их свойств. Для достижения цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- Сравнить партии 3-аминопропилсиликагеля с разным содержанием азота, выбрать параметры для характеристики их свойств;
- Использовать многокомпонентную клик-реакцию Уги для конструирования новых функциональных слоев, различающихся структурными фрагментами компонентов: изоцианидов, карбонильных соединений, аминокислот и полимерных кислот. Изучить влияние конкретных фрагментов на хроматографические свойства разработанных фаз с помощью теста Танака и исследования удерживания модельных веществ разных классов;
- Оценить влияние полимерного слоя, способа его закрепления, количества карбоксильных и наличия амидных групп в нем, молекулярной массы полимера и соотношения матрица : полимер по массе на стадии синтеза на характеристики разделения тестовых веществ. Провести сравнение влияния мономерных и полимерных слоев, сформированных по реакции Уги;
- Изучить влияние структуры эремомицина, а также способов его закрепления на удерживание модельных соединений для матриц на основе силикагеля и сополимеров стирола и дивинилбензола;
- Сравнить возможности разработанных неподвижных фаз между собой, а также с коммерчески доступными сорбентами. Оценить перспективы их применения для анализа реальных объектов в режиме гидрофильной хроматографии.

### **Научная новизна**

Предложен вариативный подход к созданию фаз с помощью многокомпонентной реакции Уги в одну стадию из доступных реагентов при комнатной температуре. Выбранный способ позволяет вводить разные функциональные группы в слой сорбентов, вследствие чего управлять их

разделяющей способностью, и приводит к получению высокоэффективных неподвижных фаз для гидрофильной хроматографии.

Предложено использовать полимерные кислоты в реакции Уги для формирования гидрофильных слоев фаз. Получены сорбенты на основе силикагеля с новыми полимерными функциональными слоями, характеризующиеся повышенной степенью экранирования матрицы и стабильностью. Установлено, что использование сополимера акриловой и малеиновой кислот с большой молекулярной массой звена приводит к получению высокоэффективных неподвижных фаз.

Показана возможность использования сорбентов, содержащих эремомицин в функциональном слое, для разделения полярных соединений в гидрофильном режиме. Предложен способ закрепления эремомицина с пространственным удалением слоя с помощью 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (1,4-БДДГЭ), позволяющий сохранить высокую эффективность при модифицировании силикагеля макромолекулами.

Выбраны параметры, позволяющие дополнить характеристику новых сорбентов и оценить их разделяющую способность по отношению к веществам, удерживающимся по разным механизмам в режиме гидрофильной хроматографии. Установлена корреляция параметров селективности по отношению к кислотным витаминам с анионообменной селективностью сорбентов по тесту Танака при изменении состава подвижной фазы.

### **Практическая значимость**

Получены новые сорбенты с амидными группами и макромолекулами для гидрофильной хроматографии, характеризующиеся высокой эффективностью, повышенной селективностью по отношению к сахарам, азотистым основаниям и нуклеозидам, органическим и аминокислотам. Разработанные фазы обладают разными свойствами и параметрами ионообменной селективности и гидрофильности, что важно для выбора конкретных сорбентов с целью решения определенных аналитических задач, а также дополняют круг коммерчески доступных неподвижных фаз. Найдены способы получения высокоэффективных сорбентов, заключающиеся в применении реакции Уги, в том числе использовании в ней полимеров с большими молекулярными массами, а также в

пространственном удалении эремомицина от поверхности матрицы с помощью разветвленного спейсера. Получены многофункциональные колонки, позволяющие реализовать два или три режима высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ): гидрофильной, обращенно-фазовой (ОФ) и хиральной – благодаря использованию эремомицина в качестве модификатора, обеспечивающего возможность хирального разделения, и применению матрицы на основе полистирол-дивинилбензола (ПС-ДВБ), позволяющей проводить разделение гидрофобных веществ в режиме ОФ ВЭЖХ.

Показана возможность разделения большого набора веществ внутри каждого класса: лучшие фазы, полученные по реакции Уги, обеспечивают разделение 10 сахаров с эффективностью до 20000 тт/м, 11 азотистых оснований и нуклеозидов, или 7 витаминов, 7 аминокислот, или 10 органических кислот с эффективностью до 60000 тт/м, а лучшие сорбенты с эремомицином в слое обеспечивают разделение 9 азотистых оснований и нуклеозидов, или 7 витаминов, или 6 аминокислот, или 6 органических кислот с эффективностью до 40000 тт/м.

Сорбенты с лучшими характеристиками были применены для анализа реальных объектов: витаминных комплексов, напитков (кофе, вино, тонизирующий напиток, детоксикационный кисель), фармацевтических препаратов и почв методом гидрофильной хроматографии.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Способы формирования функциональных слоев, заключающиеся в применении реакции Уги, а также использовании гликопептидного антибиотика эремомицина, позволяют получить высокоэффективные неподвижные фазы для гидрофильной хроматографии.

2. Свойства сорбентов по отношению к веществам, удерживающимся преимущественно по адсорбционному механизму, могут быть оценены по данным элементного анализа на содержание азота, по распределительному механизму — по параметру гидрофильности теста Танака, к кислотным витаминам — по анионообменной селективности данного теста.

3. Использование наиболее гидрофильного изоцианида и карбонильного соединения в реакции Уги в случае формирования мономерного функционального слоя приводит к получению сорбентов с высокой разделяющей способностью и

эффективностью по крайней мере до 60000 тт/м, в свою очередь, применение аминокислот приводит к улучшению селективности по углеводам и слабоудерживаемым витаминам.

5. Введение полимерных кислот в функциональный слой сорбентов позволяет экранировать матрицу, управлять ионообменной селективностью и обеспечивает увеличение стабильности получаемых фаз. Использование линейных сополимеров акриловой и малеиновой кислот, а также акриловой кислоты и акриламида с большими молекулярными массами приводит к получению сорбентов с эффективностью, сравнимой с таковой для фаз с мономерными слоями.

6. Введение эремомицина в функциональный слой приводит к увеличению гидрофильности поверхности разных типов матриц до трех раз; в свою очередь, такая гидрофилизация матрицы на основе полистирол-дивинилбензола приводит к получению сорбента, подходящего для гидрофильной, обращенно-фазовой и хиральной хроматографии. Способ закрепления эремомицина на поверхности силикагеля с использованием бифункционального спейсера 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира позволяет обеспечить высокую эффективность получаемых фаз – по крайней мере до 40000 тт/м.

**Степень достоверности.** Достоверность результатов обеспечена благодаря применению реагентов высокой степени чистоты, проведением анализа реальных объектов и использованием современного хроматографического оборудования. На момент проведения измерений все оборудование имело актуальное свидетельство о периодической проверке.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.2 — Аналитическая химия по областям исследований: методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.); анализ органических веществ и материалов; анализ пищевых продуктов.

**Апробация результатов исследования.** Результаты работы были представлены на следующих симпозиумах, съездах и конференциях: 4-ая Всероссийская конференция "Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез" (Краснодар), 2020 г., Международная научная конференция

«Ломоносов» (Москва): 2020 г., 2021 г., 2022 г., 2023 г., 6-ая Всероссийская конференция «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар), 2021 г.; Международный симпозиум по хроматографии (Будапешт, Венгрия), 2022 г., 4-й Съезд аналитиков России (Москва), 9-й Всероссийский симпозиум и школа-конференция молодых ученых «Кинетика и динамика сорбционных процессов (Сочи), 2022 г., 51-й Международный симпозиум по ВЭЖХ (Дюссельдорф, Германия), 2023 г.

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 30 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия», и 25 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

**Личный вклад автора.** Представленные результаты исследования получены лично автором или под его руководством. Личный вклад автора состоял в постановке задач исследования, поиске и систематизации данных литературы по теме работы, планировании, постановке и проведении экспериментов, обработке и интерпретации результатов, а также в подготовке результатов исследований к публикации. Сорбенты на основе силикагеля Kromasil и Диасфер-110-Erg с иммобилизованным эремоницином были предоставлены ЗАО «БиоХимМакСТ» (Россия). Образцы фармацевтических препаратов предоставлены компанией ООО «АМЕДАРТ». Синтез этилизоцианацетата проведен к.х.н. доц. В. Н. Нуриевым. Элементный анализ 20 сорбентов проведен к.х.н., н.с. Н.А. Соболевым, анализы образцов методом низкотемпературной адсорбции азота — к.ф.-м.н., с.н.с. К.И. Маслаковым. Помощь в получении и обработке данных по разделению углеводов на приборе с испарительным детектором по светорассеянию оказана д.х.н., в.н.с. М.А. Статкусом; помощь в получении и обработке данных по разделению аминокислот с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС), а также данных, полученных с помощью газовой хроматографии–масс-спектрометрии (ГХ-МС) — д.х.н. доц. А.Н. Ставрианиди. Под руководством автора выполнены 2 дипломные работы – Шемякиной А.О. и Беляевой А.А.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Материал изложен на 189 страницах, включает 96 рисунков и 37 таблиц. В списке литературы 167 наименований.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Гидрофильная хроматография (ГИХ; англ. Hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) представляет альтернативный и эффективный подход к разделению полярных веществ на полярных сорбентах [1]. Исторически сложилось так, что гидрофильную хроматографию считали вариантом нормально-фазовой хроматографии (НФ ВЭЖХ), однако было выяснено, что механизм разделения, реализуемый в ГИХ, гораздо сложнее, чем в НФ ВЭЖХ. Аббревиатура HILIC впервые была предложена Э. Альпертом в 1990 году [2]. В нашей стране режимом гидрофильной хроматографии активно занимался Л.В. Сапрыкин под названием «ДИРФ» (динамически-индуцированный раздел фаз) [3, 4] Количество публикаций по данной теме начало существенно возрастать с 2003 года, и на сегодняшний день ГИХ — популярный и развивающийся метод определения полярных веществ [2].

Данный метод сочетает в себе применение неподвижных фаз, характерных для НФ ВЭЖХ, и подвижных фаз, используемых в ОФ ВЭЖХ (обращенно-фазовая хроматография). В качестве полярных неподвижных фаз обычно используют немодифицированный или химически модифицированный силикагель. Подвижная фаза содержит органический растворитель, обычно ацетонитрил, и от 2 до 40% воды. Небольшая часть воды из элюента адсорбируется поверхностными полярными группами сорбента и происходит образование приповерхностного слоя, обогащенного водой. Вследствие этого наблюдается распределение молекул вещества между двумя жидкими фазами — преимущественно полярной подвижной фазой и адсорбированным слоем воды, что является важнейшей особенностью метода. ГИХ также как и ионная хроматография позволяет определять заряженные вещества. Таким образом, гидрофильная хроматография объединяет характерные черты трех основных методов жидкостной хроматографии и расширяет диапазон возможностей разделения и определения полярных аналитов [2]. По сравнению с ОФ ВЭЖХ вариант ГИХ обеспечивает достаточное удерживание полярных нейтральных соединений, веществ кислотной и основной природы, а также альтернативную селективность их разделения. Кроме того, высокое содержание органического растворителя в элюенте приводит к снижению рабочего давления и является преимуществом для сочетания ГИХ с масс-спектрометрическим детектированием, а также обеспечивает высокую степень ионизации и, как

следствие, значительное повышение чувствительности. Количество публикаций, посвященных методу, постоянно растет, и в настоящее время ГИХ активно используют в таких важных областях химии и биохимии, как анализ продуктов питания и лекарств, экологический мониторинг, метаболомика и протеомика. [5,6].

Механизм удерживания в гидрофильной хроматографии, а также теория, на основании которой возможно было бы делать достоверные прогнозы удерживания аналитов, являются объектами исследования многих работ [7]. Современные теоретические представления предполагают возможность реализации нескольких механизмов удерживания: распределительного и адсорбционного, включающего адсорбцию определяемого вещества на поверхности сорбента, а также одновременную реализацию данных двух механизмов. Более того, значительный вклад в удерживание в ГИХ вносят электростатические взаимодействия и образование водородных связей. Преимущественная доля каждого из механизмов для конкретных хроматографических систем зависит от состава подвижной фазы, типа неподвижной фазы, а также от природы аналита.

Прежде всего, рассмотрим распределительный механизм удерживания. Благодаря наличию полярных групп, поверхность неподвижной фазы адсорбирует воду из элюента в количестве 0.5–1%, образуя обогащенный водой приповерхностный слой (рис. 1, слева). Таким образом, полярное определяемое вещество, растворенное в подвижной фазе, подвергается распределению между двумя жидкими фазами: адсорбированным слоем воды и преимущественно полярной подвижной фазой. Полярные вещества имеют более высокое сродство к обогащенному водой приповерхностному слою, нежели чем к насыщенной органическим растворителем подвижной фазе, что приводит к увеличению взаимодействия растворенных гидрофильных веществ и водного слоя, и как следствие, их удерживания. Если для веществ реализуется только распределительный механизм, то порядок их удерживания коррелирует с увеличением полярности и обратен ряду удерживания в ОФ ВЭЖХ.

Также вклад в удерживание в режиме ГИХ может вносить и адсорбционный механизм, включающий химические (водородные связи, донорно-акцепторные взаимодействия), физические (ион-дипольные, диполь-дипольные, диполь-индуцированный диполь, мгновенный диполь-индуцированный диполь),

межмолекулярные (силы Ван-дер-Ваальса), гидрофобные взаимодействия. Более того, при наличии ионизированных групп, специально иммобилизованных на поверхность неподвижной фазы, или диссоциированных остаточных силанольных групп в ГИХ реализуются электростатические взаимодействия (рис. 1, справа), также играющие важную роль в удерживании и разделении полярных веществ [2,7].

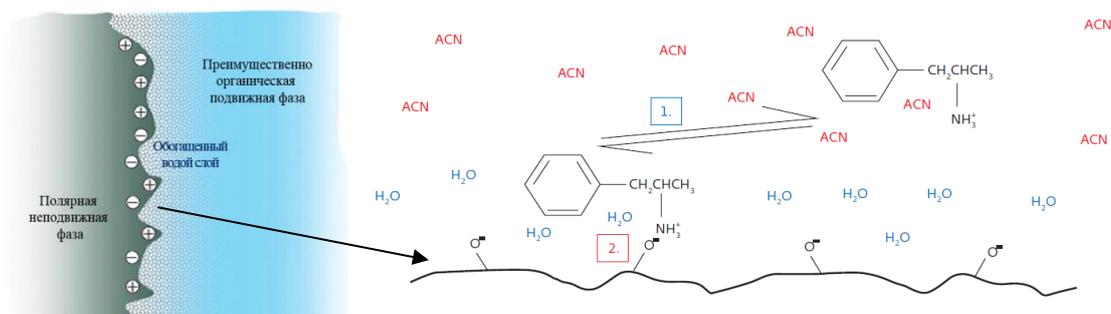


Рис. 1. Образование обогащенного водной слои на поверхности сорбента (слева); распределительный (1) и электростатический (2) механизмы удерживания в ГИХ (справа) [7].

Адсорбционные процессы могут вносить более значимый вклад в удерживание при высоком содержании органического растворителя в подвижной фазе, когда приповерхностный слой воды довольно тонкий, что приводит к прямому взаимодействию растворенных веществ с неподвижной фазой.

Модели, описывающие удерживание, разработанные для других видов жидкостной хроматографии, были применены к ГИХ. Эмпирическое уравнение, установленное для распределительного механизма в ОФ ВЭЖХ [2,7]:

$$\log k' = \log k'_A - S\varphi \quad (1)$$

где  $k'$  — фактор удерживания соединения;  $\varphi$  — объемная доля сильного растворителя в подвижной фазе (воды в случае гидрофильной хроматографии);  $k'_A$  — фактор удерживания вещества при использовании чистого слабого растворителя (ацетонитрила) в качестве элюента;  $S$  — константа, возрастающая при уменьшении полярности органического компонента и увеличении размера молекул определяемого соединения.

Удерживание в НФ ВЭЖХ основано на локализованной адсорбции и может быть удовлетворительно описано уравнением:

$$\log k' = \log k'_B - n \log \varphi \quad (2)$$

где  $k'_B$  — фактор удерживания соединения при использовании чистого сильного растворителя в качестве элюента;  $n$  — стехиометрический коэффициент,

характеризующий число молекул сильного растворителя в данном режиме, необходимое для замещения одной адсорбированной молекулы аналита.

Экспериментальные зависимости  $k'$  от  $\phi$  или  $\log \phi$  представляют собой кривые, демонстрирующие, что ни уравнение (1), ни (2) не описывают полностью механизм удерживания. Однако оба уравнения все еще используют при разработке и оптимизации изократического и градиентного разделения, а также для характеристики новых неподвижных фаз.

Для оценки вклада электростатических взаимодействий в методе ГИХ используют следующее уравнение:

$$\log k' = -\log [C]_m + \log b_{IEX} \quad (3)$$

где  $[C]_m$  – концентрация конкурирующего иона в подвижной фазе;  $b_{IEX}$  – константа, характеризующая отношение фаз, ионообменную емкость неподвижной фазы и константу равновесия ионного обмена.

При величинах тангенса угла наклона зависимости  $\log k'$  от  $\log [C]_m$  близких к -1 делают вывод о доминирующем вкладе ионообменного механизма, и о его отсутствии при величинах тангенса угла наклона, близких к 0 [2,7].

Оптимизация удерживания в гидрофильной хроматографии контролируется такими условиями, как природа сорбента, природа и содержание органического растворителя, pH буферного раствора, его состав и концентрация, температура колонки, скорость потока подвижной фазы [7]. Значительное влияние на удерживание и селективность разделения в ГИХ оказывает буферный раствор. Его использование в первую очередь необходимо для контроля ионизации аналитов. Увеличение концентрации буферного раствора, приводит к уменьшению удерживания веществ в тех случаях, когда оно определяется именно электростатическими взаимодействиями. Однако в некоторых случаях соли способствуют удерживанию веществ в гидрофильной хроматографии за счет увеличения объема иммобилизованного слоя воды на поверхности неподвижной фазы [7]. Важным фактором, влияющим на удерживание в ГИХ, является pH буферного раствора. Значение pH буфера выше или ниже  $pK_a$  аналита определяет его зарядовое состояние, которое, в свою очередь, влияет на гидрофильность аналита, а также на его взаимодействие с неподвижной фазой. Варьируя данный параметр, можно изменять вклад ионного обмена в удерживание веществ.

## 1.1. Создание новых неподвижных фаз для ГИХ

Создание новых неподвижных фаз является одним из ключевых факторов развития метода ГИХ. Именно сорбент оказывает самое существенное влияние на удерживание аналитов, эффективность и селективность разделения, тогда как изменение состава подвижной фазы, температуры колонки позволяет подбирать оптимальные условия для разделения тех или иных классов веществ на определенной неподвижной фазе [8].

Традиционными неподвижными фазами для ГИХ являются немодифицированные силикагели или силикагели, модифицированные функциональными группами: амидными [9], диольными [10, 11], аминогруппами [12], а также цвиттер-ионные фазы [13, 14], представляющие уже привычный арсенал гидрофильных сорбентов. На сегодняшний день именно эти неподвижные фазы, полученные в большинстве своем на основе силикагеля, все еще остаются наиболее распространенными и часто используемыми (рис. 2) фазами в ГИХ [15].

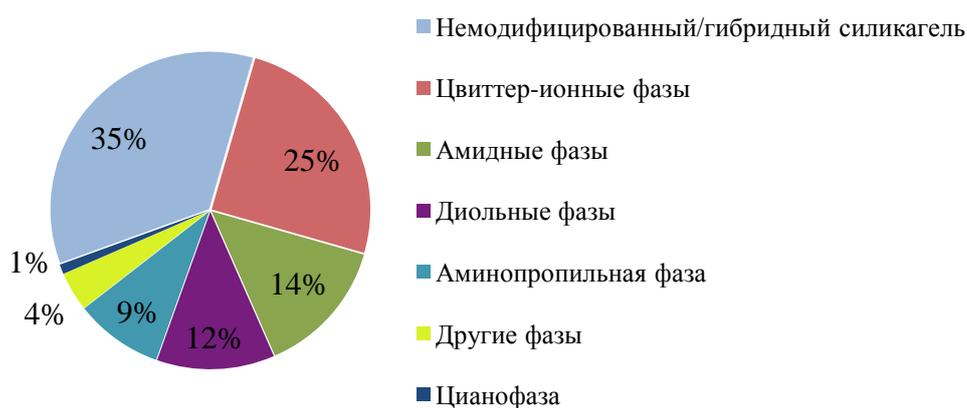


Рис. 2. Практическое применение неподвижных фаз в ГИХ [15].

Среди относительно недавно полученных неподвижных фаз можно выделить те, что были разработаны путем введения таких функциональных групп как цвиттер-ионные группы, гидрофильные макромолекулы и ионные жидкости [16]. Также важной тенденцией является создание многофункциональных сорбентов и для ОФ ВЭЖХ, и для ГИХ посредством включения и гидрофобных, и гидрофильных групп [17, 18, 19, 20, 21, 22].

Традиционные цвиттер-ионные неподвижные фазы (ZIC-HILIC, ZIC-cHILIC и ZIC-pHILIC, Merck, Германия) получают иммобилизацией сульфобеттина или фосфорилхолиновых фрагментов на поверхности силикагеля или полимерных

материалов [16]. В работе [23] были получены новые цвиттер-ионные неподвижные фазы путем модифицирования силикагеля с помощью дифенилфосфоний-пропилсульфоната. Они продемонстрировали более высокую гидрофильность и эффективность по сравнению с фазой ZIC-HILIC, лучшую селективность по отношению к различным полярным веществам, включая  $\beta$ -блокаторы, азотистые основания и нуклеозиды. Авторы [24, 25] получили новый цвиттер-ионный сорбент (Click TE-Cys) путем связывания цистеина и предварительно активированного силикагеля посредством «тиол-еновой» клик-реакции. Уникальная конфигурация, заключающаяся в равномерном распределении положительно и отрицательно заряженных групп параллельно поверхности силикагеля, обеспечивает хорошую гидрофильность и селективность по олигосахаридам, нуклеозидам и пептидам, а также высокую эффективность до 82000 тт/м.

Широкое применение находят фазы на основе силикагеля, модифицированные молекулами большого размера, например макроциклическими олигосахаридами. Такие молекулы, как циклодекстрины, циклофруктаны, кукурбитурилы (рис. 3) содержат большое число полярных групп, обеспечивающих их гидрофильность [16]. Молекула циклодекстрина обладает двойными свойствами: ее внутренняя поверхность гидрофобна, что позволяет удерживать в полости гидрофобные молекулы, а внешняя — достаточно гидрофильна для применения в ГИХ [26,27].

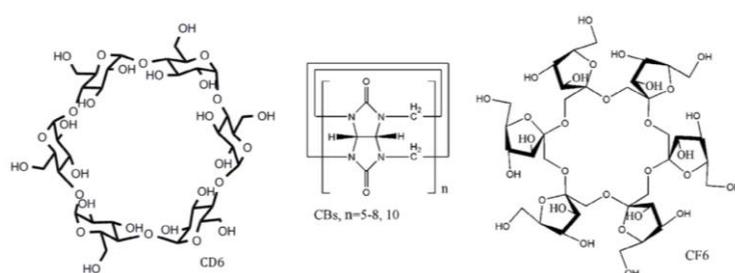


Рис. 3. Макроциклические функциональные группы, используемые для создания гидрофильных неподвижных фаз: циклодекстрины, кукурбитурилы, циклофруктаны [16].

Благодаря своей уникальной пространственной конфигурации, циклодекстрины также успешно используют в качестве хиральных селекторов для разделения энантиомеров. В работе [27] было успешно достигнуто разделение полярных компонентов, таких как нуклеозиды и олигосахариды, и хиральное

разделение в гидрофильном режиме (рис. 4). Возможно разделение 9 нуклеозидов и азотистых оснований за 14 мин и разделение энантимеров ибупрофена с  $R_s = 1.60$ .

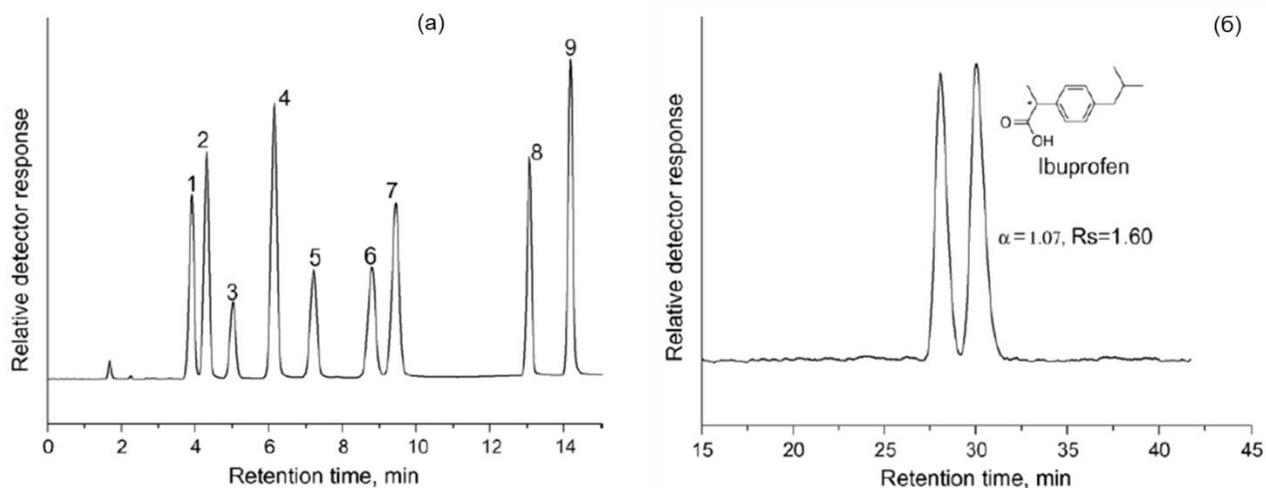


Рис. 4. Хроматограмма смеси нуклеозидов на колонке с привитым  $\beta$ -циклодекстрином (а). Условия разделения: ПФ (а,б): А, 10 мМ ацетат аммония в  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (95/5, об./об.); Б, 10 мМ ацетат аммония; градиентное элюирование: 0–8 мин 10%→16% Б, 8–15 мин 16%→40% Б; УФ-детектирование при 260 нм. 1 — 5-Метилуридин, 2 — уридин, 3 —  $\text{N}_4$ -ацетилцитидин, 4 — аденозин, 5 — инозин, 6 — цитидин, 7 — гуанозин, 8 — ксантозин, 9 — 1-метиладенозин. Хроматограмма ибупрофена на колонке с привитым  $\beta$ -циклодекстрином (б). Условия разделения: изократическое элюирование: 2% Б; УФ-детектирование при 225 нм. Скорость потока — 1.0 мл/мин. Температура колонки 30°C [27].

Перспективным подходом для создания новых гидрофильных неподвижных фаз является использование ионных жидкостей в качестве селекторов благодаря их уникальным свойствам [28]. Они обеспечивают многочисленные сольватационные взаимодействия, а также возможность гибких структурных вариаций. Многие исследования показали, что структура ионной жидкости, такая как катион, анион и длина алкильной цепи, оказывает значительное влияние на селективность разделения и является ключом к ее изменению [29]. К настоящему моменту наибольшее применение они нашли в смешанном режиме ОФ ВЭЖХ/ГИХ, однако, например, в работе [30] получены фазы исключительно для ГИХ на основе силикагеля, модифицированного различными имидазольными ионными жидкостями (рис. 5).

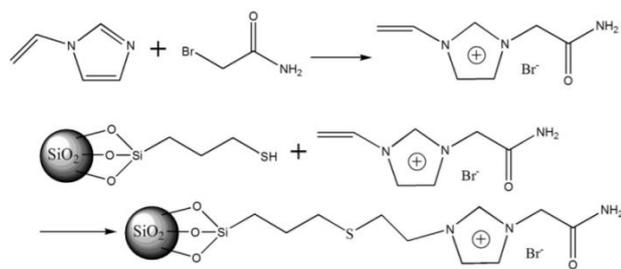


Рис. 5. Схема синтеза амидо-функциональной фазы, модифицированной имидазольной ионной жидкостью [30].

На селективность разделения в ГИХ влияет природа матрицы сорбента [31], структура функционального слоя и способ его закрепления. Несмотря на то, что уже известно несколько десятков и классических неподвижных фаз для гидрофильной хроматографии, и полученных относительно недавно, по-прежнему существует постоянный спрос на новые сорбенты, которые бы обладали другими свойствами для решения появляющихся аналитических задач или их получение включало бы инновационные методы, характеризующиеся простотой выполнения. Создание новых функциональных слоёв на поверхности силикагеля, а также использование альтернативных матриц позволяет обеспечивать иную селективность за счёт дополнительных взаимодействий, увеличивать диапазон рН и температурной стабильности.

## 1.2. Матрицы сорбентов для ГИХ

Силикагель в качестве матрицы для создания новых фаз получил огромное распространение. Это стало возможным благодаря ряду его преимуществ: механической устойчивости к высоким давлениям, стойкости к действию органических растворителей, отсутствию проблем набухания, высокой эффективности разделения, коммерческой доступности различных видов с широким спектром размеров частиц и их формой, диаметрами пор и удельной поверхностью, а также простоте активации и функционализации поверхности [32].

Однако стабильность большинства химически модифицированных сорбентов на основе силикагеля ограничена узким диапазоном рН 3–7, в некоторых случаях — 2–8 и определяется устойчивостью к гидролизу силоксановой связи [7]. При значениях рН подвижной фазы < 2 связь между силикагелем и функциональными группами подвергается гидролизу, а при рН > 7 растворяется

непосредственно сам силикагель, что приводит к потере механической стабильности и последующему проседанию частиц сорбента [33].

В целях снятия ограничений в использовании сорбентов на основе силикагеля для получения более устойчивых неподвижных фаз применяют альтернативные ему матрицы на основе неорганических оксидов и органических полимеров. На сегодняшний день фазы на основе альтернативных матриц в основном используют в обращенно-фазовой и ионной хроматографии, либо сразу в нескольких режимах хроматографии [34]. Диоксиды титана и циркония, графитированная сажа, органические полимеры отличаются высокой химической и гидролитической устойчивостью и механической прочностью, что представляет интерес для их применения в качестве сорбентов для хроматографии [35, 36, 37, 31, 38]. Оксиды металлов характеризуются высокой активностью поверхности и малой коммерческой доступностью. Также необходим поиск путей модифицирования данных оксидов [39].

Наиболее перспективными альтернативными матрицами являются органические полимеры. Подавляющее большинство полимерных неподвижных фаз состоят из сополимеров стирола и дивинилбензола, метакрилата и поливиниловых спиртов. Эти материалы могут быть изготовлены с широким диапазоном пористости и размеров частиц. Основная причина большой популярности полимерных матриц заключается в гидролитической стабильности в широком диапазоне рН. Матрицы на основе сополимера стирола и дивинилбензола стабильны в диапазоне рН 0–14, другие полимерные сорбенты — при значениях рН 2–12. Более того, к преимуществам органических полимеров относится высокая плотность прививки активных центров [32].

Однако для реализации гидрофильного режима необходима гидрофилизация поверхности такого рода матриц. В таком случае, согласно данным работы [31], переход от матриц на основе силикагеля к таковым на основе гидролитически стабильных ароматических сополимеров является эффективным способом создания многофункциональных неподвижных фаз. Сорбенты с подобной архитектурой позволяют работать в режимах ионной, гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии (ОФ ВЭЖХ) благодаря наличию ионообменных центров и формированию гидрофильного функционального слоя на поверхности

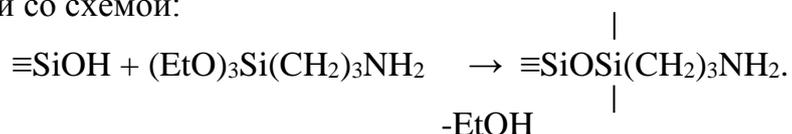
гидрофобной ароматической матрицы, обеспечивающей удерживание неполярных веществ. Поэтому актуальным является поиск путей гидрофилизации органических полимеров [31, 40, 41, 42].

### 1.3. Подходы к созданию гидрофильных функциональных слоев

Существует несколько путей закрепления функциональных групп на поверхности частиц. Первым появилось адсорбционное модифицирование матрицы, обладающее существенным недостатком: нанесенная фаза с течением времени может смываться подвижной фазой, насыщенной органическим растворителем. Именно поэтому сегодня химическое модифицирование является основным способом синтеза стабильных сорбентов [43].

Процесс модифицирования обычно включает активацию и функционализацию поверхности. Поверхности, которые используют в качестве рассмотренных выше матриц, имеют либо неорганическую основу, такую как силикагель, диоксид циркония, диоксид титана, либо органическую основу на основе полимеров. Им необходима активация поверхности для увеличения гидрофильности за счет групп, таких как, например, -ОН, -СООН и -NH<sub>2</sub>. На следующем этапе проводят функционализацию поверхности [44].

Традиционно используемые пути ковалентного закрепления функционального слоя на силикагеле, представляющем самую распространенную матрицу для гидрофильных сорбентов, — хлорметилирование силанольных групп поверхности, а также их взаимодействие с органохлорсиланами или органоалкоксиланами. Аминопропилсиликагель получают модифицированием поверхности силикагеля коммерчески доступным аминопропилтриэтоксисиланом [45] в соответствии со схемой:



Аминопропилсиликагель является одной из первых фаз для гидрофильной хроматографии и остается одной из самых распространенных [2]. Аминофазы более популярны в определении углеводов, чем немодифицированный силикагель, так как они способствуют быстрой мутаротации, предотвращающей получение двойных или несимметричных пиков вследствие неполного разрешения аномеров. Тем не менее, при использовании таких сорбентов существуют некоторые

проблемы, так как аминопропильная фаза реакционноспособнее других неподвижных фаз для гидрофильной ВЭЖХ, и на ней может происходить необратимая адсорбция, особенно кислотных соединений [7]. Однако именно реакционноспособные аминогруппы являются перспективными для последующей функционализации с целью увеличения гидрофильности, селективности и эффективности получаемых сорбентов, что позволяет использовать аминопропилсиликагель в качестве матрицы для дальнейшего модифицирования при создании новых неподвижных фаз. Так, разнообразны реакции карбонильных соединений с аминопропильными группами, которые используют для синтеза сорбентов, в том числе и для гидрофильной хроматографии. Например, в работе [46] для создания гидрофильной фазы Chocolate HILIC на основе аминопропилсиликагеля была применена реакция Майяра. Силикагель с аминопропильными группами также легко вступает во взаимодействие с галогенсодержащими соединениями разнообразного строения [32]. Таким путем был получен многофункциональный сорбент для обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии при взаимодействии аминопропилсиликагеля и ацилхлорид каликс[4]арена, модифицированного тетрапролином [47]. Распространенным методом создания новых неподвижных фаз является реакция аминогрупп с различными кислотами, в том числе и с полимерными. Например, в работе [48] на поверхности аминопропилсиликагеля была иммобилизована гуминовая кислота, в работе [20] — полимолочная кислота, а полученные сорбенты успешно были применены как в ОФ ВЭЖХ, так и в ГИХ. Также синтез новых фаз может включать взаимодействие реакционноспособных аминогрупп с эпоксидными кольцами [49, 50]. Так, реакция аминопропилсиликагеля с диглицидиловыми эфирами различного строения позволяет создавать дендримерные структуры при повторении циклов модифицирования [51] либо увеличивать количество закрепляемых функциональных групп и осуществлять их удаление от поверхности матрицы.

Таким образом, 3-аминопропилсиликагель представляет собой одну из самых распространённых и успешно применяемых активированных матриц для дальнейшей функционализации и создания новых неподвижных фаз, содержащих как гидрофильные, так и гидрофобные фрагменты.

### 1.3.1. Использование клик-химии для формирования новых слоев

В настоящее время в связи с усложнением решаемых аналитических задач синтез новых селективных неподвижных фаз требует еще более сложных процедур ковалентного модифицирования и функционализации. Например, для одновременного введения в функциональный слой сорбентов различных групп сначала получают соответствующие селекторы и только после этого закрепляют их на поверхности матрицы на основе силикагеля [52, 53, 54].

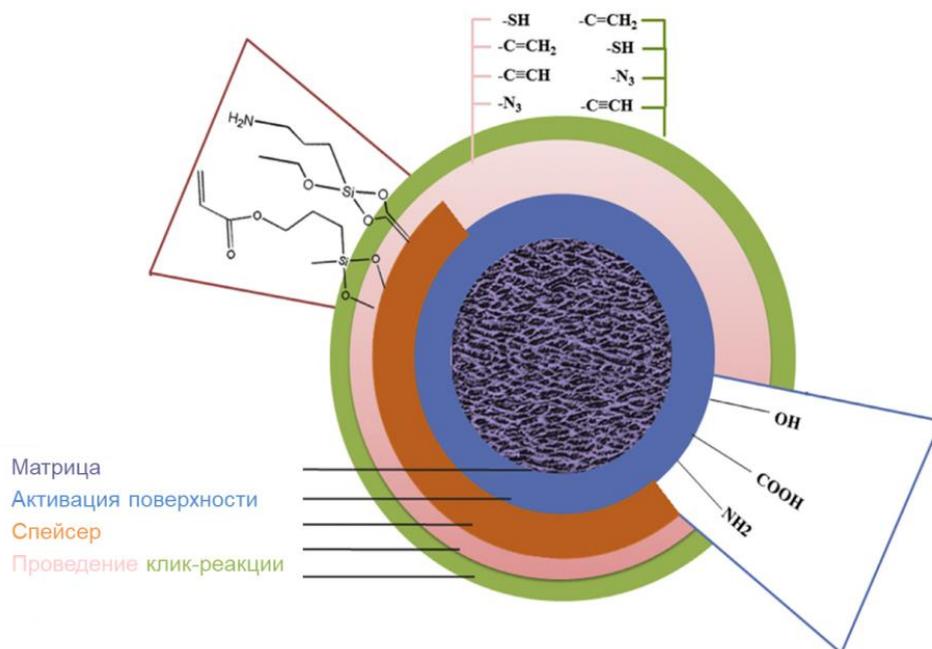


Рис. 6. Стадии модифицирования поверхности матриц и получения новых фаз с помощью клик-реакций [44].

Для получения новых фаз проводят реакции с функциональными группами, уже закрепленными на поверхности силикагеля. Наиболее популярными группами, уже закрепленными на матрице, являются азидогруппы [55, 27], позволяющие проводить последующее азид-алкиновое циклоприсоединение, реакционноспособные эпоксидные кольца [55], при раскрытии которых можно также вводить разнообразные функциональные группы, а также винильные группы для осуществления «тиол-еновой» реакции [24]. Эти типы реакций относят к **клик-реакциям**, особенностями и преимуществами которых являются простые условия проведения, широкая область применения, высокий выход, легкое удаление побочных продуктов. Поэтому методы клик-химии приобрели популярность в синтезе неподвижных фаз благодаря простоте получения сорбентов с заданной структурой. Стадии модифицирования поверхности матриц и получения новых

фаз, включающие активацию поверхности и ее дальнейшую функционализацию с помощью клик-реакций, приведены на рис. 6. Важно отметить, что иногда используют спейсер в качестве молекулы, обеспечивающей связь между активированной поверхностью и группой, необходимой для дальнейшего модифицирования.

Так, в работе [56] сорбент Click Maltose был получен по клик-реакции азид-алкинового циклоприсоединения: модифицировали азидопропилсиликагель с помощью 1-пропаргил-О-мальтозы (рис. 7). Сорбент Click Maltose показал высокую селективность по полярным веществам, особенно по сахарам. Так, с использованием колонки длиной 15 см возможно разделить смесь 7 моно-, ди- и трисахаридов за 15 минут с эффективностью до 60000 тт/м. Также авторы показали, что в удерживании веществ данного класса играет большую роль образование водородных связей между молекулами сахаров и неподвижной фазой.

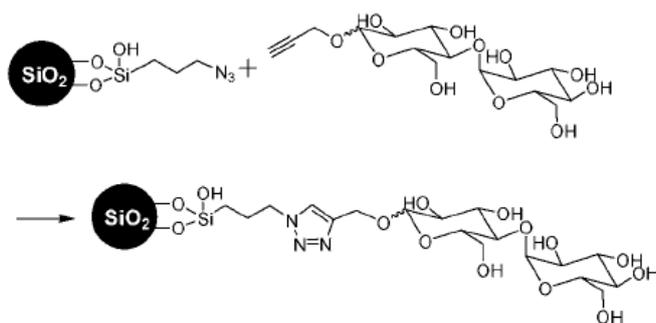


Рис. 7. Схема синтеза сорбента Click Maltose [56].

### 1.3.1.1. Реакция Уги

Четырехкомпонентная реакция Уги — это клик-реакция, характеризующаяся высокими выходами и большой вариативностью в выборе исходных соединений. В данной реакции принимают участие амин, карбонильное соединение, изоцианид и карбоновая кислота (рис. 8), продукт реакции представляет собой  $\alpha$ -ацетоамидокарбоксамид.

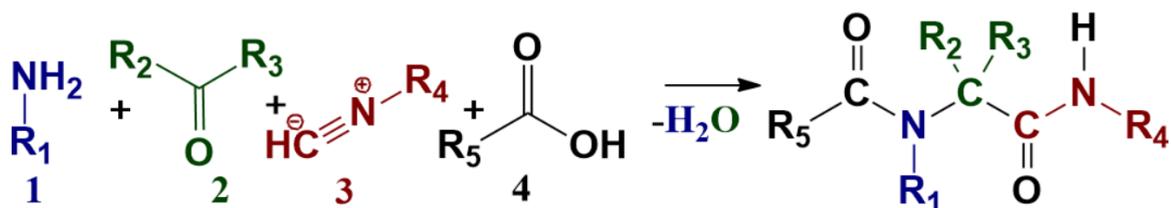


Рис. 8. Схема реакции Уги.

В качестве амина в реакции Уги может выступать любое соединение с достаточной нуклеофильной группой -NH: аммиак, первичные и вторичные амины. Все альдегиды и кетоны (кроме диарилкетонов) могут участвовать в реакции Уги. На выбор изоцианида и карбоновых кислот ограничений не выявлено. Возможно использовать в реакции в качестве исходных веществ также бифункциональные, (например, кетокислоты и аминокислоты) и полимерные соединения. Согласно [57] известно 95398 коммерчески доступных первичных и вторичных аминов, 10982 различных альдегидов, 2158 карбоновых кислот и 644 изоцианида (известно около 3000, однако не все из них коммерчески доступны) с общим количеством  $1,5 \times 10^{15}$  возможных вариаций компонентов в реакции. Коммерчески доступные изоцианиды представлены гораздо меньшим разнообразием, хотя они могут быть получены, например, дегидратацией соответствующих формамидов с помощью  $\text{POCl}_3$  в присутствии  $\text{Et}_3\text{N}$  [58]. Таким образом, главным преимуществом реакции Уги является возможность получения огромного числа производных в одну стадию из простых и доступных исходных соединений. Реакция может быть проведена не только в растворе, но и в твердой фазе [59, 60].

В качестве растворителей для реакции Уги обычно используют протонные растворители, такие как низкомолекулярные спирты, например, метанол и этанол, которые способствуют образованию имиона и иминиевого иона за счёт стабилизации водородными связями. Апротонные растворители: хлороформ, дихлорметан, тетрагидрофуран применяют реже. [61]. Скорость реакции Уги зависит от концентраций реагентов, которые должны быть высокими (0.5-1 М). Однако М.Н. Иванцова в работе [62] показала, что изменение концентрации изоцианида в диапазоне 0.0625-0.5 М не оказывает заметного влияния.

Для увеличения выхода реакции Уги возможно несколько способов: применение катализатора — кислоты Льюиса, что может повысить реакционную способность промежуточного продукта — основания Шиффа (имиона). Еще один подход заключается в проведении предварительной конденсации амина и карбонильного соединения для образования основания Шиффа (имиона), которое дальше вступает в реакцию с остальными компонентами. Именно поэтому поочередное добавление в ряде случаев реагентов оказывается предпочтительным. Также такой способ уменьшает протекание побочной реакции Пассерини (рис. 9),

которая протекает без аминокомпонента [59]. На протекание данной реакции также влияет выбор растворителя. В работе [63] показано, что использование полярных протонных растворителей замедляет реакцию Пассерини в отличие от реакции Уги, что подтверждает выбор данного типа растворителей при проведении последней. Увеличению скорости реакции также способствует замена кетона на альдегид [64]. Примеры, демонстрирующие влияние описанных факторов на выход основного продукта реакции Уги, приведены в табл.1.

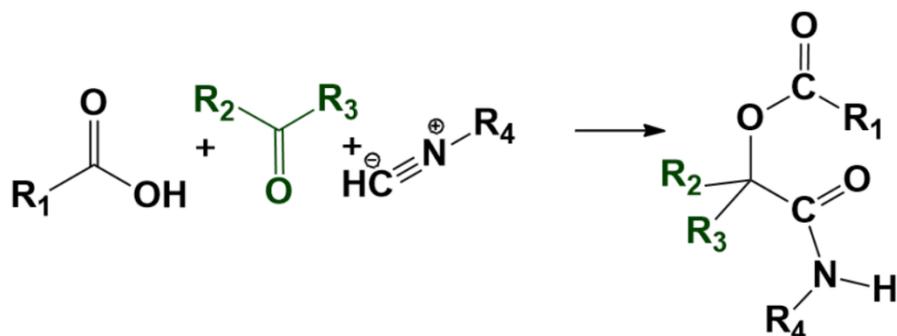


Рис. 9. Схема реакции Пассерини.

Увеличение времени синтеза приводит как правило к увеличению выхода продукта реакции. В целом, все условия реакции: растворитель, катализатор, соотношение реагентов, температуру подбирают для каждого набора реагентов индивидуально, чтобы обеспечить увеличение выхода продукта реакции Уги. Аналогичные тенденции по увеличению выхода продукта реакции характерны для компонентов с похожей структурой.

Более того, в работе [65] было продемонстрировано успешное использование реакции Уги на твердых носителях — полистирольных смолах. Авторы подтвердили протекание реакции и получение продукта методом ЯМР-спектроскопии.

Таблица 1. Влияние различных факторов на выход продукта реакции Уги

Исходные вещества* (эквимольные количества)	T, °C	Вре- мя, ч	Растворитель (M)	Кат.	Выход, %	Ссы- лка
Анилин	<b>25</b>	<b>4</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	–	<b>66</b>	[66]
Бензальдегид	25	4	CCl <sub>4</sub>	–	49	
Бензойная кислота	25	4	MeOH	–	46	
<i>Трет</i> -бутилизотиоцианид	25	4	CH <sub>3</sub> CN	–	36	
	25	4	EtOH	–	23	
N-(5-аминопентил)-5- изоцианопентамид	25	12	MeOH (0.01)	–	48	[67]
Формальдегид	25	24	MeOH (0.01)	–	60	
2-фенилуксусная кислота	25	12	MeOH (0.01)	ZnCl <sub>2</sub>	43	
	<b>25</b>	<b>12</b>	<b>CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (0.01)</b>	–	<b>65</b>	
	25	12	CF <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH (0.01)	ZnCl <sub>2</sub>	25	
(R)-1-фенил-этиламин	<b>20</b>	<b>210</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	–	<b>61</b>	[68]
Циклогексанон	0	6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	–	31.5	
Уксусная кислота	0	6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	25.1	
Метилловый эфир (S)-2- изоциано-3- фенилпропионовой кислоты	0	6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	3.6	
	0	6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BF <sub>3</sub> · OEt <sub>2</sub>	16.5	
	0	42	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	BF <sub>3</sub> · OEt <sub>2</sub>	34.2	
	0	6	MeOH	BF <sub>3</sub> · OEt <sub>2</sub>	17.4	
	0	6	CH <sub>3</sub> CN	BF <sub>3</sub> · OEt <sub>2</sub>	39.2	
Бензиламин	25	48- 72 /1	MeOH	–	13/49	[69]
4-(Бензилсульфанил)- бутан-2-он / <b>3-(Бензилсульфанил)- пропаналь</b> Уксусная кислота Этилизоцианацетат	<b>25</b>	48- 72/1	<b>CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH</b>	–	43/72	
5-метил-(S)-глутамат	40	48	MeOH	–	30	[70]
2,4-диметокси-3- метилбензальдегид	25	24	MeOH	TiCl <sub>4</sub>	60	
2,6-диметилфенил- изоцианид	25	72	MeOH	ZnCl <sub>2</sub> · OEt <sub>2</sub>	50	
	25	144	MeOH	Cu(OAc) <sub>2</sub>	37	
5-метил-(S)-глутамат	25	12	MeOH	–	51	
3,5-дигбромо-4- гидроксibenзальдегид <i>Трет</i> -бутилизотиоцианид **	<b>25</b>	<b>12</b>	<b>MeOH</b>	<b>TiCl<sub>4</sub></b>	<b>86</b>	
n-бутиламин	25	72	MeOH	–	34***	[71]
N-метилизатин	<b>25</b>	<b>48</b>	<b>MeOH</b>	<b>InCl<sub>3</sub></b>	<b>65***</b>	
Хлоруксусная кислота	25	72	CF <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	InCl <sub>3</sub>	50****	
<i>Трет</i> -бутилизотиоцианид	25	48	MeOH	ZnCl <sub>2</sub>	44****	
Бутиламин	25	24	MeOH	–	34	[72]
Гептаналь	60	24	Толуол	–	50	
3-гидрокси- фенилуксусная кислота	<b>60</b>	<b>21</b>	<b>Толуол</b>	<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	<b>60</b>	
Этил 3-(4-фторо-3- нитрофенил)-2- изоцианопропионат*****	60	24	Толуол	LiBr	35	

\* Реагенты расположены в порядке смешения, представляющем собой в большинстве случаев последовательное добавление кислоты и изоцианида к смеси амина с карбонильным соединением; \*\* реагенты взяты в соотношении 1:1:1.2 соответственно; \*\*\* в соотношении 1.5:1:1.5:1.5; \*\*\*\* в соотношении 1.2:1:1:1.2; \*\*\*\*\* в соотношении 2.2:2.2:2.2:1.

Реакцию Уги можно также использовать для модифицирования боковых или концевых групп полимеров, что необходимо для получения многофункциональных полимерных соединений. Клик-реакции в данном случае характеризуются высокой эффективностью и почти количественными выходами в отличие от обычных реакций, которые неэффективно и медленно протекают ввиду стерических затруднений, присущих полимерным цепям [73].

Авторы [74] использовали реакцию Уги для взаимодействия двух полимеров (рис. 10): полиметилметакрилата с концевыми бензальдегидными группами и метоксиполиэтиленгликоля с концевыми анилиновыми группами, которые использовали в качестве карбонильного соединения и аминокон компонента, соответственно. Применили коммерчески доступные циклогексилизотиоцианид и разные карбоновые кислоты для включения разных функциональных групп к блок-сополимерам. Реакцию проводили без добавления катализатора в метаноле при комнатной температуре.

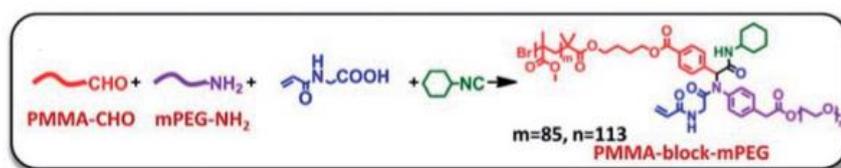


Рис. 10. Схема реакции Уги с участием двух полимерных соединений [74].

Авторами [75] показано, что для модифицирования полиаминополистирола по реакции Уги не подходит одновременное смешение всех четырех реагентов в метаноле. Было показано, что растворитель необходимо выбирать, учитывая как эффективность реакции, так и растворимость полимерных соединений. Выбрали смесь метанола и диметилформамида (ДМФА), ввиду плохой растворимости полимера в метаноле и низкой конверсии реакции исключительно в ДМФА. Чтобы избежать побочной реакции Пассерини, использовали метод последовательного добавления реагентов в соответствии с механизмом реакции. В результате всех изменений традиционного проведения реакции в метаноле конверсию увеличили с 71% до 99%. Однако, авторы [75] подчеркивают, что в данном случае для полной конверсии полимера требуется минимум 72 часа. Кроме того, возможна гетерофазная реакция Уги с полимерными соединениями. Так, в работе [76] ее успешно использовали для модифицирования двумя разными полимерами магнитных наночастиц на основе оксида железа Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

### 1.3.1.2. Использование реакции Уги для формирования новых слоев.

На сегодняшний день известно небольшое количество работ, посвящённых созданию новых неподвижных фаз по реакции Уги. С ее помощью чаще всего получают сорбенты для аффинной и хиральной хроматографии [77,78,79], реже — для смешанного режима [52,80]. Обычно сначала получают селектор с необходимыми функциональными группами, лишь затем его ковалентно закрепляют на поверхности матрицы.

В работе [52] многокомпонентную реакцию Уги использовали для создания цвиттер-ионных селекторов, которые получали взаимодействием двух разных альдегидов и изоцианидов и 1-аминометилфосфоновой кислоты и в метаноле под действием микроволнового излучения. Одну часть соответствующих полученных селекторов сразу использовали для дальнейшего модифицирования, вторую — предварительно гидролизовали. Только после очистки полученные таким образом аминфосфонатные цвиттер-ионные селекторы закрепляли с использованием тиоленовой клик-реакции на поверхности матрицы, представляющей собой силикагель, модифицированный тиопропилом.

Успешное модифицирование матрицы селекторами подтвердили с помощью элементного анализа. Полученные сорбенты благодаря гидрофобным, гидрофильным и цвиттер-ионным фрагментам в функциональных слоях обеспечили удерживание неполярных, полярных и заряженных соединений (рис. 11).

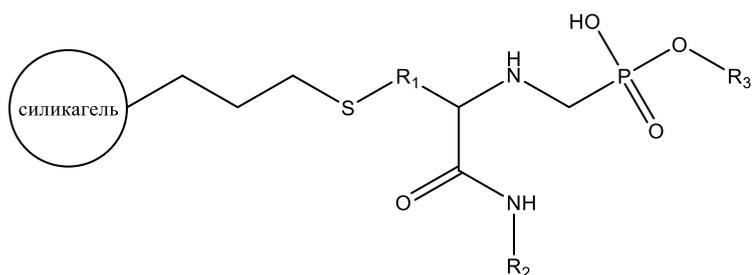


Рис. 11. Структура функционального слоя сорбента. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> – фрагменты альдегида и изоцианида, используемых в реакции Уги, соответственно, R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub> или H, соответствующие негидролизованному и гидролизованному селектору [52].

Авторами показаны возможности управления селективностью разделения разных классов модельных соединений путем варьирования структуры исходных реагентов в реакции Уги. Так, удерживание нуклеозидов (рис. 12) изменяется при замене структурного фрагмента селектора от *трет*-бутилизоцианида (SP1) на

2-морфолиноэтилизоцианид (SP3) а также при использовании вместо 2,2-диметилпент-4-еняля (SP1) ундек-10-еняля (SP5). Эффективность во всех случаях составляла до 10000 тт/м (оценено для гуанозина по хроматограммам на рис. 12).

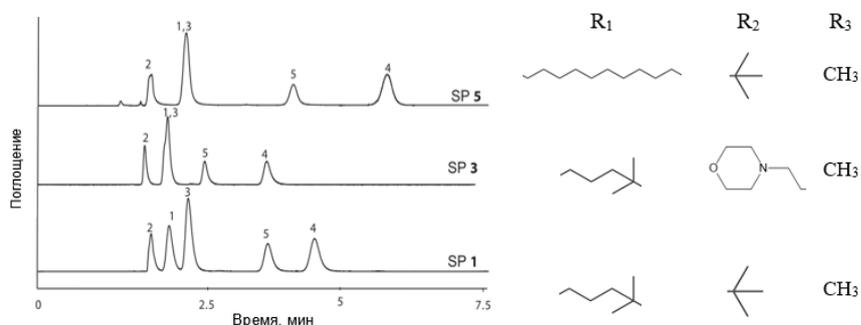


Рис. 12. Хроматограммы смеси нуклеозидов на SP1, SP3, SP5. Условия разделения: ПФ: ААВ/CH<sub>3</sub>CN 10/90 об.% (5 мМ – концентрация буферного раствора в элюенте, рН 8.0). 1 – Аденозин, 2 – тимидин, 3 – уридин, 4 – гуанозин, 5 – цитидин. УФ-детектирование при 220 нм. Скорость потока — 1.7 мм/с. [52].

Таким образом, использование предложенного подхода [52] для синтеза новых фаз открывает широкие синтетические возможности и способность управления их селективностью благодаря варьированию исходных реагентов. Также, благодаря возможности включения в функциональный слой фрагментов различной природы, данный подход позволяет создавать сорбенты с мультимодальными свойствами. Основным недостатком является многостадийность получения фаз.

Для преодоления данного недостатка и получения сорбента в одну стадию возможно использование коммерчески доступного аминированного силикагеля в качестве компонента реакции Уги. В работе [80] была получена серия сорбентов с помощью реакции Уги, в результате взаимодействия аминопропилсиликагеля с различными альдегидами, карбоновыми кислотами и *трет*-бутилизоцианидом в метаноле (рис. 13). Структура ковалентно закреплённых фрагментов была подтверждена физико-химическими методами: элементным анализом и рамановской спектроскопией.

Матрица была модифицирована по реакции Уги различными функциональными группами: фенильными и длинными алкильными радикалами, фрагментами холевой, фенилборной кислоты, глюкозы, аргинина и бетаина. Варьирование компонентов данной реакции позволило получить разнообразные

сорбенты с различной селективностью, которые можно использовать для разделения полярных, неполярных и заряженных веществ. Так, фаза Glu-Et с гидрофильным глюкозным фрагментом обеспечила самое высокое удерживание гидрофильных соединений, таких как азотистые основания и нуклеозиды, среди всех сорбентов. Наибольшее удерживание алкилбензолов наблюдали для сорбентов с иммобилизованной длинной алкильной цепью (Palmitoyl-Et), средние коэффициенты удерживания — на фазах, содержащих фенильный, стероидный и фенилборный фрагменты. На фазе Palmitoyl-Et возможно разделение 5 алкилбензолов за 12 мин с эффективностью до 60000 тт/м. Сорбенты, содержащие ионообменные группы и глюкозный фрагмент, в свою очередь обеспечивали низкое гидрофобное взаимодействие с алкилбензолами [80].

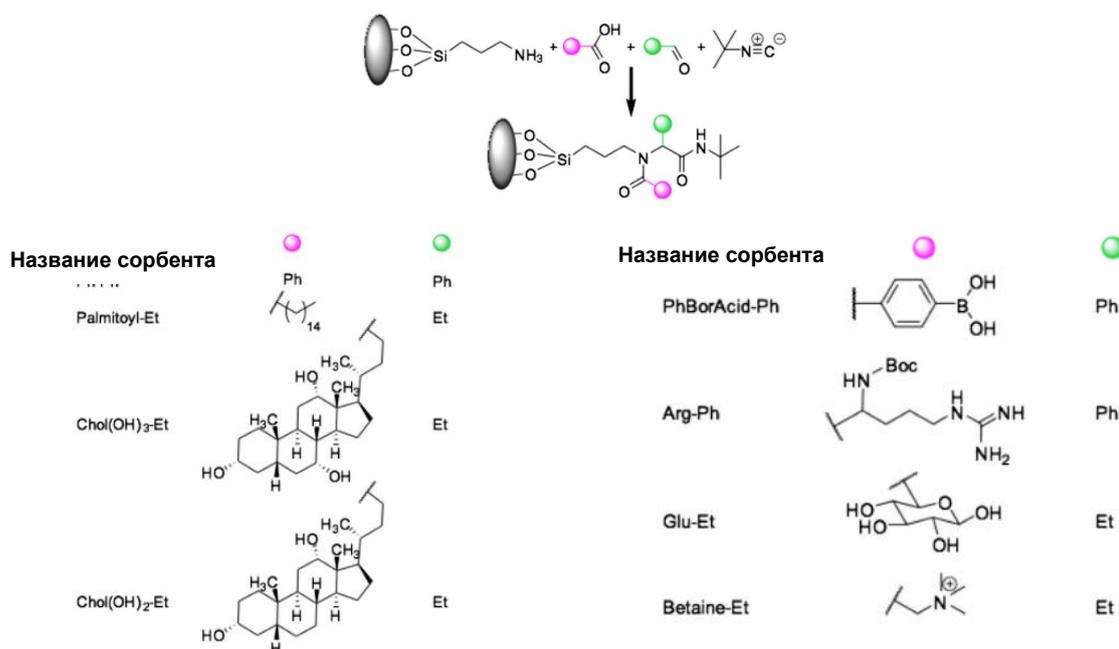


Рис. 13. Схема синтеза и структурная формула продукта реакции Уги [80].

Таким образом, преимуществами реакции Уги для синтеза сорбентов являются: высокий выход, быстрота протекания, мягкие условия проведения [59]. С ее помощью можно проводить ковалентное модифицирование поверхности аминированного силикагеля. Такой способ синтеза неподвижной фазы уникален в своем роде, поскольку в реакции непосредственно участвует аминированная матрица, и образующийся структурный фрагмент сразу закрепляется на ней.

### 1.3.2. Использование полимеров для формирования новых слоев

Модифицированный полимером сорбент сочетает в себе преимущества и матрицы, чаще всего силикагеля, и полимера-модификатора, среди которых и

высокая устойчивость к неспецифической адсорбции, лучшая гидролитическая стабильность, а также чрезвычайно высокая плотность функциональных групп [81]. Создание поверхностного полимерного функционального слоя может привести к экранированию матрицы и снизить ее негативное влияние на удерживание аналитов. Использование определенных полимеров позволяет увеличить гидрофильность формируемых функциональных слоев и управлять селективностью сорбентов. Для получения такого рода материалов используют два подхода: полимеризация мономеров на поверхности матрицы [82, 83, 84, 85, 86, 87] или модифицирование поверхности готовыми или заранее синтезированными полимерами [20, 88-89]. К настоящему моменту первая стратегия привлекла больше внимания, потому что с ее помощью можно получать полимерные цепи с большей плотностью, однако недостатком в данном случае является сложность контроля самой полимеризации. Согласно [32] второй подход также перспективен. Это связано с тем, что уже известен широкий арсенал полимеров с известной структурой и молекулярно-массовым распределением, при необходимости достаточно просто может быть синтезировано полимерное соединение с требуемыми характеристиками. Однако необходимо подчеркнуть, что во втором случае из-за большого молекулярного размера полимеров существует стерический эффект, ограничивающий возможности взаимодействия с матрицей [88]. Именно поэтому реакция модифицирования матрицы полимером должна быть высокоэффективной и быстрой. Как было отмечено ранее, этим требованиям как раз удовлетворяют клик-реакции.

Так, авторы [86] получили сорбент с полиитаконовой кислотой в функциональном слое Sil-PIA. Итаконовая кислота была гомополимеризована на поверхности силикагеля посредством реакции поверхностной радикальной передачи цепи с использованием глубокого эвтектического растворителя. Сорбент показал высокую эффективность до 60000 тг/м и селективность по полярным соединениям, а также возможность разделения гинсенозидов. Так же хорошие результаты наблюдали для фазы с полиакриловой кислотой в слое (Sil-PAA), полученной аналогичным образом [87], и фазы с полимолочной кислотой (PLLA) [20]. В свою очередь сорбент с полимолочной кислотой в слое получали вторым способом, то есть модифицированием матрицы готовым полимером: проводили

реакцию между аминогруппами аминопропилсиликагеля и карбоксильными группами полимолочной кислоты на конце цепи. На рис. 14 приведены структуры вышеупомянутых сорбентов.

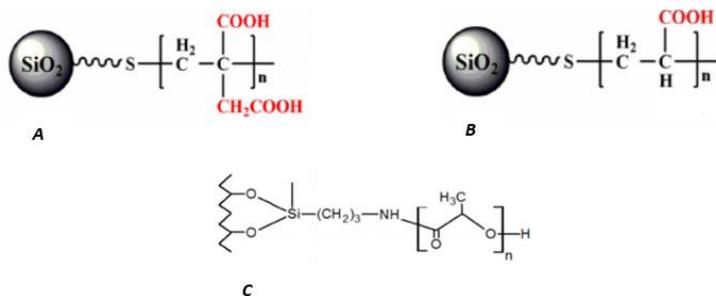


Рис. 14. Структуры фаз (А) с полиитаконовой, (В) с полиакриловой, (С) с полимолочной кислотой [20, 86].

На рис. 15 представлены хроматограммы разделения 10 азотистых оснований и нуклеозидов на фазах Sil-PIA и Sil-ПАА. Введение полиитаконовой кислоты в функциональный слой в отличие от полиакриловой позволило разделить 10 веществ данных классов за 15 минут с эффективностью до 60000 тт/м. Благодаря наличию гидрофобных фрагментов в структуре полимерных кислот, все три сорбента можно использовать в обращенно-фазовом режиме для разделения гидрофобных соединений, таких как нафталин, бензол, толуол, этилбензол, бутилбензол, антрацен и фенантрен [86].

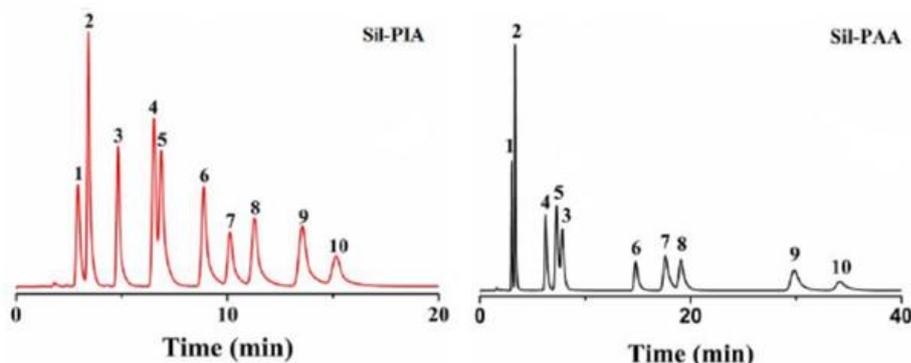


Рис. 15. Хроматограммы разделения десяти азотистых оснований и нуклеозидов на сорбентах Sil-PIA и Sil-ПАА. ПФ:  $\text{CH}_3\text{CN}/50 \text{ mM ААБ}$  (90/10, об./об.). 1 — Тимин, 2 — тимидин, 3 — уридин, 4 — аденин, 5 — аденозин, 6 — цитозин, 7 — инозин, 8 — гуанин, 9 — цитидин, 10 — гуанозин. УФ-детектирование при 254 нм. Скорость потока — 1.0 мл/мин. Температура колонки 30°C [86].

Для создания сорбентов, используемых в обращенно-фазовой, нормально-фазовой, гидрофильной, хиральной хроматографии, помимо упомянутых выше поликислот, применяли полиамиды, полиамины, полисахариды и другие полимерные соединения [81,90]. Далее рассмотрим некоторые примеры

модифицирования силикагеля с помощью уже готовых или синтезированных заранее полимеров, которые привели к получению фаз для гидрофильной хроматографии.

Авторы [88] синтезировали неподвижную фазу путем взаимодействия активированного гидрофильного полиакриламида и алкенилмодифицированного силикагеля с помощью «тиол-еновой» клик-химии (рис. 16). Новая фаза ТЕ-UPAM продемонстрировала увеличение факторов удерживания и селективности по азотистым основаниям и нуклеозидам, лучшую эффективность до 20000 тт/м по сравнению с силикагелем при разделении данных модельных веществ.

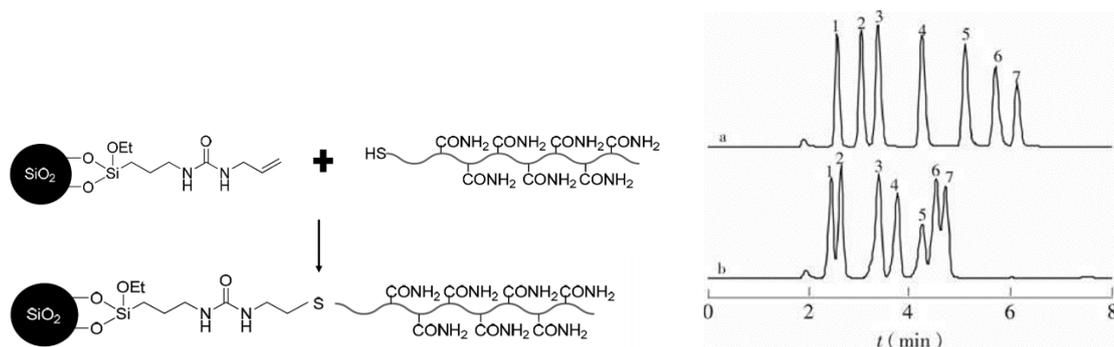


Рис. 16. Схема синтеза и предполагаемая структура фазы с полиакриламидом (слева). Хроматограмма модельной смеси азотистых оснований и нуклеозидов (сверху, справа) на фазе ТЕ-UPAM и на силикагеле (снизу, справа). Подвижная фаза: 100мМ АФБ/ацетонитрил (10/90 об. %). Скорость потока — 1 мл/мин. УФ-детектирование при 254 нм. 1 — урацил, 2 — 5-метилуридин, 3 — аденозин, 4 — цитозин, 5 — цитидин, 6 — ксантозин, 7 — гуанозин [88].

В работе [89] силикагель ковалентно модифицировали полиэтиленгликолем, проводя клик-реакции между amino- и эпоксидными группами (рис. 17, слева). Показано, что увеличение количества полимера на стадии синтеза ведет к увеличению толщины функционального слоя и влияет на гидрофильность сорбентов, однако приводит к существенному уменьшению эффективности. Последнее вероятно связано с бóльшим сопротивлением массопереносу в таком функциональном слое. Сорбент с меньшим количеством нашиваемого полимера демонстрирует хорошую разделяющую способность: разделение 6 углеводов возможно за 18 мин с эффективностью до 15000 тт/м (рис. 17, справа). Также полученные сорбенты обеспечили разделение 7 витаминов за 16 минут и 7 аминокислот за 40 минут с эффективностью до 40000 тт/м [89].

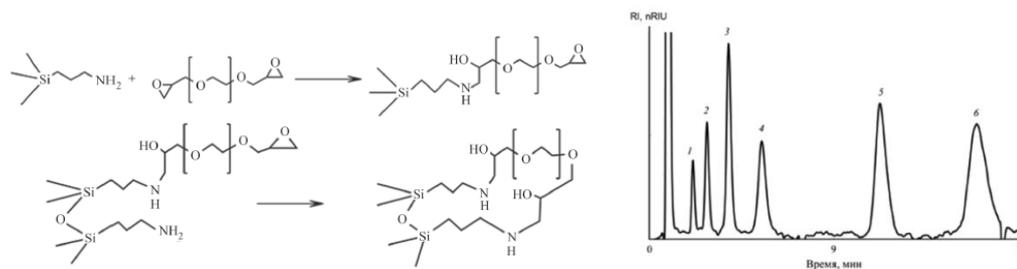


Рис. 17. Схема синтеза и предполагаемая структура сорбентов с полиэтиленгликолем (слева). Хроматограмма модельной смеси сахаров (справа). Подвижная фаза: вода/ацетонитрил (15/85 об. %). Скорость потока — 1 мл/мин. Рефрактометрическое детектирование. 1 — рибоза, 2 — фруктоза, 3 — ксилоза, 4 — глюкоза, 5 — сахароза, 6 — лактоза. [89].

В работе [91] получены неподвижные фазы на основе силикагеля, ковалентно модифицированные полиэтиленимином. На разработанных сорбентах показана возможность разделения 5 азотистых оснований и нуклеозидов за 15 мин с эффективностью до 57000 тт/м, 6 сахаров за 16 мин. Интересно отметить, что полученные фазы продемонстрировали хорошие хроматографические характеристики как в гидрофильной, так и в ионной хроматографии, поскольку поверхность, с первичными, вторичными и третичными аминогруппами может выступать в качестве анионообменника.

Интерес к сорбентам, содержащим полиэтиленимин, определяется также разнообразными возможностями его дальнейшей трансформации [32]. В работе была проведена последующая гидрофилизация функционального слоя, содержащего полиэтиленимин, с помощью глицидола, что привело к увеличению не только гидрофильности, но и эффективности по модельным соединениям [92]. Сорбент показал хорошую селективность и эффективность до 10000 тт/м при разделении смеси 5 углеводов за 8 минут. Показано, что для незаряженных и цвиттер-ионных полярных соединений увеличение гидрофильности слоя с помощью глицидола приводит к тому, что они удерживаются преимущественно по распределительному механизму.

Таким образом, использование полимеров для создания новых функциональных слоев может быть ключевым для изменения свойств различных матриц и повышения их гидрофильности. Сорбенты с полимерным привитым слоем, как правило, обеспечивают меньшую эффективность разделения по сравнению с сорбентами, функциональный слой которых содержит только мономерные группы. Однако они демонстрируют лучшую гидролитическую

стабильность благодаря многоточечной фиксации полимерного модификатора на поверхности матрицы [32]. Кроме того, ввиду разнообразия полимеров можно регулировать хроматографическую селективность фаз в широком диапазоне. Модифицирование готовыми полимерами имеет ряд преимуществ, однако для него необходимо выбирать реакции, способные обеспечить высокую эффективность связывания полимерного модификатора и матрицы, чаще всего для этой цели применяют клик-реакции.

### **1.3.3. Использование антибиотиков для формирования новых слоев**

На сегодняшний день практически отсутствуют работы, посвящённые созданию сорбентов с антибиотиками в слое именно для гидрофильной хроматографии. Гликопептидные антибиотики: ванкомицин, тейкопланин, ристоцетин А обычно используют в качестве хиральных селекторов для создания неподвижных фаз [93, 94, 95, 96].

Большую часть изучения свойств таких фаз всегда занимает хиральное разделение. На сорбентах на основе тейкопланина, ванкомицина и ристоцетина А разделяют энантиоизомеры нескольких классов веществ, включая N-защищенные аминокислоты,  $\beta$ -блокаторы и противовоспалительные препараты, лишь иногда не только в обращенно-фазовом, но и в гидрофильном режиме [97, 98]. Только в нескольких работах характеристика фаз с антибиотиками была распространена и на изучение удерживания ахиральных соединений, включая нейтральные и полярные образцы и неорганические ионы [99, 100, 101]. Так, на цвиттер-ионной колонке на основе силикагеля с ванкомицином было показано разделение в режиме гидрофильной хроматографии смеси урацила, аденозина, цитозина, а также смеси салициловой и ацетилсалициловой кислот, а на цвиттер-ионной колонке с тейкопланином — разделение некоторых полиолов [100].

Существует пример [102], когда иммобилизовали полипептидный антибиотик бацитрацин на поверхности аминопропилсиликагеля с использованием гексаметилендиизоцианата в качестве спейсера с целью получения сорбента для ГИХ. Бацитрацин (рис. 18, слева) имеет множество функциональных групп в боковых цепях, уникальную пространственную структуру и хорошую гидрофильность и, таким образом, может обеспечивать множество мест для межмолекулярных взаимодействий. Новая неподвижная фаза продемонстрировала

подходящие свойства для удерживания полярных соединений в режиме ГИХ. Показано, что для ряда веществ механизм разделения включает распределение, характерное для гидрофильного режима, а также и другие взаимодействия, например, электростатические. Фаза с бацитрацином продемонстрировала хорошую общую селективность разделения полярных веществ, однако отмечено, что форма пиков значительно хуже в сравнении с коммерчески доступными колонками. Хроматограмма разделения 8 азотистых оснований и нуклеозидов приведена на рис. 18, справа.

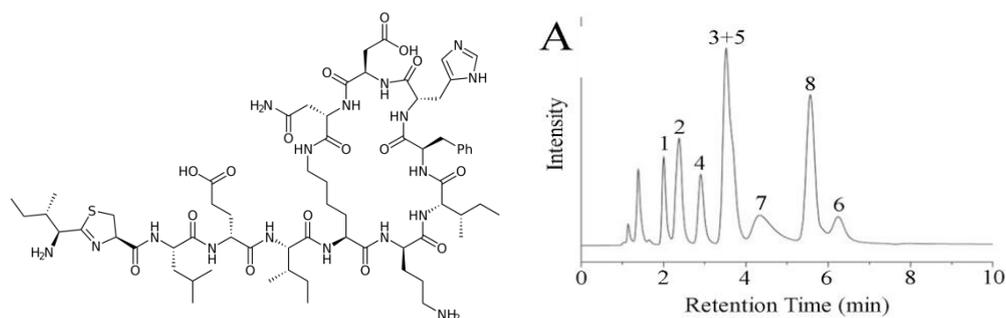


Рис. 18. Структура бацитрацина (*слева*) и разделение азотистых оснований и нуклеозидов (*справа*). Подвижная фаза: 5 мМ АФБ /ацетонитрил (10/90 об.%), pH 3.0. УФ-детектирование при 254 нм. Скорость потока — 1.0 мл/мин. 1 — 5-фторурацил; 2 — урацил, 3 — рибавирин, 4 — диданозин, 5 — 5-фторцитозин, 6 — ацикловир, 7 — аденин, 8 — цитозин [102].

Как отмечено выше, возможности таких селекторов, как ванкомицин, тейкопланин достаточно описаны в множестве статей [95,96,97], однако в настоящее время именно эремомицин в качестве селектора используют реже. Эремомицин, содержащий 22 хиральных центра (рис. 19), относится к препаратам ванкомициновой группы, в которую входят ванкомицин и тейкопланин, при этом эремомицин менее токсичен [103]. Впервые хиральный сорбент с эремомицином получен в 2006 году [104, 105]. Он представлял собой силикагель с эпокси группами с привитым к ним эремомицином. Синтезированный сорбент проявил высокую способность к энантиораспознаванию аминокислот и профенов [106, 107]. Большое количество карбоксильных и аминогрупп на поверхности антибиотиков обеспечивает достаточную гидрофильность, поэтому создание новых фаз с данными макромолекулами может быть перспективно для разделения полярных соединений. Также молекула эремомицина, содержащая карбоксильную, 3 амино- и 3 фенольных группы, а также 3 сахарных остатка (глюкоза и 2 эремозамина) является цвиттер-ионом из-за наличия в структуре групп, способных к диссоциации и протонированию.

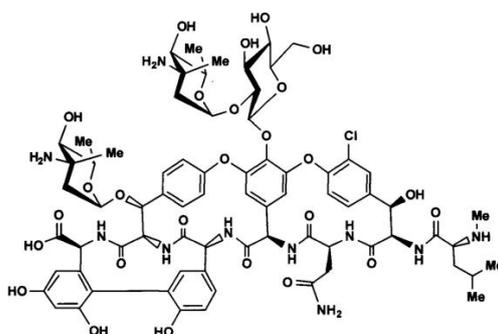


Рис. 19. Структура эремомицина [103].

Таким образом, необходимо подчеркнуть то, что несмотря на научный интерес к синтезу и дизайну новых гидрофильных ахиральных фаз, такой же интерес еще не возник в создании и применении хиральных фаз именно для гидрофильной хроматографии. Важно отметить, что большинство лекарств являются полярными и хиральными, разработка новых хиральных фаз для ГИХ и их всестороннее изучение или тестирование имеющихся фаз в гидрофильном режиме может быть крайне актуально особенно для фармацевтической промышленности, а также за ее пределами [108].

Как было отмечено в разделе 1.2 для реализации гидрофильного режима на гидролитически устойчивых сорбентах на основе полистирол-дивинилбензола необходима значительная гидрофилизация и экранирование поверхности такого рода матриц [31, 40, 41]. Альтернативным по сравнению с существующими способом экранирования гидрофобной матрицы может стать ковалентное закрепление гидрофильных макромолекул. Перспективными модификаторами для создания многофункциональных сорбентов на основе ПС-ДВБ являются гликопептидные антибиотики, среди которых эремомицин выделяется более высокой гидрофильностью. Модифицирование гидрофобной матрицы эремомицином с целью гидрофилизации ее поверхности может способствовать созданию многофункциональных сорбентов, что позволит определять как гидрофобные соединения в варианте ОФ ВЭЖХ, так и полярные биологически активные вещества в режиме ГИХ, а наличие хирального селектора может обеспечить разделение энантиомеров.

#### 1.4. Характеризация неподвижных фаз для ГИХ

На сегодняшний день получают все большее количество неподвижных фаз для ГИХ, и становится трудоемким выбирать подходящую колонку для решения конкретных аналитических задач из-за сложности механизма удерживания. Разработка способов характеристики гидрофильных сорбентов может создать руководство по их выбору и оптимизации условий разделения для определенных практических приложений. В данный момент единого способа характеристики гидрофильных неподвижных фаз не существует. Для этого пока используют различные физико-химические и хроматографические методы.

Среди первых методов можно выделить сканирующую электронную микроскопию, ИК-спектроскопию [109, 110], элементный анализ [111, 112], ЯМР-спектроскопию [113, 114], позволяющие косвенно судить о некоторых хроматографических свойствах неподвижной фазы, например, о ее гидрофильности. С помощью элементного анализа можно оценить степень покрытия матрицы на основе силикагеля новыми функциональными группами [32], однако если она небольшая, то и надежность определения может быть невелика. Часто необходима комбинация нескольких методов, например, в работе [115] новая неподвижная фаза была исследована с помощью ИК-спектроскопии, элементного анализа,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР и фотонной корреляционной спектроскопии. Следует отметить, что с помощью ИК-спектроскопии в данном случае не удалось получить информацию о структуре сорбента, так как область с частотами колебаний новых функциональных групп перекрывалась с областью колебаний функциональных групп матрицы на основе силикагеля. Однако даже комбинация физико-химических методов зачастую малоинформативна.

Для более детальной характеристики следует применять хроматографические методы. Среди них наиболее показательными и доступным является определение коэффициентов селективности пар веществ, отличающихся друг от друга конкретными фрагментами (тест Танака) [116, 117, 118, 119, 120] изучение удерживания набора тестовых аналитов в различных условиях разделения [16, 121]; а также установление механизмов удерживания и вклада электростатических взаимодействий по соответствующим уравнениям [1, 7].

### 1.4.1. Характеризация по коэффициентам селективности. Тест Танака

Для оценки вкладов вторичных взаимодействий в удерживание чаще всего определяют коэффициенты селективности специально подобранных пар веществ. Для характеристики неподвижных фаз используют тест Танака, разработанный специально для гидрофильных фаз [116,117]. Он позволяет классифицировать сорбенты в соответствии с их хроматографическими свойствами и селективностью и таким образом выбирать наиболее подходящие для каждой задачи.

В тесте Танака [116] используют пары или тройки соединений (рис. 20), которые отличаются друг от друга определенными фрагментами, отвечающими за тот или иной тип вторичных взаимодействий неподвижной фазы с определяемыми веществами. Для наглядного сравнения неподвижных фаз по коэффициентам селективности строят лепестковые диаграммы. Наиболее значимыми параметрами с точки зрения реализуемых механизмов удерживания в режиме ГИХ является фактор удерживания уридина, характеризующий гидрофильность сорбента, и катионо-, анионообменная селективность, отвечающие за вклад электростатических взаимодействий в удерживание заряженных соединений.

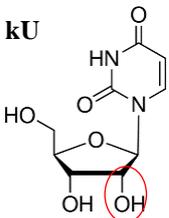
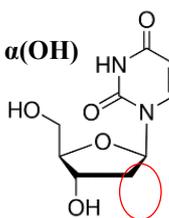
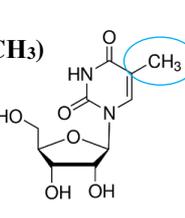
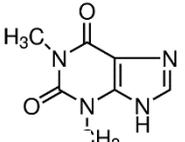
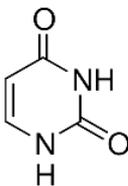
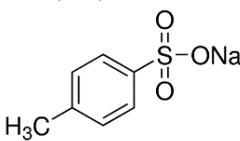
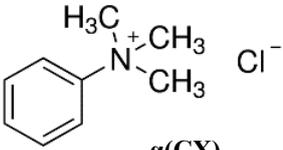
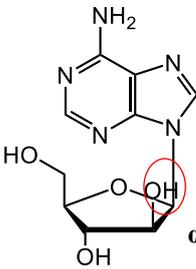
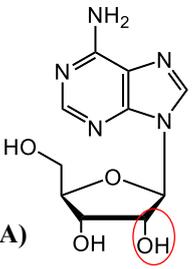
<p><b>kU</b></p>  <p>Уридин</p>	<p><b><math>\alpha(OH)</math></b></p>  <p>2'-дезоксисуридин</p>	<p><b><math>\alpha(CH_3)</math></b></p>  <p>5-метилуридин</p>	 <p>Теобромин (<math>pK_a=10</math>)</p>	 <p><b><math>\alpha(Tb/Tr)</math></b> Теофиллин (<math>pK_a=8,6</math>)</p>
<b>Гидрофильные/Гидрофобные взаимодействия</b>			<b>Кислотно-основная природа</b>	
 <p>Урацил</p>	<p><b><math>\alpha(AX)</math></b></p>  <p>п-толуолсульфонат натрия (SPTS)</p>	 <p><b><math>\alpha(CX)</math></b> N,N,N-триметилфенил-аммоний хлорид (TMPAC)</p>	 <p><b><math>\alpha(V/A)</math></b> Видарабин</p>	 <p>Аденозин</p>
<b>Селективность</b>	<b>Анионообменная</b>	<b>Катионообменная</b>	<b>По отношению к стереоизомерам</b>	

Рис. 20. Структуры соединений и параметры, используемые в тесте Танака (сверху) [116].

Результаты теста Танака коммерчески доступных фаз [116,117], а также для новых сорбентов, полученных в работах [122,123] приведены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты теста Танака для коммерческих фаз [116,117], а также для новых сорбентов, полученных в работах [41,92,122,123]

Название	мкм	Фаза/ функциональная группа	$kU$	$\alpha$ (AX)	$\alpha$ (CX)	$\alpha$ (Tp/Tb)	$\alpha$ (CH <sub>2</sub> )
Accucore HILIC	2.6	Силикагель	<b>3.75</b>	0.52	3.99	1.19	1.47
Synchronis Silica	5	Силикагель	3.15	0.58	5.61	1.15	1.30
Hypersil GOLD Silica	5	Силикагель	1.38	0.61	4.83	1.09	1.29
Hypersil GOLD Silica	1.9	Силикагель	1.34	0.55	5.95	1.10	1.25
Halo HILIC	2.7	Силикагель	0.64	—	<b>43.86</b>	1.26	1.16
Chromolith Si	—	Монолитный Силикагель	0.31	—	<b>20.30</b>	1.25	1.12
PolyHYDROXYETHYL	3	Полисукцинимидная	<b>3.92</b>	0.09	2.47	1.14	1.36
PolySULFOETHYL	3	Полисукцинимидная	1.58	—	7.66	1.00	1.48
Hypersil GOLD HILIC	5	Полиэтиленимин	2.28	1.88	0.55	1.00	1.33
COSMOSIL HILIC	5	Аминофаза	1.60	2.81	0.09	0.89	1.14
Sugar-D	5	Полиамин	1.58	5.18	—	0.52	1.44
NH <sub>2</sub> -MS	5	Аминопропильная	2.44	7.54	—	0.54	1.30
Acclaim Trinity P1	3	Технология гибридов нанополимеров на силикагеле	0.87	9.24	1.00	0.67	1.23
CYCLOBOND I	5	С привитым циклодекстрином	0.70	0.44	5.36	1.00	1.13
HILIC-OH5 [122]	2.7	Полигидрокси- фруктан	1.03	0.19	4.32	1.22	1.20
LiChrospher Diol	5	Диольная	1.50	0.01	3.27	1.04	1.15
Acclaim Mixed Mode HILIC-1	5	Алкильная цепь с концевой диольной группой	0.11	—	0.00	0.86	1.00
Hypersil Carb	5	Пористый графитированный углерод	<b>4.61</b>	0.74	—	0.91	0.53
Accucore Urea-HILIC	2.6	Мочевина	1.11	1.03	1.05	1.04	1.21
Synchronis HILIC	5	Цвиттер-ионная	<b>5.05</b>	0.72	1.12	1.00	1.48
ZIC-pHILIC	5	Цвиттер-ионная	<b>4.21</b>	0.36	0.80	1.00	1.69

Название	мкм	Фаза/ функциональная группа	kU	$\alpha$ (AX)	$\alpha$ (CX)	$\alpha$ (Tp/Tb)	$\alpha$ (CH <sub>2</sub> )
ZIC-cHILIC	3	Цвиттер-ионная	<b>3.49</b>	0.37	0.37	0.93	1.47
ZIC-HILIC	5	Цвиттер-ионная	2.11	0.05	4.41	1.20	1.67
ZIC-HILIC	3.5	Цвиттер-ионная	2.10	0.05	4.33	1.20	1.71
Nucleodur HILIC	1.8	Цвиттер-ионная (Сульфобетаин)	1.44	0.18	3.50	1.00	1.25
Amide-80	3	Амидная	<b>4.58</b>	0.06	2.82	1.32	1.27
Experimental HILIC	3	Полиакриламид	3.51	0.45	1.66	1.27	1.53
Amide-80	5	Амидная	3.30	0.03	3.62	1.39	1.27
XBridge Amide	3.5	Амидная	2.55	0.09	1.18	1.39	1.29
BEH Amide	1.7	Амидная	2.37	0.14	1.02	1.30	1.29
Experimental Amino-(Gly) <sub>3</sub> [123]	5	Амидная, с трипептидом глицина	1.78	2.64	1.92	1.00	1.18
Experimental Amino-(Ala) <sub>2</sub> [123]	5	Амидная, с аланином в слое	1.72	6.86	0.20	0.82	1.19
Experimental Amino-(Asp) <sub>1</sub> [123]	5	Амидная, с аспарагиновой кислотой в слое	1.70	0.82	4.55	1.00	1.17
Experimental Amino-(Leu) <sub>1</sub> [123]	5	Амидная, с лейцином в слое	0.62	4.00	2.45	0.70	1.00
Experimental Amino-(Phe) <sub>2</sub> [123]	5	Амидная, с дипептидом фенилаланина в слое	0.31	2.51	2.19	0.73	1.10
Experimental S-B-E [92]	5	Аминофаза, спейсер 1,4-БДДГЭ	1.05	<b>14.40</b>	1.01	0.55	0.84
Experimental S-B-PvP	5	Поливинилпиридин, спейсер 1,4-БДДГЭ	2.09	<b>17.20</b>	—	0.57	1.18
Experimental S-B-PEI	5	Полиэтиленэмин, спейсер 1,4-БДДГЭ	3.15	<b>15.90</b>	0.29	0.61	1.25
Experimental S-2B- PEI-GL [92]	5	Полиэтиленэмин, глицидол, спейсер 1,4- БДДГЭ	3.22	<b>24.34</b>	—	0.55	1.31
Experimental P-BPEI- Gl 10 h [41]	5	Матрица ПС-ДВБ, Полиэтиленэмин, глицидол, 1,4-БДДГЭ	1.57	<b>60.90</b>	—	0.33	1.34
TM4 (ПС-ДВБ) [31]	5	Цвиттер-ионная	7.20	<b>97.30</b>	0.22	0.41	1.31

Согласно табл. 2 гидрофильные сорбенты возможно условно разделить на две группы. Первую группу: немодифицированные силикагели и фазы, содержащие гидроксильные и аминогруппы (доноры водородных связей) можно охарактеризовать относительно низкой гидрофильностью и значительной ионообменной активностью. Данных материалов следует избегать при разделении кислотных или щелочных аналитов, чтобы свести к минимуму вторичные ионообменные взаимодействия. Так, немодифицированные силикагели демонстрируют значительную катионнообменную селективность. Для коммерческих фаз Halo HILIC, Chromolith Si, Hypersil GOLD Silica, Synchronis Silica получены значения катионнообменной селективности  $\alpha(\text{CX})$  43.86; 20.30; 5.95; 5.61, соответственно.

Вторая группа: фазы, содержащие амидные, сульфонатные, цвиттер-ионные группы (функциональные группы, которые действуют как акцепторы водородных связей) демонстрируют большую гидрофильность (для амидной фазы Amide-80 kU 4.58, для цвиттер-ионной Synchronis HILIC — 5.05) лучшую селективность в отношении соединений, используемых в тесте Танака, и незначительные ионообменные взаимодействия. Данные сорбенты продемонстрировали свою пригодность для широкого спектра анализируемых веществ; в частности, их следует рекомендовать при анализе кислот, оснований и соединений, не обладающих ионообменными группами.

Существенного различия в метиленовой селективности для гидрофильных сорбентов на основе силикагеля не выявлено. Метиленовая селективность для большинства сорбентов находится в диапазоне 1.00—1.50. Среди приведенных фаз можно отметить пористый графитированный углерод (Hypercarb), метиленовая селективность для него не лежит в данном диапазоне. Hypercarb несмотря на значительную гидрофильность (kU = 4.61) является гидрофобно-селективным материалом и демонстрирует плохую форму пиков для полярных соединений в гидрофильном режиме.

Для коммерчески доступных аминофаз COSMOSIL HILIC, Sugar-D, NH<sub>2</sub>-MS, получены значения kU 1.60, 1.58, 2.44, соответственно, тогда как для амидных фаз Amide-80 (5 мкм), Amide-80 (3 мкм) и XBridge Amide, значения факторов удерживания уридина значительно выше (3.30, 4.58, 2.55), что подтверждает большую гидрофильность амидных фаз. Значения анионообменной селективности для аминофаз значительно больше нуля (2.81, 5.18, 7.54) в отличие от амидных

(0.06, 0.03, 0.09), что свидетельствует о протонировании аминогрупп в условиях теста Танака, в то время как для фаз с незаряженными амидными группами удержание отрицательно заряженных веществ не характерно. Отличие параметров для фаз одной и той же природы связано с различными способами получения и степенью модифицирования матрицы.

Ввиду простоты исполнения и коммерческой доступности анализов тест Танака для гидрофильных сорбентов обрел популярность и успешно применяется различными научными группами для характеристики новых разработанных гидрофильных фаз [41,92,122,123].

Так, в работе [123] с помощью теста Танака была подтверждена бóльшая гидрофильность неподвижных фаз, содержащих в функциональных слоях глицин, аланин и аспарагиновую кислоту, по сравнению с фазами с лейцином и фенилаланином, что соответствует гидрофильной/гидрофобной природе аминокислот. Значительную анионообменную селективность (6.86 для фазы Amino-(Ala)<sub>2</sub>) наблюдали для всех полученных сорбентов, кроме фазы с аспарагиновой кислотой ( $\alpha$  (AX) = 0.82). Карбоксильная группа в боковой цепи такой аминокислоты действует как катионообменная функциональная группа, вызывая электростатическое отталкивание с анионными соединениями.

В работе [92] наблюдали значительную анионообменную селективность для фаз на основе аминопропилсиликагеля S-B-E, S-B-PvP, S-B-PEI, S-2B-PEI-GL с функциональными слоями, удаленными с помощью спейсера 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (1,4-БДДГЭ), что является следствием кватернизации атомов азота аминопропилсиликагеля при присоединении трех молекул линкера к каждой аминогруппе.

Альтернативные матрицы на основе ПС-ДВБ являются достаточно гидрофобными и, несмотря на наличие гидрофильных функциональных слоев, согласно тесту Танака чаще всего демонстрируют малые значения kU (например, для фазы P-BPEI-GI 10 h kU = 1.57). Исключение составляет фаза TM4 (kU = 7.20): гидрофилизация поверхности ПС-ДВБ происходит благодаря гиперразветвленному функциональному слою. Величина  $\alpha$ (AX) для такого рода сорбентов на основе гидрофобных полимеров с большим количеством заряженных групп может принимать огромные значения (для фазы P-BPEI-GI 10 h  $\alpha$ (AX) = 60.90, для TM4  $\alpha$ (AX) = 97.30). Однако анионообменную селективность  $\alpha$ (AX) оценивают по

фактору удерживания гидрофобного аниона п-толуолсульфоната, а катионообменную селективность  $\alpha(\text{СХ})$  — по фактору удерживания гидрофобного катиона N,N,N-триметилфенил-аммония. При этом на фазах на основе ароматических матриц, таких как ПС-ДВБ, удерживание данных веществ может определяться не только анионообменными, но и гидрофобными взаимодействиями. Таким образом, для таких фаз нужен иной способ оценки ионообменной селективности [41].

Помимо лепестковых диаграмм, для наглядного сравнения синтезированных фаз между собой, а также с коммерчески доступными, также могут быть построены зависимости между параметрами теста Танака для ряда сорбентов. Они позволяют сравнить свойства разработанной неподвижной фазы с коммерчески доступными фазами того же класса [124].



Рис. 21. Структуры соединений и параметры, используемые в [118].

Аналогичный тесту Танака подход предложен в работе [118]. Построение графиков в координатах коэффициентов селективности выбранных пар соединений (рис. 21) позволяет наглядно разделять неподвижные фазы на соответствующие группы. Отношение факторов удерживания цитозина и урацила характеризует гидрофильность сорбента, аденозина и аденина — способность участвовать в образовании водородных связей, бензилтриметиламмоний хлорида (ВТМА) и цитозина — катионо- и анионообменный характер фаз. В координатах  $k'(\text{ВТМА})/k'(\text{цитозин})$  —  $k'(\text{цитозин})/k'(\text{урацил})$  удаётся разделить неподвижные фазы на несколько групп: с amino, amidными, диольными, цвиттер-ионными группами, а также немодифицированные силикагели (рис. 22)

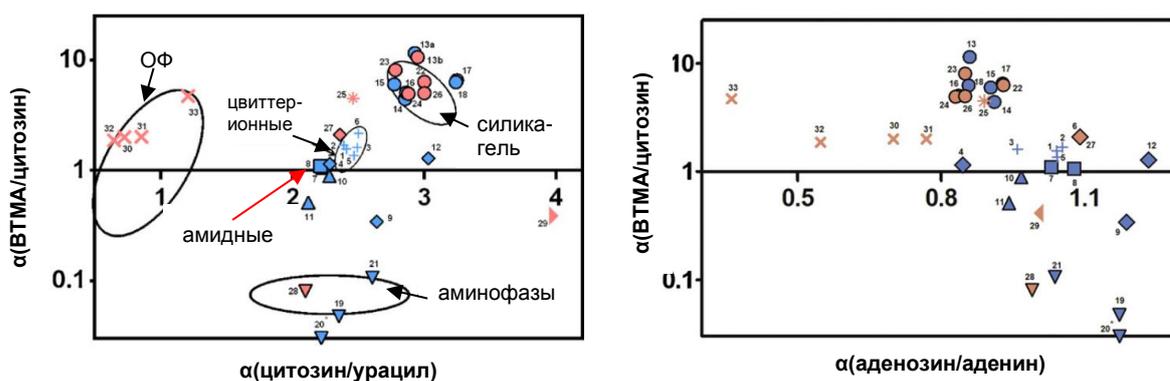


Рис. 22. Графики в координатах коэффициентов селективности, демонстрирующие сравнение: а) ионообменных свойств и гидрофильности сорбентов, б) ионообменных свойств и способности к образованию водородных связей. Условия разделения: скорость потока 0.5 мл/мин, 5 мМ  $\text{AcONH}_4$  pH 6.8 /  $\text{CH}_3\text{CN}$  20/80 об. %, 254 нм [118].

Таким образом, определение коэффициентов селективности подобранных пар соединений позволяет проводить сравнение новых сорбентов с коммерчески доступными, классифицировать их и создавать библиотеки, предназначенные для решения различных задач. Небольшое количество аналитов, используемых в таких тестах, позволяет экспрессно проводить характеристику.

#### 1.4.2. Характеризация по удерживанию тестовых аналитов

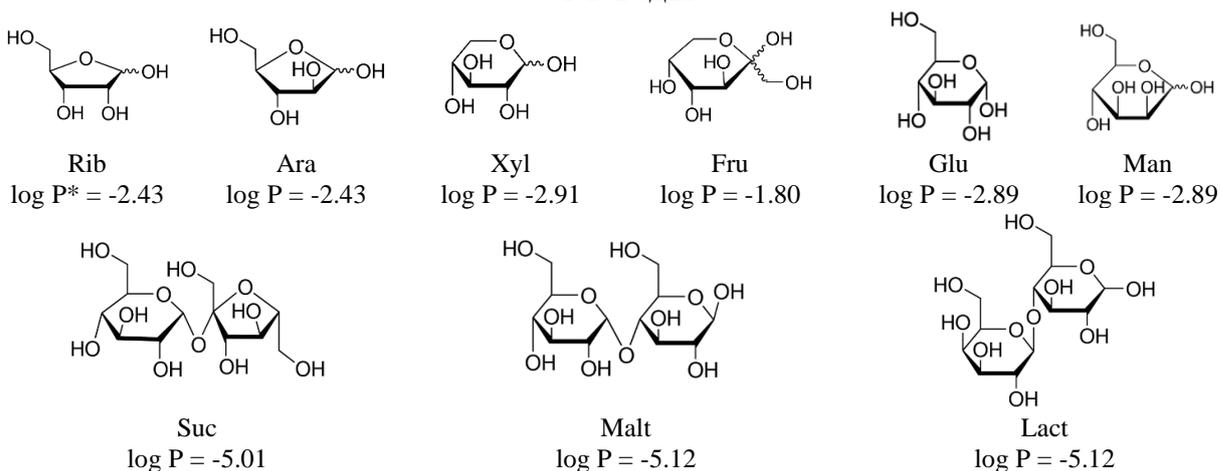
Тестирование неподвижных фаз с помощью разных модельных классов соединений является еще одной ключевой стратегией их характеристики. Изменяя условия по сравнению, например, с тестом Танака, и включая аналиты, обеспечивающие специфические взаимодействия с конкретными функциональными группами, можно дополнить характеристику колонки, упростить прогнозирование параметров удерживания и селективности относительно других соединений, оценить применимость фаз к анализу реальных образцов.

Для характеристики неподвижных фаз различной функциональности необходимы как нейтральные вещества, удерживание которых в большей степени определяется гидрофильностью изучаемого сорбента, так и заряженные в условиях разделения аналиты, на удерживание которых в большей степени влияют электростатические взаимодействия. На рис. 23 представлены структурные формулы тестовых веществ.

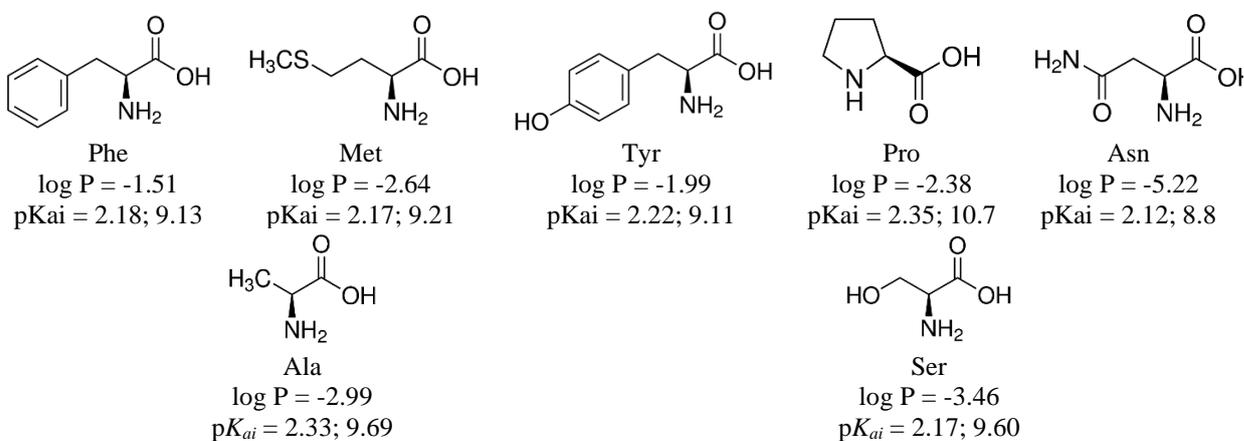
**Углеводы** являются подходящими модельными аналитами для изучения свойств и возможностей гидрофильных сорбентов в отношении разделения

полярных нейтральных веществ. В удерживание сахаров может вносить вклад не только распределение в приповерхностном слое воды, но также и адсорбционный механизм, и образование водородных связей с ОН-группами [125, 126]. Однако, если распределительный механизм является превалирующим, то значительное удерживание углеводов может свидетельствовать о гидрофильной поверхности сорбента. Детектирование данных веществ чаще всего осуществляют с помощью испарительного детектора светорассеяния [127], также распространенными являются рефрактометрическое [128], реже УФ-детектирование ввиду отсутствия хромофорных групп [129], в сочетании с элюентами, состоящими из ацетонитрила и воды. **Азотистые основания и нуклеозиды** отличаются высокой полярностью, а также способностью к протонированию и депротонированию при определённой кислотности среды. Уридин, который используют в тесте Танака для оценки гидрофильности, представляет собой как раз нуклеозид. На разделение большинства других полярных азотистых оснований и нуклеозидов [130] значительно влияет гидрофильность, поэтому они также являются показательными модельными аналитами в режиме ГИХ. Различия в гидрофильности и разнообразие физико-химических свойств делает **водорастворимые витамины** интересными модельными аналитами для изучения свойств гидрофильных сорбентов [131]. Для азотистых оснований, нуклеозидов и витаминов чаще всего используют спектрофотометрическое детектирование [131, 132]. **Аминокислоты**, представляющие класс полярных цвиттер-ионных аналитов и содержащие заряженные группы  $-\text{NH}_3^+$  и  $-\text{COO}^-$ , в зависимости от рН элюента могут быть как заряженными, так и электронейтральными. Если требуется высокая чувствительность определения, то необходимо совмещение жидкостного хроматографа с МС-детектором [133], иначе — ГИХ с УФ-детектированием [134]. **Органические кислоты** способны диссоциировать в условиях разделения при определённой кислотности среды. При этом вклад в их удерживание в зависимости от условий определения могут вносить распределительный, адсорбционный и ионообменный механизмы. Для данных веществ, в основном, применяют УФ- [135] или МС-детектирование [136, 137, 138].

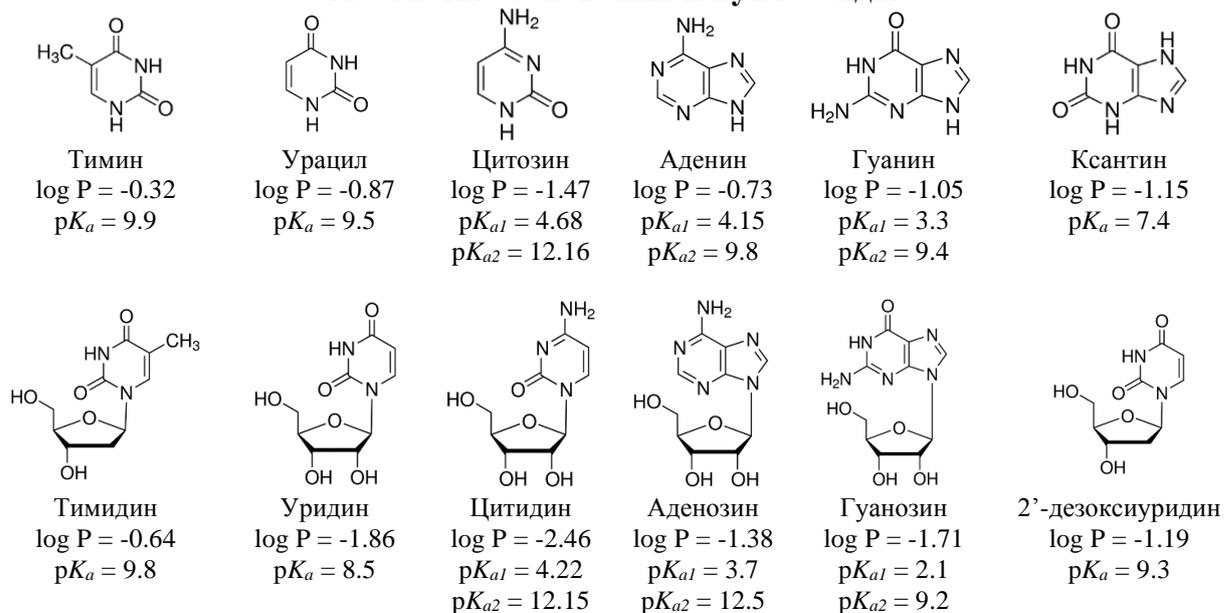
## Углеводы



## Аминокислоты

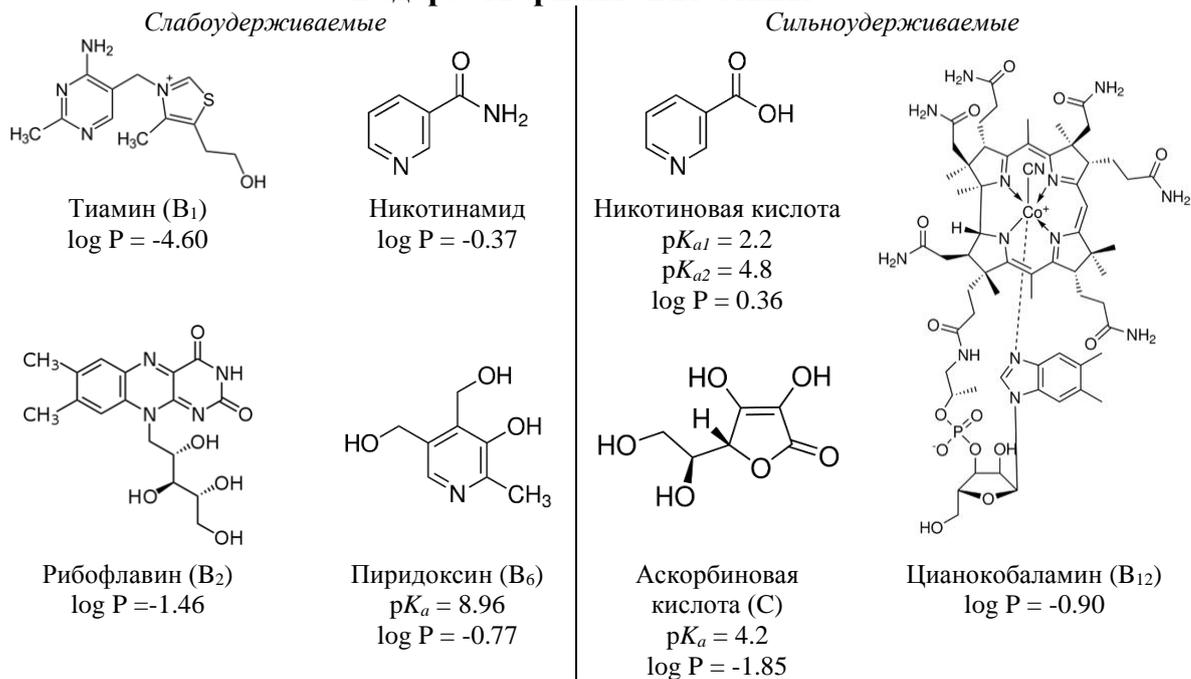


## Азотистые основания и нуклеозиды



\* — Расчет выполнен в EPIWEB 4.1.

## Водорастворимые витамины



## Органические кислоты

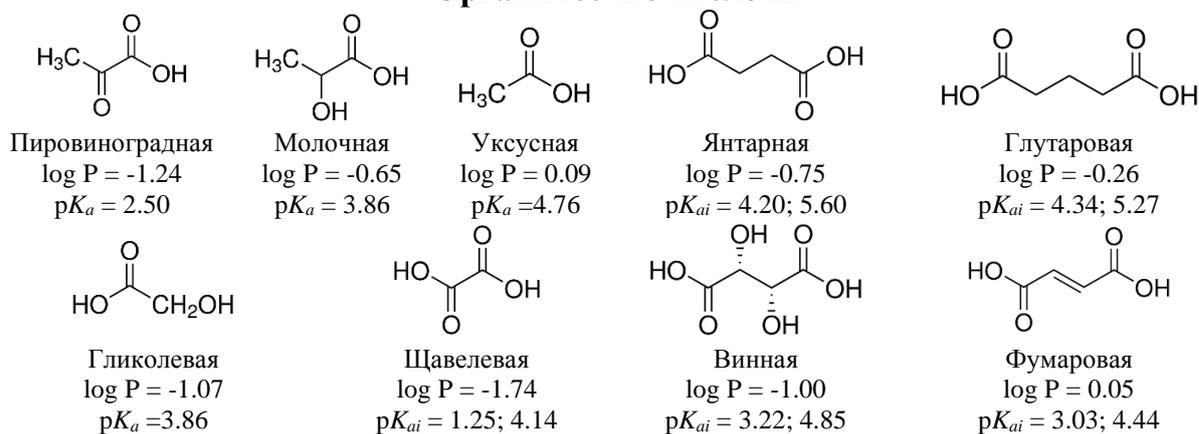


Рис. 23. Структурные формулы тестовых аналитов.

Разделение большого числа аналитов в рамках одного класса в гидрофильном режиме, которые можно было бы использовать в качестве модельных, выполняют в основном лишь в работах, посвященных конкретным реальным образцам. Например, в работе [139] разделяли и определяли 7 углеводов в растительных экстрактах на фазе на основе силикагеля, модифицированного полиакриламидом, в [125] 7 олигосахаридов в растении *R. Glutinosa* на колонке 'Click' maltose. Проводили разделение 15 целевых азотистых оснований и нуклеозидов на колонке Waters Xbridge Amide в 12 партиях экстрактов гриба *Cordiceps* [140]. В работе [141] продемонстрировано разделение 6 витаминов и их определение в продуктах питания. Авторы [142] определяли 16 аминокислот в почве с использованием цвиттер-ионной колонки с масс-спектроскопическим

детектированием, в свою очередь в статье [143] удалось количественно определить 24 аминокислоты в плазме на амидной неподвижной фазе также с масс-спектрометрическим детектированием. В работе [135] с помощью цвиттер-ионных фаз разделяли 11 органических кислот в вине с спектрофотометрическим детектированием.

Однако, необходимо отметить, что для исследования новых разработанных фаз обычно максимально применяют 3-4 класса модельных полярных соединений, причем внутри класса изучают удерживание малого набора веществ [86, 91]. При изучении свойств новых фаз рассматривали только один [80, 123, 144], два [20, 145], три [87, 146, 147, 148, 149] класса соединений в гидрофильном режиме. Самыми распространенными классами среди модельных аналитов являются азотистые основания и нуклеозиды, изучение удерживания которых встречается почти в каждой статье.

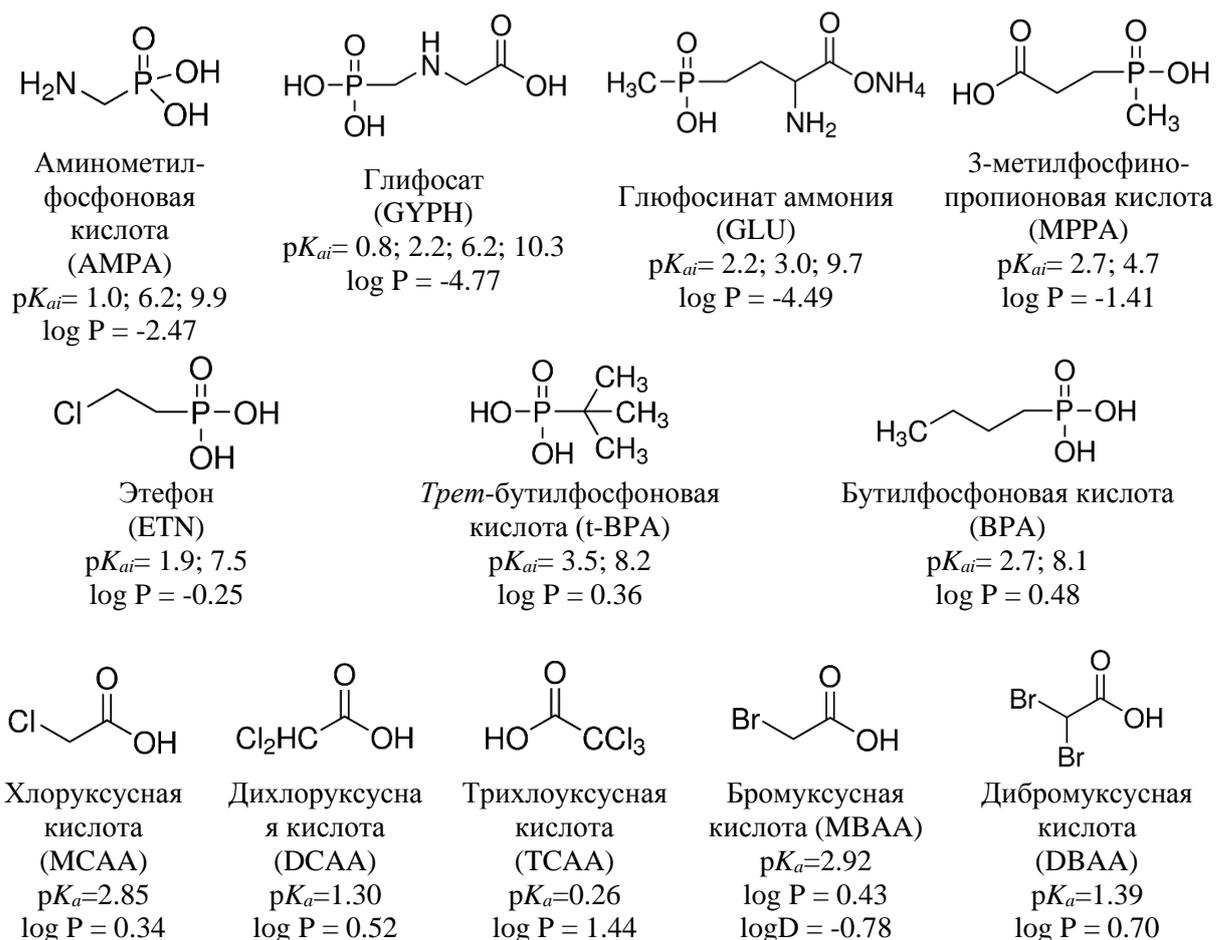


Рис. 24. Структурные формулы некоторых гербицидов, продуктов их распада, алкилфосфоновых ( $pK_{ai}$  рассчитаны в ACD/Labs 12.01) и галогенуксусных кислот ( $pK_a$  из [150]).  $\log P$  для всех рассчитан в Epiweb 4.1.

Метод гидрофильной хроматографии также можно использовать для определения и разделения гербицидов и фосфоновых и галогенуксусных кислот.

Изучение их удерживания может показать дополнительные возможности разрабатываемых сорбентов, а ввиду заряда поверхности могут стать показателем ионообменной селективности. Структурные формулы данных модельных аналитов приведены на рис. 24.

В работе [151] произведено сравнение 9 сорбентов для разделения 24 пестицидов и продуктов их распада. На цвиттер-ионной фазе Obelisc N (Sielc, США) возможно разделение 9 соединений за 10 минут с масс-спектрометрическим детектированием, немодифицированный силикагель Zorbax Rx-Sil (Agilent, США) — за 5 минут, в свою очередь аминофаза Spherisorb amino cartridge (Waters, США) обеспечивает существенные факторы удерживания пестицидов ( $k'(GLU)=36.0$ ). Хроматограмма смеси 9 пестицидов, полученная на Obelisc N приведена на рис. 25.

Таблица 3. Факторы удерживания некоторых пестицидов, полученные при МС-детектировании в отрицательных ионах, на неподвижных фазах различной функциональности [151]

Неподвижная фаза	Obelisc N (Sielc, США) 5 мкм, 150×2.1	Zorbax Rx-Sil (Agilent, США) 1.8 мкм, 100×3.0	Spherisorb amino cartridge (Waters, США) 5 мкм 125×3.0
Условия разделения, градиентное элюирование	А: водный раствор 0.1% НСООН В: CH <sub>3</sub> CN	А: 100 мМ аммонийно-форматный буферный раствор pH 2.85 В: CH <sub>3</sub> CN с 0.1% НСООН	А: 100 мМ НСООNH <sub>4</sub> pH 6.37 В: CH <sub>3</sub> CN
	0-4.5 мин 20% В при 0.3 мл/мин 4.5-15 мин 20% В при 0.8 мл/мин	0-1 мин от 90% до 70% В 1-7 мин от 70% до 60% В 7-7.5 мин от 60% до 20% В 7.5-10 мин 20% В Скорость потока 0.5 мл/мин	0-3 мин 95% В 3-15 мин от 95% до 50% В 15-18 мин от 50% до 15% В 18-20 мин 15% В Скорость потока 0.8 мл/мин
АМРА	0.4	2.8	—
GLU	2.6	3.4	36.0
GYPH	3.3	3.0	—
ETN	4.7	1.7	—
МРРА	3.3	2.3	—

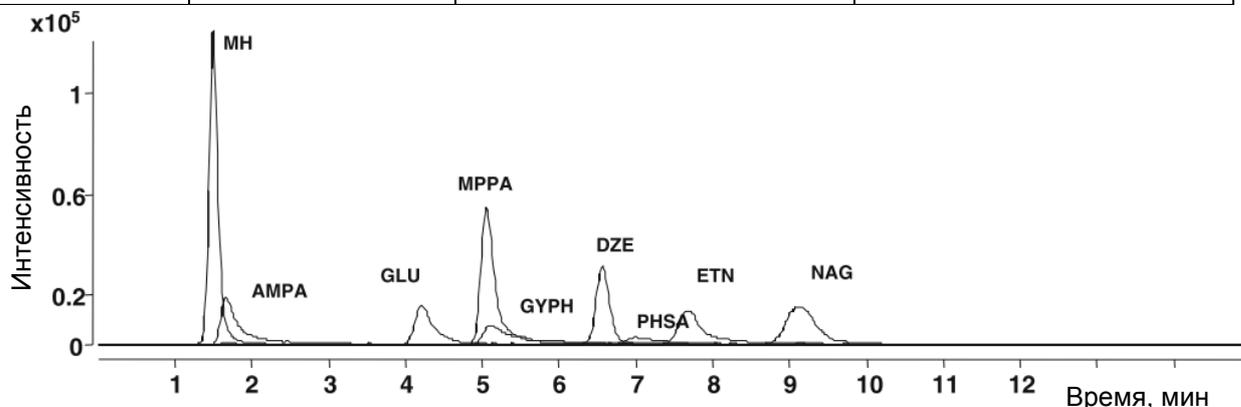


Рис. 25. Хроматограмма смеси 9 пестицидов, полученная на Obelisc N, условия разделения см. в [151] и табл.3.

Галогенуксусные кислоты — побочные продукты дезинфекции вод. Для их разделения чаще всего используют ОФ ВЭЖХ с добавками летучих ион-парных реагентов [152], ионную хроматографию без подавления с применением смеси ацетонитрила и водного раствора метиламина в качестве подвижной фазы [153]. Пока лишь в работе [154] предложено определение дихлоруксусной кислоты на аминофазе.

Таким образом, тест Танака является быстрой стратегией для всесторонней характеристики гидрофильных фаз. Однако он не всегда отражает структурные различия в функциональном слое разных сорбентов. Нельзя применять исключительно только данный тест для прогнозирования удерживания полярных аналитов абсолютно разных классов на колонках с различной функциональностью, а также в случаях, когда используют разные условия элюирования модельных аналитов. Дополнительные модельные соединения, как традиционно определяемые методом ГИХ, так и относительно новые для метода, представляющие собой большое разнообразие структур и свойств, полезны для дополнения характеристик и сравнения колонок, а также с их помощью можно сразу же оценить практическое применение только что разработанных сорбентов.

## Вывод из обзора литературы

Из литературных данных можно сделать вывод, что для конструирования новых функциональных слоев фаз для гидрофильной хроматографии предпочтительно использовать следующие стратегии: применение клик-химии для проведения быстрых, высокоэффективных и вариативных реакций, введение полимерных соединений, а также молекул большого размера в слой сорбентов.

Варьирование доступных реагентов в многокомпонентных клик-реакциях позволяет получить большое число совершенно разнообразных производных и, как следствие, структурных фрагментов при разработке новых неподвижных фаз. Так, четырехкомпонентная реакция Уги может стать перспективной простого и быстрого метода управления селективностью сорбентов.

Функционализация поверхности матриц с помощью готовых или заранее синтезированных полимеров позволяет увеличить их гидрофильность и стабильность, кардинально изменять свойства используемых матриц. Использование для этой цели высокоэффективных клик-реакций, к которым и относится реакция Уги, может открыть новые перспективы в закреплении и равномерности распределения полимерных слоев на поверхности частиц.

Применение молекул большого размера, таких как гликопептидные антибиотики, может также способствовать экранированию разных матриц, в том числе альтернативных, и увеличивать гидрофильность получаемых сорбентов. В свою очередь, формирование функционального слоя на основе полярных молекул — хиральных селекторов, таких как эремомицин, для которых возможны различные типы взаимодействий, открывает перспективы для создания гидрофильных сорбентов, которые можно использовать для разделения хиральных веществ.

Следующим важным шагом для разработки новых фаз является их характеристика, которая должна быть не только относительно быстрой, но и всесторонней. Для описания свойств разрабатываемых фаз необходимо применять не только широко используемый в гидрофильной хроматографии тест Танака для экспрессного получения информации об их хроматографических характеристиках и сравнения с аналогами, но и большее количество полярных веществ нескольких абсолютно разных классов в качестве модельных для дополнения сведений в разных хроматографических условиях и одновременной оценки практической значимости новых сорбентов.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Аппаратура

Система ВЭЖХ, состоящая из хроматографа *Dionex 3000* с двухканальным градиентным насосом, автоматической системой ввода пробы, термостатом колонки и диодно-матричным детектором. Регистрацию хроматограмм осуществляли с помощью персонального компьютера и программного пакета *Chromeleon 7* (Thermo Fisher Scientific, США). Жидкостной хроматограф *Vanquish Flex* с флуоресцентным детектором FLD и диодно-матричным детектором DAD. Система ВЭЖХ, состоящая из изократического ВЭЖХ насоса *Shimadzu LC-20ADSP* (Shimadzu, Япония), шестиходового крана-дозатора и рефрактометрического детектора (Agilent Technologies, США). Регистрацию хроматограмм осуществляли с помощью персонального компьютера и программного пакета *ChemStation* (Agilent Technologies, США). Жидкостной хроматограф *Shimadzu Prominence* с насосом высокого давления LC-20AD с четырехканальным градиентным смесителем на стороне низкого давления, дегазатором DGU-20A5R, управляющим модулем CBM-20A, ручным инжектором Rheodyne 7725i и детектором по светорассеянию ELSD-LT II. Сжатый воздух для детектора получали с помощью компрессора Jun-Air OF302-25B. Давление сжатого воздуха для детектора составляло 350 кПа, температура нагрева испарителя +40°C, усиление детектора  $k = 6$  выбирали, исходя из высоты пиков на хроматограмме в ходе эксперимента. Объем пробы — 20 мкл. Жидкостной хромато-масс-спектрометр *Shimadzu* (Shimadzu, Япония), состоящий из следующих модулей: квадрупольный масс-спектрометр LCMS-2020 с ионизацией аналитов электрораспылением (ESI); два ВЭЖХ-насоса LC-20AD; дегазатор DGU-20A; контроллер CBM-20A; автосемплер SIL-20AC и термостат CTO-20AC. Программное обеспечение для сбора данных и управления хроматографом — *LabSolutions ver. 5.55*.

Система ГХ-МС *Agilent GC (8890)-MS (5977B)* (Agilent Technologies, США) состоящая из моноквадрупольного МС детектора (режим сканирования 35-500  $m/z$ ) с источником электронной ионизации (230°C), термостата колонки, охлаждаемого узла ввода пробы, термодесорбера (TDU 2) и автоматической роботизированной системой ввода пробы (Gerstel, Германия) и линии подачи газов (He, 1 мл/мин). Задержка детектирования при вводе пробы — 1.5 мин. Колонка ГХ: две

соединенные последовательно колонки HP-5MS 15 м × 0.25 мм, 0.25 мкм (Agilent Technologies, США). Стеклянные термодесорбционные трубки (5×0.5 см). Кварцевая стекловата ЧДА (TRAJAN, Австралия).

Для элементного анализа некоторых образцов сорбентов использовали элементный анализатор *PerkinElmer 2400 Series II CHNS/O* («PerkinElmer», США).

Определение удельной поверхности методом БЭТ и размера пор образцов сорбентов проводили сотрудники научно-исследовательского центра коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова «Нанохимия и наноматериалы» на микроанализаторе поверхности *AUTOSORB-1* («Quantachrome»), а также сотрудники ИФХЭ РАН на микроанализаторе поверхности Gemini VII 2390 p («Micromeritics») по низкотемпературной адсорбции азота при 196°C.

Для отбора точной аликвоты использовали автоматические дозаторы LABMATE объемом 10–100, 20–200, 100–1000 и 1000–5000 мкл с пределом допустимой погрешности измерения не более ± 5% («HTL», Польша). Измерение pH подвижной фазы проводили при помощи pH-метра «pH-410» («Аквилон», Россия). Взвешивание точных навесок проводили на весах Explorer Pro («Ohaus Corporation», США), точность которых составляла 0.0001 г. Для дегазации растворов использовали ультразвуковую ванну «Сапфир 6580» («Сапфир», Россия). Для очистки воды использовали деионизатор Milli-Q Elix Millipore («Milford», США). Во время синтетической части эксперимента использовали следующее оборудование: вакуумный насос серии «Laborport» («KNF Neuberger», Германия), реактор, состоящий из термостатируемой емкости на 150 мл, механической мешалки («Metrohm», Швейцария). Для центрифугирования образцов использовали центрифугу ЦЛН-2, ТУ 2-2-57-70 (Россия), 6000 об/мин.

В работе использовали стальные колонки размером 100×3 мм, заполнение которых осуществляли при помощи насоса «Knauer K-1900» («Knauer», Германия).

## 2.2. Реактивы и материалы

*Реактивы для теста Танака, азотистые основания, нуклеозиды:* толуол, х.ч.: Компонент-Реактив, Россия. Аденозин, >99.0%; урацил, >99.0%; теобромин, >98.0%; теофиллин, >98.0%; уридин, >98.0%; видарабин моногидрат, >98.0%; 5-метилуридин, >98.0%; 2'-деоксиуридин, >98.0%; N, N, N-триметилфенил-

аммоний хлорид, >98.0%; тозилат натрия, >90.0%: TCI, Япония. Тимин, >99%; гуанозин, >98%; Sigma-Aldrich, Великобритания. Тимидин, >99%; аденин, >99%; цитозин, >99%; цитидин, >99%; гуанин 98%, ксантин, >99%; Sigma-Aldrich, Китай.

*Сахара:* D-(+)-рибоза, 98%; D-(+)-глюкоза, 99,5%; D-(+)-фруктоза, 99.9%; D-(+)-лактоза моногидрат, >98%; D-(+)-мальтоза моногидрат, >98%; D-(+)-сахароза, >98%; D-(+)-ксилоза, >98%; D-(+)-рафиноза пентагидрат: TCI, Япония.

*Витамины:* Никотинамид (В<sub>3</sub> амид), 99.7%; кислота никотиновая (В<sub>3</sub> кислота): Sigma-Aldrich, США. Рибофлавин (В<sub>2</sub>), 99%; пиридоксин гидрохлорид (В<sub>6</sub>), 99%; цианокобаламин (В<sub>12</sub>), ч.д.а.; аскорбиновая кислота (витамин С), 99%; тиамин (В<sub>1</sub>), >96%; пантотенат кальция: TCI, Япония. L-карнитин тартрат: Компонент-Реактив, Россия.

*Органические кислоты, аминокислоты:* Оксалат аммония, ацетат натрия, (х.ч. или ч.д.а.): Химмед и Лабтех, Россия. Натрий тартрат х.ч.: Компонент-Реактив, Россия. Гликолевая кислота, пируват натрия, сукцинат натрия, молочная кислота (все х.ч. или ч.д.а.): Panreas, Испания. Пропионат натрия (ч.д.а.): AppliChem, Германия. Глутаровая кислота, фумаровая кислота (ч.д.а.) Merck, Германия. D,L-фенилаланин, х.ч.; L-пролин, х.ч.; D,L-серин, х.ч.; L-изолейцин, х.ч.; L-лейцин, х.ч.; L-метионин, х.ч.: Serva, Германия. L-аспарагин, х.ч.; β-аланин, х.ч.; глицин, х.ч.: Merck, Германия. L-валин, х.ч.: Reanal, Венгрия.

*Гербициды, фосфоновые, галогенуксусные кислоты:* аминотетилфосфоновая кислота, 99%: Aldrich, США. Глифосат; глюфосинат аммония: Sigma-Aldrich, Швейцария. Хлоруксусная кислота, 99%; этефон, ≥96%; бутилфосфоновая кислота; дибромуксусная кислота: Sigma-Aldrich, США. Трет-бутилфосфоновая кислота, 98%: Sigma-Aldrich, Словакия. Трихлоруксусная кислота, ≥99.0%; бромуксусная кислота; 3-(гидроксиметилфосфинил)-пропионовая кислота: Sigma-Aldrich, Германия. Бромуксусная кислота: Sigma Aldrich, Израиль.

*Алкилбензолы:* бензол, толуол, этилбензол, пропилбензол, бутилбензол, пентилбензол, гексилбензол все х.ч (Sigma-Aldrich, Россия).

*Сорбенты:* силикагель с привитыми аминопропильными радикалами Диасфер-110-Амин (ЗАО «БиоХимМакСТ», Россия) со сферическими частицами диаметром 5 мкм, содержащий 1.52%, 1.60%, 1.70%, 2.10% азота (средний диаметр пор 11 нм, удельная поверхность 200 м<sup>2</sup>/г; характеристики сорбентов

предоставлены производителем). Сорбент с иммобилизованным эремомицином Диасфер-110-Ere (ЗАО “БиоХимМакСТ”, Россия) обозначен в работе С-Э.

В качестве *матриц* для получения сорбентов использовали силикагель (Kromasil, 5 мкм, средний диаметр пор 11 нм, удельная поверхность 313 м<sup>2</sup>/г); силикагель с привитыми аминопропильными радикалами Диасфер-110-Амин (ЗАО “БиоХимМакСТ”, Россия) со сферическими частицами диаметром 5 мкм, средний диаметр пор 11 нм, удельная поверхность 200 м<sup>2</sup>/г, 1.70% N; сополимеры стирола и дивинилбензола со степенью сшивки 50%, средним диаметром частиц  $5.5 \pm 0.5$  мкм, площадью поверхности 650 м<sup>2</sup>/г и средним диаметром пор 4 нм.

*Для синтеза сорбентов с эремомицином использовали:* эремомицин, 96% (ЗАО “БиоХимМакСТ”, Россия), гидрохлорид метиламина 99.9% (Aldrich, США), 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир >96.0% (Aldrich, США), триметиламин, 45% водный раствор (Aldrich, США).

*Для синтеза сорбентов по реакции Уэги использовали:* Ацетон, ч.д.а.: Panreac, Германия. 2-Ацетилфуран, 99%, 2-ацетилпиррол, 99%: Sigma Aldrich, Китай. Ацетальдегид, 99.5%: Acros Organics, США. Полимолочная кислота (ММ 60000): Sigma Aldrich, Германия. Полиакриловая кислота, сополимер акриловой и малеиновой кислот (ММ 2000), сополимер акриловой и малеиновой кислот (ММ 70000), поли(акриламид-со-акриловая кислота) неполная натриевая соль, (ММ 150000), сополимер акриловой кислоты и акрилата натрия (ММ 2000): Sigma Aldrich, США. Трет-бутилизотиоцианид, >95%: TCI, Япония. 2-морфолиноэтилизотиоцианид,  $\geq 98,0\%$ ; диэтилизотиоциано-метилфосфонат, 97%: Aldrich, США. п-Толуолсульфонилметилизотиоцианид, 98%: Sigma Aldrich, Великобритания. *Для синтеза этилизотиоцианатацетата использовали:* оксихлорид фосфора, ос.ч.: Элма-Хим, Россия. Дихлорметан, х.ч.: Компонент-Реактив, Россия. Триэтиламин, х.ч.: Acros, Россия.

*Прочие реактивы:* ацетонитрил, «HPLCgradientgrade»; кислота уксусная ледяная, 99.5%; кислота ортофосфорная, 85%, х.ч., хлорид калия, ч.д.а.: Panreac, Испания. Цинк хлористый, 98 %: Русхим, Россия. Аммоний хлористый х.ч.: Реахим, Россия. Этанол, ч.д.а.; ацетат аммония, ч.: Лабтех, Россия. 1,4-диоксан, ч.д.а.: Компонент-Реактив, Россия. Кофеин: Sigma Aldrich, США.

*Исходные растворы* углеводов, азотистых оснований, нуклеозидов, водорастворимых витаминов, пестицидов, фосфоновых, галогенуксусных, карбоновых и аминокислот готовили растворением точной навески в деионизованной воде в пробирках объёмом 5 мл (10 мл) или колбах объёмом 25.0 мл (50.0 мл). При работе с витаминами добавляли 0.5 мл 85% раствора  $H_3PO_4$ , с ксантином и гуанином — 400 мкл 1 М NaOH. Все исходные концентрированные растворы хранили при +4°C. Рабочие растворы индивидуальных соединений готовили разбавлением деионизованной водой и ацетонитрилом для достижения соотношения водная фаза — ацетонитрил близкому к составу подвижной фазы. Растворы смесей соединений готовили исходя из отклика детектора, добиваясь сопоставимых высот пиков. Концентрации веществ в смеси составляли (мг/л): углеводы — 150-1500, азотистые основания, нуклеозиды — 2-20, водорастворимые витамины — 10-30 (рибофлавин — 1 мг/л), карбоновые кислоты — 5-120, аминокислоты — 1-50.

В работе использовали *буферные растворы* для контроля форм аналитов и состояния поверхности неподвижной фазы. Аммонийно-ацетатные и аммонийно-формиатные буферные растворы (табл. 4) готовили путем растворения точной навески соли в деионизованной воде в колбе объёмом 250.0 мл, добавляли точный объём кислоты, доводили до метки, тщательно перемешивали. Фосфатные буферные растворы готовили смешением 20 мМ раствора  $NaH_2PO_4$  (раствор А) с 20 мМ раствором  $Na_2HPO_4$  (раствор Б). В табл. 4 приведены соотношения растворов А и Б, необходимые для создания требуемого рН раствора. Для получения необходимой концентрации рабочего буферного раствора проводили разбавление полученных буферных растворов.

Таблица 4. Условия создания рН буферных растворов

Буферный раствор	Аммонийно-ацетатный (ААБ)		Аммонийно-формиатный (АФБ)		Фосфатный (ФБ)	
	рН					
рН	4.7	5.4	4.0	5.5	6.5	7.0
V(НА*), мкл / А**, %	725	267	339	17	68.5	38.5
m (А*), г / Б**, %	1.413	2.299	1.010	1.548	31.5	61.5

\* НА — ледяная уксусная или муравьиная кислота, А<sup>-</sup> —  $CH_3COONH_4 \cdot 2H_2O$  или  $HCOONH_4$ ;

\*\* Для приготовления фосфатного буферного раствора: раствор А — 20 мМ  $NaH_2PO_4$ , раствор Б — 20 мМ  $Na_2HPO_4$ .

Подвижные фазы готовили непосредственно перед проведением экспериментов смешением буферных растворов или воды и ацетонитрила в требуемом соотношении с последующей дегазацией при помощи ультразвуковой ванны, либо использовали градиентную систему смешения с дегазацией, которой оснащены используемые хроматографы.

Для оценки применимости сорбентов проводили *анализ следующих реальных объектов*:

- Напитки: растворимый кофе Nescafe Gold Cappuccino (Nestle UK Ltd), красное сухое вино Gran Marques Reserva («Reserva de la Tierra, SL» C/Noves Technologies, Испания), ягодный детоксикационный кисель «Леовит|DETOX» (ООО «ЛЕОВИТ нутрио», Россия) тонизирующий напиток «BCAA ENERGY 2:1:1» (“VP Laboratory LTD”, Великобритания);
- БАД: витаминно-минеральный комплекс «Компливит» (ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА», Россия); биологически активная добавка «Мульти-витамин» производства компании Хаас (Haas Limited, Венгрия).
- Фармацевтические препараты: противовирусный препарат на основе нуклеозида и питательный раствор, содержащий гистидиновый буферный раствор, триптофан, маннитол и кетокислоту. (ООО «АМЕДАРТ»);
- Почва: образец предоставлен Аналитическим центром МГУ. Адрес, место отбора: Истринский район, д. Борзые, ул. Невская. Органическое вещество 31.5%.

С помощью разработанного сорбента проводили изучение ферментативной активности фермента рибонуклеозидгидролазы (RihC).

Фермент рибонуклеозидгидролаза (RihC) получен в рамках гранта РФФИ № 23-64-10029 в организации ФИЦ Биотехнологии РАН (руководитель гранта Пометун А.А.), ген для клонирования был предоставлен Всесоюзным научно-исследовательским институтом молочной промышленности (ВНИМИ).

**Описание пробоподготовки.** Пробоподготовка напитков включала разбавление: вино разбавляли в два раза, кофе (0.3 г) сначала растворяли в 100 мл воды и затем разбавляли в два раза. Образцы подвергали очистке путем твердофазной экстракции на картридже Chromabond® C18 ec f (силикагель, модифицированный октадецильными группами, объем 3 мл, масса адсорбента 500 мг, Macherey-Nagel, Германия). Картридж предварительно кондиционировали

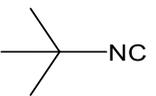
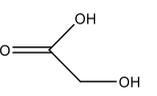
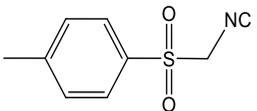
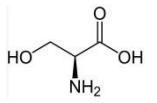
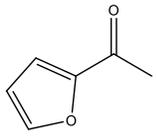
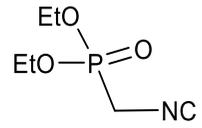
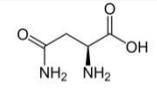
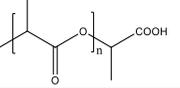
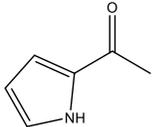
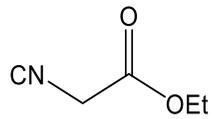
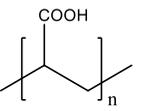
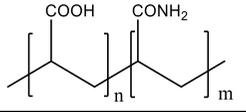
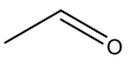
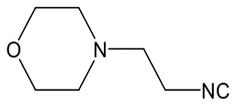
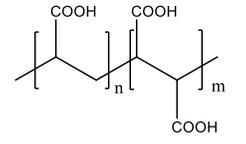
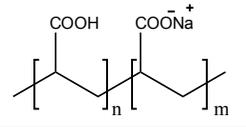
10 мл ацетонитрила и 5 мл воды. Порошок киселя (8.0 г) растворяли в 100 мл воды, аликвоту разбавляли ацетонитрилом. Напиток «BCAA ENERGY 2:1:1» дегазировали с помощью ультразвука в течение 15-20 мин. Образец помещали в ледяную баню, чтобы предотвратить разложение аскорбиновой кислоты, стабильность которой зависит от температуры. В случае каждого напитка к полученным экстрактам добавляли ацетонитрил для достижения соотношения вода/ацетонитрил согласно составу подвижной фазы.

На стадии пробоподготовки БАД соответствующие таблетки измельчали в ступке, растворяли в 50 мл 1% раствора ортофосфорной кислоты в колбе на 100 мл с использованием ультразвуковой ванны и бани со льдом в течение 15 мин, после чего доводили до метки ацетонитрилом. Далее водно-органическую вытяжку центрифугировали, фильтровали от оболочки таблеток и разбавляли до достижения соотношения водная часть/ацетонитрил, соответствующего составу подвижной фазы первой ступени градиента.

На стадии пробоподготовки противовирусного препарата капсулу помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл растворителя, обрабатывали ультразвуком в течение 10 минут, доводили объем до метки ацетонитрилом и перемешивали. Далее фильтровали полученный раствор через шприцевой нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Питательный раствор разбавляли в 2 раза ацетонитрилом.

Почву (2.0 г) растворяли в 20 мл воды, встряхивали в течение часа, после отстаивания образец фильтровали через белую ленту. Образцы подвергали очистке путем твердофазной экстракции на картридже Chromabond® C18 ec f. Картридж кондиционировали 10 мл ацетонитрила и 5 мл воды. К полученному водному экстракту добавляли ацетонитрил для достижения соотношения водная часть/ацетонитрил согласно составу подвижной фазы.

Таблица 5. Структурные формулы веществ, используемых для синтеза новых фаз по реакции Уги

Карбонильное соединение (КС)		Изоцианид		Кислота	
Ацетон log P = -0.24		Трет-бутилизоцианид log P = 2.24		Гликолевая logP = -1.07	
		п-Толуолсульфонил-метилизоцианид log P = 1.15		Серин logP = -3.46	
2-Ацетилфуран log P = 0.80		Диэтилизоцианометил-фосфонат log P = 0.44		Аспарагин logP = -4.99	
				Полимолочная log P (Уги) = -1.36	
2-Ацетилпиррол log P = 0.56		Этилизоцианаацетат log P = 0.91		Полиакриловая log P (Уги) = 0.17	
				Сополимер акриловой кислоты и амида log P (Уги) = -3.04	
Ацетальдегид log P = -0.17		2-Морфолиноэтил-изоцианид log P = 0.19		Сополимер акриловой и малеиновой кислот log P (Уги) = -2.20	
				Сополимер акриловой кислоты и акрилата натрия logP (Уги) = -1.20	

### 2.3. Синтез сорбентов

*Синтез сорбентов по реакции Уги.* Серия сорбентов была получена путём ковалентного модифицирования 3-аминопропилсиликагеля, содержащего 1.70% азота (МЗ), по реакции Уги (табл. 5 и 6). К суспензии матрицы в растворителе последовательно добавляли карбонильное соединение, изоцианид, и карбоновую кислоту. Реагенты были взяты в эквимольных количествах (полимерные кислоты взяты в массовом соотношении с матрицей), содержание аминогрупп на поверхности матрицы рассчитывали на основании данных элементного анализа.

Таблица 6. Обозначения сорбентов и вещества, применяемые для синтеза. Результаты элементного анализа

Сорбент	КС*	Изоцианид	Кислота	масс. %С
<b>матрица</b>	—	—	—	6.42
<b>I. Пространственное удаление функционального слоя</b>				
У	Ацетон	<i>трет</i> -бутилизотиоцианид	Уксусная	—
Б-У (спейсер)	Ацетон	<i>трет</i> -бутилизотиоцианид	Уксусная	7.73
<b>II. Изоцианид</b>				
Б	Ацетон	<i>трет</i> -бутилизотиоцианид	Гликолевая	—
Т		<i>п</i> -толуолсульфонилметил		6.71
Э		этилизотиоцианацетат		3.44
Ф		диэтилизотиоциано-метилфосфонат		2.57
М (АЦ)		2-морфолиноэтил		6.96
<b>III. Карбонильное соединение (КС)</b>				
АП	2-Ацетилпиррол	2-морфолиноэтил	Гликолевая	5.89
АА	Ацетальдегид			7.93
АФ	2-Ацетилфуран			3.61
<b>IV. Кислотное соединение</b>				
<b>1. Аминокислота</b>				
СЕР	Ацетон	2-морфолиноэтил	Серин	3.68
АСП			Аспарагин	4.62
<b>2. Полимерная кислота</b>				
ПМ 1:0,01*	Ацетальдегид	2-морфолиноэтил	Полимолочная	10.33
ПА 1:0,1			Полиакриловая	13.53
ПА-с 1:0,1			Сополимер акриловой кислоты и акрилата натрия	—
ПАМ 1:0.1			Сополимер акриловой и малеиновой кислот (ММ 2000)	11.11
ПАМ 1:1				13.27
ПАММ 1:0,1			Сополимер акриловой и малеиновой кислот (ММ 70000)	7.82
ПАА 1:0,1			Сополимер акриловой кислоты и амида (ММ 150000-520000)	8.83
ПАА 1:0,3				9.32

\* — карбонильное соединение

\*\* — соотношение матрица:полимер по массе

В ряде случаев использовали кислоту Льюиса в качестве катализатора, ее добавляли до начала реакции. Реакционную смесь интенсивно перемешивали

указанное время при комнатной температуре, сорбент отфильтровывали на пористом фильтре, промывали 100-500 мл воды, 100-500 мл этанола в случае фаз с полимерным слоем и 100 мл ацетонитрила. Удаление функционального слоя (Сорбент Б-У) от поверхности матрицы позволяет увеличить количество привитых групп за счет возможности введения трех линкеров на каждую исходную аминогруппу. Для этой цели использовали 1,4-БДДГЭ, а дополнительные первичные аминогруппы для проведения реакции Уги вводили с помощью этилендиамина [156, 157]. Условия проведения реакций приведены в табл. 7.

Таблица 7. Нумерация, обозначения сорбентов и дополнительные условия проведения реакции Уги: растворитель, время синтеза, катализатор

№	Сорбент	Растворитель	Время синтеза, сут	Катализатор
	<b>матрица</b>	—	—	—
1	У	Метанол	1	—
2	Б-У	Метанол	1	—
3	Б <sub>м</sub>	Метанол	1	—
4	Б <sub>э</sub>	Этанол	1	—
5	Т <sub>м</sub> 4	Метанол	4	—
6	Т <sub>э</sub> 4	Этанол	4	—
7	Т <sub>э</sub> 4К <sub>а</sub>	Этанол	4	NH <sub>4</sub> Cl
8	Э <sub>м</sub>	Метанол	1	—
9	Э <sub>э</sub>	Этанол	1	—
10	Э <sub>э</sub> 4К <sub>а</sub>	Этанол	4	NH <sub>4</sub> Cl
11	Ф <sub>э</sub> 4К <sub>а</sub>	Этанол	4	NH <sub>4</sub> Cl
12	М <sub>э</sub>	Этанол	1	—
13	М <sub>м</sub> 4	Метанол	4	—
14	М <sub>э</sub> 4	Этанол	4	—
15	М <sub>э</sub> К <sub>а</sub>	Этанол	1	NH <sub>4</sub> Cl
16	М <sub>м</sub> 4К <sub>а</sub>	Метанол	4	NH <sub>4</sub> Cl
17	М <sub>э</sub> 4К <sub>а</sub>	Этанол	4	NH <sub>4</sub> Cl
18	М <sub>э</sub> 4К <sub>ц</sub>	Этанол	4	ZnCl <sub>2</sub>
19	АП	Этанол	4	—
20	АА	Этанол	4	—
21	АФ	Этанол	4	—
22	СЕР	Вода:этанол (1:2)	4	—
23	АСП	Вода:этанол (1:2)	4	—
24	ПМ 1:0.01*	Дихлорметан:этанол (1:1)	4	—
25	ПА 1:0.1	Вода:этанол (1:4)	4	—
26	ПА-с 1:0.1	Этанол	4	—
27	ПАМ 1:0.1	Этанол	4	—
28	ПАМ 1:1	Этанол	4	—
29	ПАММ 1:0.1	Вода:этанол (2:1)	4	—
30	ПАА 1:0.1	Вода:этанол (1:2)	4	—
31	ПАА 1:0.3	Вода:этанол (1:2)	4	—

*Синтез этилизоцианацетата.* В работе были использованы коммерчески доступные изоцианиды, а также этилизоцианацетат, полученный дегидратацией этилового эфира *N*-формилглицина (рис. 26) [58].

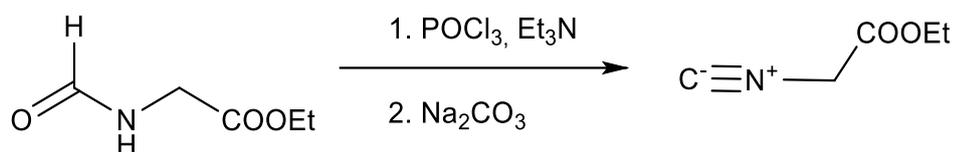


Рис. 26. Схема синтеза этилизоцианацетата.

К раствору 19.65 г (0.15 моль) перегнанного этилового эфира *N*-формилглицина [58] и 37.5 г (0.37 моль) триэтиламина в 150 мл дихлорметана прикапывали при 0°C 22.95 г (0.15 моль) оксихлорида фосфора. Смесь перемешивали 1 час при 0°C. Медленно прибавляли раствор 30 г (0.28 моль) безводного карбоната натрия в 120 мл воды при 20-25°C. Полученную смесь перемешивали 30 мин при комнатной температуре. После разделения фаз водную фазу разбавляли в 2.5 раза и экстрагировали двумя порциями дихлорметана по 80 мл. Объединённые органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, высушивали над карбонатом калия, растворитель отгоняли на роторном испарителе без нагревания. Остаток перегоняли в вакууме водоструйного насоса, собирая фракцию, кипящую 79-81°C (10 мм рт.ст.). Получили 9.8 г (56%) дурнопахнущей, практически бесцветной жидкости, желтеющей при стоянии. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C подтверждает структуру полученного соединения. ЯМР <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 МГц, δ, м.д., J, Гц): 4.29 (2H, кв, <sup>3</sup>J = 7.15 Гц, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.22 (2H, с, CH<sub>2</sub>N), 1.32 (3H, т, J = 7.15 Гц, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O). ЯМР <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 МГц, δ, м.д.): 163.5, 161.1, 62.4, 44.2, 13.6.

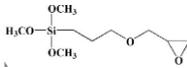
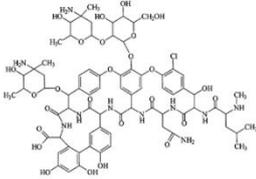
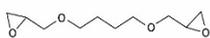
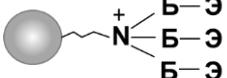
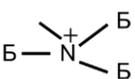
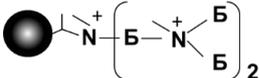
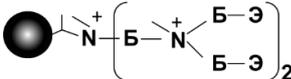
*Синтез сорбентов с использованием эремомицина.* Сорбент на основе силикагеля С (Kromasil, 5 мкм) и сорбент С-Э с иммобилизованным эремомицином (Диафер-110-Ere) были предоставлены ЗАО «БиоХимМакСТ» (Россия) (табл. 8).

На первой стадии синтеза сорбентов С<sub>А</sub>-Б и С<sub>А</sub>-Б-Э проводили введение эпоксидных групп и их пространственное удаление от поверхности матрицы. К 2 г 3-аминопропилсиликагеля, содержащего 1.70% азота (МЗ — матрица С<sub>А</sub>), добавляли 2 мл 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (1,4-БДДГЭ). Реакцию проводили при 60°C и при перемешивании в течение 30 мин. Полученное вещество С<sub>А</sub>-Б отфильтровывали, промывали 100 мл воды и 80 мл ацетонитрила, после чего разделили на две части, одну из которых использовали на второй стадии. На второй стадии 0.5 г эремомицина растворяли в 25 мл дистиллированной воды, с помощью 1 М раствора КОН рН полученного раствора доводили до 8.50 и полученный раствор антибиотика добавляли к 1 г эпоксиактивированного сорбента С<sub>А</sub>-Б. Реакционную смесь интенсивно перемешивали в течение 2 ч, затем оставляли без

нагревания и перемешивания в течение 7 дней. Полученное вещество С<sub>А</sub>-Б-Э (табл. 8) отфильтровывали, промывали 100 мл воды и 80 мл ацетонитрила.

Для синтеза фаз на основе полимерной матрицы на первом этапе получали якорные аминогруппы на поверхности частиц ПС-ДВБ в соответствии с [155]. Сорбенты П-2Б и П-2Б-Э синтезировали на аминированном ПС-ДВБ методом гиперразветвления [156, 157, 158] при использовании метиламина в первом цикле модифицирования и 1,4-БДДГЭ в качестве спейсера в двух циклах модифицирования. Полученное соединение П-2Б делили на две части, одну из которых использовали для дальнейшего ковалентного модифицирования эремомицином аналогично фазе С<sub>А</sub>-Б-Э. Полученный сорбент П-2Б-Э отфильтровывали и промывали 1 л воды.

Таблица 8. Нумерация, обозначения сорбентов и их предполагаемые структуры

№	Сор-бент	Матрица	Спейсер	Функциональная группа	Предполагаемая структура
32	С		—	—	
33	С-Э	С		Э (Эремомицин) 	
34	С <sub>А</sub> -Б	С <sub>А</sub>	Б (1,4-БДДГЭ) 		
35	С <sub>А</sub> -Б-Э				
36	П-2Б	П	2Б 		
37	П-2Б-Э				

Обозначения: С — силикагель, С<sub>А</sub> — 3-аминопропилсиликагель, П — аминированный полистирол-дивинилбензол, Б — 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир (1,4-БДДГЭ).

## 2.4. Характеризация сорбентов физико-химическими методами

Анализ некоторых образцов сорбентов, полученных по реакции Уги, провели методом элементного анализа (табл. 6). *Элементный анализ* фаз полученных при модифицировании эремомицином матриц на основе силикагеля показал увеличение содержания углерода и азота: 12.17% С, 1.25% N для С-Э; 9.04% С, 1.32% N для С<sub>А</sub>-Б; 9.90% С, 1.51% N для С<sub>А</sub>-Б-Э.

*Методом низкотемпературной адсорбции азота* показано, что модифицирование матрицы по реакции Уги привело к уменьшению удельной площади поверхности. Для матрицы она составила 200 м<sup>2</sup>/г, а для полученных фаз: 170 м<sup>2</sup>/г — для сорбента Мэ4Ка, 165 м<sup>2</sup>/г — для сорбента Тэ4Ка, 172 м<sup>2</sup>/г — для фазы ПА 1:0.1 и 185 м<sup>2</sup>/г — для ПАМ 1:0.1. Размер пор для образцов данных сорбентов составил 112 Å.

*Сорбенты, полученные по реакции Уги. Изучение* высушенных образцов методом *газовой хромато-масс-спектрометрии в условиях термодесорбции* доказало закрепление фрагментов на поверхности матрицы. При нагревании до 250°C образцов сорбентов Мэ4Ка и Тэ4Ка регистрировали сигналы остатков соответствующих изоцианидов. На масс-хроматограмме продуктов термического разложения Мэ4Ка наблюдали интенсивный пик, соответствующий 2-морфолиноэтанамину, основные сигналы в масс-спектре: m/z 100, m/z 70, m/z 56, сигнал молекулярного иона малоинтенсивен. На масс-хроматограмме Тэ4Ка наблюдали интенсивный пик, соответствующий 4-метилтиофенолу, основные сигналы в масс-спектре: m/z 124 (молекулярный ион), m/z 91, m/z 79, m/z 77.

*Сорбенты, полученные с использованием эремомицина. Изучение* высушенных образцов *методом газовой хромато-масс-спектрометрии в условиях термодесорбции* доказало закрепление эремомицина на поверхности разных матриц: силикагеля, аминопропилсиликагеля и полистирол-дивинилбензола. При нагревании до 250°C образцов трех сорбентов регистрировали сигналы фрагментов молекулы эремомицина. На масс-хроматограмме продуктов термического разложения сорбентов С-Э, С<sub>А</sub>-Б-Э и П-2Б-Э наблюдали пики, предположительно относящиеся к крезолам или бензиловому спирту (время удерживания ~5 мин), разветвленных С<sub>7</sub>-С<sub>10</sub> гидроксизамещенных енонов и сложных эфиров (8-10 мин), в том числе,

предположительно, изопропилового эфира 3,4-диметил-2,4-пентадиеновой кислоты, 6-этил-7-гидрокси-4-октен-3-она, а также 2,4-диметил-1,3-циклопентандиона. Отличительной особенностью образцов С<sub>А</sub>-Б-Э и П-2Б-Э от С-Э явилось присутствие пика (10.2 мин) азотсодержащего фрагмента с основными сигналами  $m/z$  84, 86 и 128, предположительно, 1,1,4-триметил-3-пиразолона, образование которого легко объяснить циклизацией при расщеплении пептидных связей молекулы эремомицина. Такое различие может быть связано с близостью матрицы силикагеля и фазы С-Э, образующей водородные связи, вследствие чего отщепляются только самые летучие фрагменты молекулы антибиотика. Обнаруженные сигналы хорошо согласуются с молекулярной структурой эремомицина и отсутствуют на хроматограммах других изученных сорбентов, не содержащих эремомицин.

## **2.5. Заполнение хроматографических колонок**

Для упаковки синтезированных сорбентов использовали колонки размерами 100×3 мм и заполняли их при давлении 300–400 бар. Для приготовления суспензии сорбентов на основе силикагеля использовали смесь 10 мл 0.1 М раствора КСl, 8 мл этанола и 2 мл 1,4-диоксана, на основе ПС-ДВБ — 20 мл воды. В качестве подвижной фазы для упаковки сорбентов на основе силикагеля использовали дегазированный ацетонитрил, для полимерных — 0.1 М раствор карбоната натрия.

## **2.6. Условия хроматографического разделения**

Для сравнения полученных фаз использовали наборы модельных веществ разных классов, характеризующихся различной гидрофильностью и кислотно-основной природой: углеводы, водорастворимые витамины, органические и аминокислоты, азотистые основания и нуклеозиды, гербициды и фосфоновые кислоты, а также галогенуксусные кислоты и алкилбензолы для ряда сорбентов. Хроматографические параметры устанавливали для каждого класса веществ в условиях, выбранных в лаборатории хроматографии ранее и приведённых в табл. 9. Для определения мёртвого времени для сорбентов на основе силикагеля использовали толуол, для фаз на основе ПС-ДВБ — воду [31]. Для разделения смеси витаминов как правило использовали градиентное элюирование: 0-3.5 мин 10 об.% ААБ рН 5.4, 3.5-5 мин от 10 до 28 об.% ААБ, от 5-15 мин 28 об.% ААБ, скорость потока 1 мл/мин. Для каждого сорбента при необходимости подбирали

отдельно долю водной части на второй ступени градиента, а также время ее изменения, с целью достижения полного разделения 7 витаминов.

Таблица 9. Условия разделения полярных аналитов

Класс веществ	Доля водной части в подвижной фазе, об. %	Состав водной части	Детектирование
Углеводы	15	H <sub>2</sub> O	рефрактометрическое
Гербициды и фосфоновые кислоты	90	100 мМ АФБ рН 4.0	рефрактометрическое
Слабоудерживаемые витамины	10	100 мМ ААБ рН 5.4	УФ 270 нм
Сильноудерживаемые витамины	20		
Слабоудерживаемые витамины*	7	100 мМ АФБ рН 3.0	УФ 270 нм
Сильноудерживаемые витамины*	30		
Аминокислоты	15**	1 мМ ФБ рН 6.5	УФ 210 нм
	20		
Карбоновые кислоты	20	10 мМ ФБ рН 7.0	УФ 200 нм
Азотистые основания, нуклеозиды	10	20 мМ ААБ рН 4.7	УФ 254 нм
Тест Танака ***			
Алкилбензолы	85	H <sub>2</sub> O	УФ 254 нм

\* для сорбентов на основе ПС-ДВБ;

\*\* для сравнения партий 3-аминопропилсиликагеля

\*\*\* в тесте Танака скорость потока 0,5 мл/мин, в остальных случаях 1 мл/мин.

### 2.7. Уравновешивание колонок

Работа в условиях низких концентраций фосфатных буферных растворов требовала дополнительного этапа уравновешивания колонок. Подготовка к разделению органических и аминокислот состояла в промывке колонки в течение 1-2 часов подвижной фазой состава 20 мМ фосфатный буферный раствор рН 6.5/ацетонитрил 30/70 об. % при скорости потока — 1 мл/мин.

Для регистрации и уменьшения времени переуравновешивания колонки в условиях градиентного элюирования смеси витаминов между экспериментами проводили дополнительные вколы толуола или никотинамида в условиях, соответствующих первой ступени градиента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе получено 35 сорбентов путём ковалентного модифицирования разных матриц с помощью различных новых подходов к формированию новых функциональных слоев, а также для работы предоставлены 2 сорбента и 4 партии 3-аминопропилсиликагеля ЗАО “БиоХимМак СТ” (Москва, Россия).

Работа состояла из следующих этапов:

- 1) Сравнение свойств 3-аминопропилсиликагеля с разным содержанием азота и выбор соответствующей партии с лучшими хроматографическими параметрами для дальнейшего использования в качестве матрицы и модифицирования различными способами.
- 2) Ковалентное модифицирование выбранной партии 3-аминопропилсиликагеля по реакции Уги.
  - А) Выбор условий модифицирования.
  - Б) Пространственное удаление мономерного слоя, сформированного по реакции Уги
  - В) Формирование мономерного слоя по реакции Уги (варьировали компоненты реакции: 5 изоцианидов, 4 карбонильных соединения, 2 аминокислоты).
  - Г) Формирование полимерного слоя по реакции Уги (варьировали 5 полимерных соединений, молекулярную массу полимера, соотношение матрица:полимер по массе).
  - Д) Сравнение моно- и полимерных слоев, полученных по реакции Уги.
- 3) Ковалентное модифицирование эремомицином 3 матриц на основе силикагеля, 3-аминопропилсиликагеля и сополимеров стирола и дивинилбензола.
- 4) Сравнение свойств полученных сорбентов.
- 5) Анализ реальных объектов.

Для изучения свойств, характеристики и сравнения полученных сорбентов использовали тест Танака для гидрофильных неподвижных фаз [116, 117], а также модельные смеси углеводов, водорастворимых витаминов, нуклеозидов и азотистых оснований, карбоновых, фосфоновых, галогенуксусных и аминокислот.

### ГЛАВА 3. Сравнение свойств 3-аминопропилсиликагеля с различным содержанием азота<sup>1</sup>

3-Аминопропилсиликагель — самостоятельно применяемая фаза, которая может представлять матрицу для дальнейшего модифицирования. На первом этапе работы сравнивали свойства разных партий 3-аминопропилсиликагеля с различным содержанием азота согласно результатам элементного анализа.

Среди наиболее доступных методов предварительного исследования модифицированных сорбентов на основе силикагеля распространение получил элементный анализ. Необходимо отметить, что при определении количества закрепленных на матрице аминопропильных радикалов обычно рекомендуется опираться на данные элементного анализа по азоту, поскольку при оценке по углероду возможны ошибки из-за недостаточно полного освобождения образца от непрореагировавших якорных алкоксигрупп [32]. Тем не менее, содержание азота в партиях аминопропилсиликагеля обычно составляет 1-3%, и надежность его определения невелика. При этом аминофазы, имеющие небольшие различия в содержании азота по результатам элементного анализа, могут демонстрировать значимые различия в хроматографических свойствах, которые будут влиять не только на необходимость изменения условий элюирования при использовании таких неподвижных фаз, но и на выбор условий их последующего модифицирования. Было проведено сравнение хроматографических характеристик 4 аминофаз с различным количеством привитых функциональных групп согласно данным элементного анализа по содержанию углерода и азота (табл. 10). Сравнение сорбентов осуществляли посредством изучения их хроматографических характеристик в гидрофильном режиме по удерживанию полярных соединений.

Важно было не только оценить соответствие хроматографических свойств аминофаз и данных элементного анализа с целью предсказания их сепарационных возможностей на основании характеристик, предоставляемых производителями, но

---

<sup>1</sup> При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

1. **Чикурова Н.Ю.**, Шемякина А.О., Крыжановская Д.С., Шпигун О.А., Чернобровкина А.В. Сравнение свойств 3-аминопропилсиликагеля с разным содержанием азота в режиме гидрофильной хроматографии // Вест. Моск. университет. 2023. Т.64. № 3. С. 245. 60%.

и установить параметры, с помощью которых можно было бы более подробно охарактеризовать новые партии аминофаз с точки зрения их возможностей по удерживанию и разделению полярных веществ, различных по природе.

Таблица 10. Величины коэффициентов селективности теста Танака. Факторы удерживания витаминов и органических кислот

Матрица		M1	M2	M3	M4
<b>Результаты элементного анализа</b>					
%	Углерод (С)	5.74	6.32	6.40	5.88
	Азот (N)	1.52	1.67	1.70	2.10
<b>Селективность</b>					
Тест Танака	k(U)	2.5	2.9	4.0	3.6
	$\alpha$ (CX)	0	0	0	0
	$\alpha$ (AX)	22.2	19.1	14.3	16.6
	$\alpha$ (V/A)	1.6	1.3	1.4	1.4
	$\alpha$ (CH <sub>2</sub> )	1.2	1.4	1.5	1.4
	$\alpha$ (OH)	1.9	1.8	2.1	1.6
	$\alpha$ (Tb/Tr)	0.7	0.7	0.7	0.7
k'(аденозин)/k'(аденин)		1.4	1.4	1.5	1.7
<b>Вещество</b>		<b>Факторы удерживания</b>			
Витамины	V <sub>3</sub> амид	0.6	0.7	0.7	0.7
	V <sub>6</sub>	1.8	1.9	2.2	2.1
	V <sub>1</sub>	3.2	3.2	5.1	4.7
	V <sub>2</sub>	4.8	4.8	5.2	5.5
	V <sub>3</sub> кислота	10.8	13.1	12.3	10.5
	V <sub>12</sub>	11.4	11.9	13.7	14.5
	C	44.3	54.8	55.2	46.1
Органические кислоты	Пировиноградная	0.9	0.8	0.8	0.7
	Молочная	1.9	1.8	1.8	1.7
	Уксусная	2.3	2.2	2.1	1.9
	Гликолевая	2.9	2.9	3.1	2.7
	Аскорбиновая	4.6	4.8	5.1	4.4
	Фумаровая	8.5	8.8	8.2	7.6
	Глутаровая	12.6	12.6	12.3	11.3
	Янтарная	14.2	14.4	14.5	13.2
	Винная	17.8	19.1	21.7	18.2
	Щавелевая	24.0	26.4	27.4	25.3

Тест Танака: ПФ CH<sub>3</sub>CN—20 mM ААБ с рН 4.7 (90:10%); скорость потока 0.5 мл/мин; УФ-детектирование, 254 нм. ПФ для никотинамида (V<sub>3</sub>), V<sub>6</sub>, V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>CN—100 mM ААБ, рН 5.4 (90:10%); ПФ для никотиновой кислоты (V<sub>3</sub>), V<sub>12</sub>, C: CH<sub>3</sub>CN—100 mM ААБ, рН 5.4 (80:20, по объему); скорость потока 1 мл/мин; УФ-детектирование при 270 нм. ПФ для кислот: CH<sub>3</sub>CN—10 mM ФБ раствор, рН 7.0 (80:20%); скорость потока 1 мл/мин; УФ-детектирование при 200 нм. M1-M4 — 3-Аминопропилсиликагель партий № 1-4 соответственно.

Для оценки гидрофильности, катионно- и анионообменной селективности аминофаз разных партий использовали тест Танака для гидрофильных сорбентов, результаты которого представлены в табл. 10. Метиленовая  $\alpha(\text{CH}_2)$  и селективность по отношению к стереоизомерам  $\alpha(\text{V/A})$  значительно не изменялись для всех матриц, а величины  $\alpha(\text{Tb/Tr}) < 1$  подтверждают основную природу аминофаз.

**Гидрофильность.** Согласно факторам удерживания уридина  $k_U$ , характеризующим гидрофильность сорбентов, показано, что в целом существует тенденция увеличения гидрофильности фаз с увеличением доли азота, и, следовательно, количества привитых функциональных групп в партиях аминопропилсиликагеля. При этом, для матриц М2 и М3 с близким содержанием азота получены существенные различия в гидрофильности, и партия М3, с 1.70% азота продемонстрировала самый большой фактор удерживания уридина ( $k_U = 4.0$ ). Наибольшее значение параметра гидроксильной селективности  $\alpha(\text{OH}) = 2.1$  для М3, также коррелирующей с гидрофильностью согласно [116], подкрепляет полученные для этой матрицы характеристики. Таким образом, установлены различия в данных элементного анализа и некоторых хроматографических характеристиках аминофаз в гидрофильном режиме, что вызывает необходимость изучения свойств таких сорбентов на примере разделения разных классов веществ.

Нейтральные полярные сахара удобно использовать для оценки гидрофильности неподвижных фаз, поскольку они представляют собой вещества, удерживание которых в основном обусловлено распределительным механизмом в ГИХ. Хроматограммы смеси 5 сахаров на разных партиях аминопропилсиликагеля представлены на рис. 27. Действительно, при увеличении гидрофильности фазы, оцененной согласно фактору удерживания уридина  $k_U$  в тесте Танака, происходило значительное увеличение времен удерживания сахаров в соответствии с возрастанием адсорбции приповерхностного водного слоя неподвижной фазы. Данные элементного анализа, представленные для сорбентов, в случае М4 не согласуются ни с гидрофильностью, ни с удерживанием углеводов. Однако, показана зависимость между гидрофильностью аминофазы, оцененной по тесту Танака, и удерживанием полярных нейтральных сахаров на ней. Необходимо отметить, что существенное изменение времен удерживания происходило даже при

небольших различиях в содержании азота: для наиболее гидрофильной матрицы М3 наблюдали их возрастание в 3 раза.

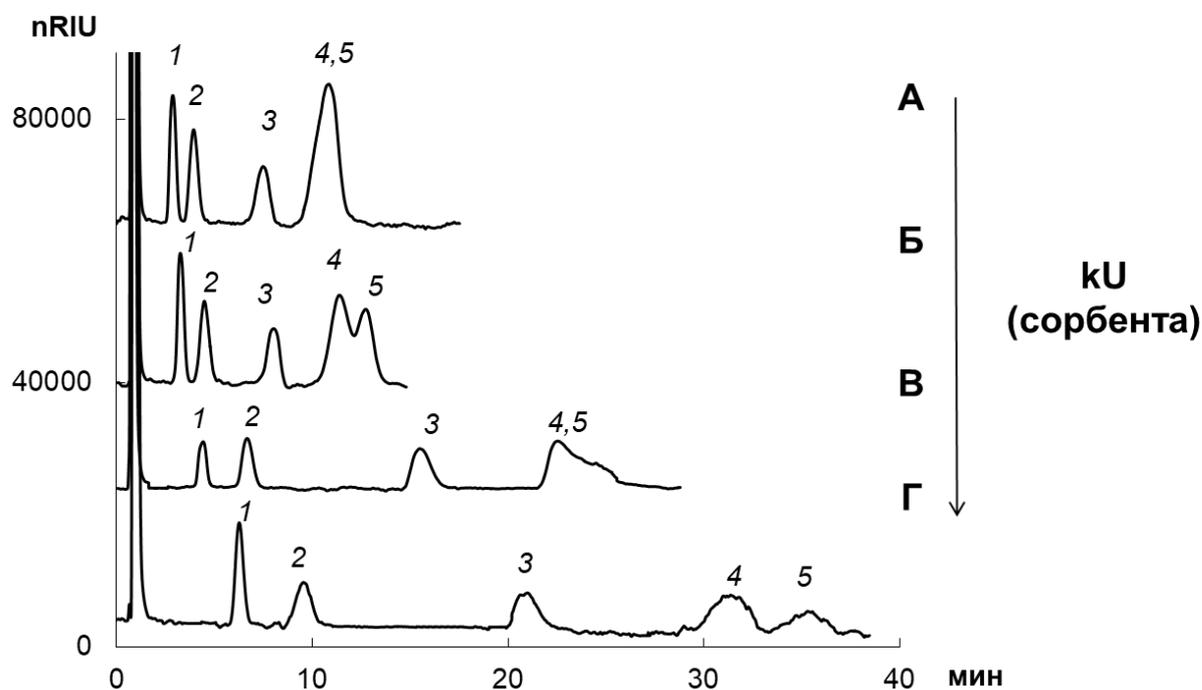


Рис. 27 Хроматограммы модельных смесей сахаров в условиях, указанных в табл. 9. Фазы: М1 (А), М2 (Б), М4 (В), М3 (Г). 1 — фруктоза, 2 — глюкоза, 3 — сахароза, 4 — мальтоза, 5 — лактоза.

Уридин, который используют в тесте Танака для оценки гидрофильности сорбентов, представляет собой нуклеозид, поэтому рассмотрено также разделение других полярных азотистых оснований и нуклеозидов, так как ожидаемо влияние гидрофильности на удерживание веществ данных классов. Хроматограммы модельных смесей 11 азотистых оснований и нуклеозидов на аминофазах приведены на рис. 28. При увеличении гидрофильности сорбентов наблюдали увеличение селективности для пары аденозин/уридин и её уменьшение для пары 2'-дезоксинуридин/аденин. Для фаз, характеризующихся близкой гидрофильностью (пара фаз М1 / М2, а также М3 / М4), отметили одинаковый порядок элюирования азотистых оснований и нуклеозидов и близкую селективность по данным веществам. При этом наблюдали одинаковую селективность по паре уридин/цитозин для фаз М1, М2, М4 с сопоставимым количеством азота (1.52-1.70%) и её увеличение для фазы М4 с 2.10% азота, для которой также отмечено уменьшение селективности по паре цитозин/цитидин за счет значимого увеличения фактора удерживания цитозина на матрице М4. Таким образом, на удерживание и селективность в отношении азотистых оснований и нуклеозидов, для которых

характерен вклад адсорбционных взаимодействий в механизм удерживания, влияет не только гидрофильность аминофаз, но и количество привитых групп.

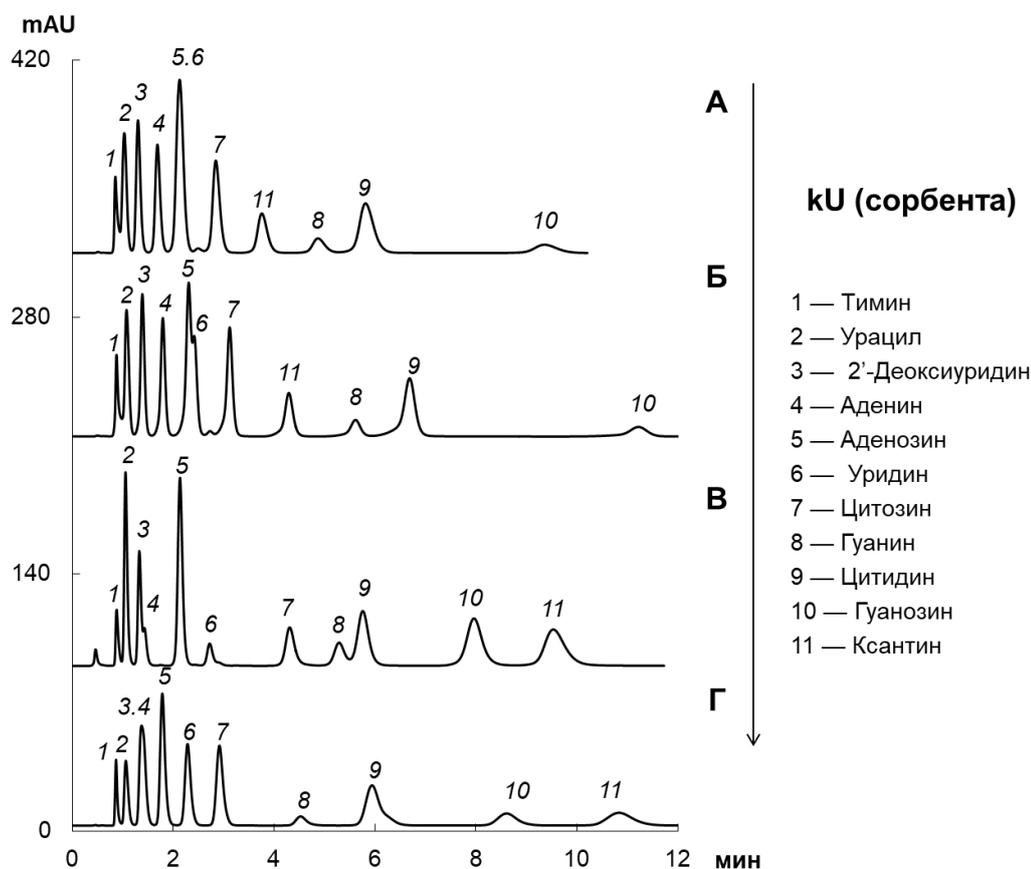


Рис. 28. Хроматограммы модельных смесей азотистых оснований и нуклеозидов в условиях, указанных в табл. 9. Фазы: М1 (А), М2 (Б), М4 (В), М3 (Г).

Для никотинамида и пиридоксина, положительно заряженного тиамина и аскорбиновой кислоты, — максимальные факторы удерживания среди всех матриц продемонстрировала наиболее гидрофильная фаза М3. Для рибофлавина, а также цианокобаламина, для которого характерно образование водородных связей с функциональными группами сорбента, наибольшие факторы удерживания получены на фазе М4 с большей долей аминогрупп.

Оценить вклад образования водородных связей в удерживание аналитов позволяет применение подхода, предложенного в работе [118]. Расчёт коэффициента селективности для аденозина и аденина показал, что  $k'(\text{аденозин})/k'(\text{аденин})$  возрастает в ряду сорбентов М1, М2, М3, М4 (табл. 10), что согласуется с увеличением количества азота по данным элементного анализа фаз. Эти экспериментальные данные подтверждают значимое увеличение вклада образования водородных связей с аналитами для партии М4, что свидетельствует в

пользу доступности привитых аминогрупп для взаимодействий с некоторыми полярными веществами.

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

**Ионообменная селективность.** По результатам теста Танака (табл. 10) для всех аминофаз М1-М4 показано отсутствие *катионообменной селективности*  $\alpha$  (СХ), что в сравнении с большой величиной этого параметра для силикагеля ( $\alpha$  (СХ) = 45.10) свидетельствует об успешном модифицировании силанольных групп и экранировании поверхности частиц аминогруппами аминопропилтриэтоксисилана. При этом для всех аминофаз отмечено проявление *анионообменной селективности*  $\alpha$  (АХ).

Уменьшение  $\alpha$  (АХ) с возрастанием гидрофильности матриц свидетельствует об уменьшении концентрации аминогрупп, доступных для ионного обмена и согласуется с результатами, полученными для сахаров. Отсутствие прямой зависимости между гидрофильностью и анионообменной селективностью может также быть связано с тем, что основность привитых аминсоединений на силикагеле может заметно уменьшаться из-за их взаимодействия по типу «арочных структур» с остаточными силанольными группами [32].

В условиях разделения, используемых в данной работе, органические кислоты [135] диссоциированы ( $pK_{a,i} < 5.7$ ). Интересно отметить, что, несмотря на значительное уменьшение анионообменной селективности, на самом гидрофильном сорбенте М3 наблюдали самые большие факторы удерживания для сильноудерживаемых органических кислот: янтарной, винной и щавелевой (табл. 10). Таким образом, показано, что в данных условиях элюирования удерживание органических кислот определяется в большей степени гидрофильностью, что может быть связано с понижением анионообменной селективности сорбентов при переходе к условиям разделения (рН 7.0) и уменьшением электростатических взаимодействий отрицательно заряженных кислот и аминофаз. Существенных различий в селективности не наблюдали. Для

никотиновой и аскорбиновой кислот также наблюдали наибольшие факторы удерживания на самой гидрофильной фазе М3.

Таким образом, показано, что гидрофильность аминофазы существенно определяет ее хроматографические свойства в отношении большинства рассмотренных отрицательно заряженных полярных веществ в условиях их разделения.

**Разделение аминокислот.** Для разделения цвиттер-ионных аминокислот в условиях низкой концентрации фосфатного буферного раствора проводили дополнительное уравнивание колонок [159]: промывали в течение 1 часа подвижной фазой состава 20 мМ фосфатный буферный раствор рН 6.5/ацетонитрил, 30/70 об. % при скорости потока 1 мл/мин. Несмотря на это, при переходе к рабочим условиям уравнивание колонок с аминофазами составляло несколько часов, что может быть связано с затруднением образования стабильного приповерхностного водного слоя в условиях невысокой концентрации фосфат-ионов, которые являются космотропами.

Хроматограммы смесей 7 аминокислот приведены на рис.29. При небольших различиях в содержании азота (матрицы М1-М3) не наблюдали значительного изменения времен удерживания аминокислот, в то время как увеличение степени покрытия силикагеля аминогруппами на 15-20% привело к возрастанию таковых в 2 раза, а также к изменению селективности в отношении пары серин ( $\log P = -3.46$ )/аланин ( $\log P = -2.99$ ) согласно возрастанию гидрофильности аналитов. Наибольшие времена удерживания аминокислот для матрицы М4 с максимальным содержанием азота свидетельствуют о доступности привитых аминогрупп для адсорбционных взаимодействий. Данная тенденция сохраняется и при увеличении доли водной составляющей в элюенте до 20%, когда адсорбционные взаимодействия могут вносить меньший вклад по сравнению с распределительными в случае увеличения толщины приповерхностного водного слоя [160].

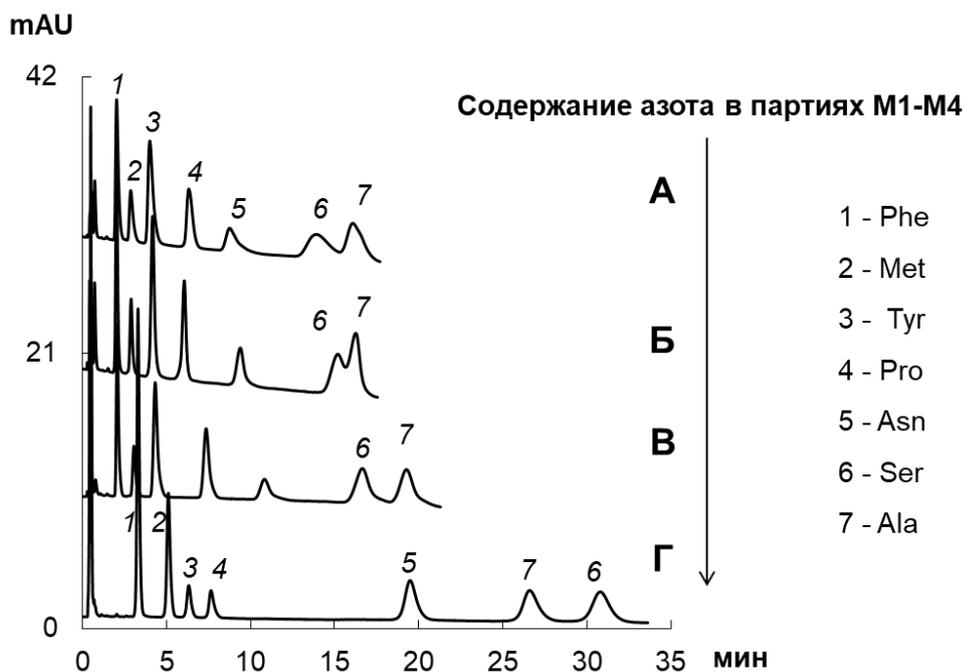


Рис.29. Хроматограммы модельных смесей аминокислот в условиях, указанных в табл. 9. Сорбенты: М1 (А), М2 (Б), М3 (В), М4 (Г).

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

**Эффективность.** При рассмотрении эффективности колонок по разным классам полярных веществ наблюдали общую тенденцию к ее увеличению при возрастании доли азота в партии аминопропилсиликагеля (рис. 30). Эффективность колонки с фазой М2 по органическим кислотам, витаминам, нуклеозидам, азотистым основаниям несколько превысила таковую по сравнению с М4.

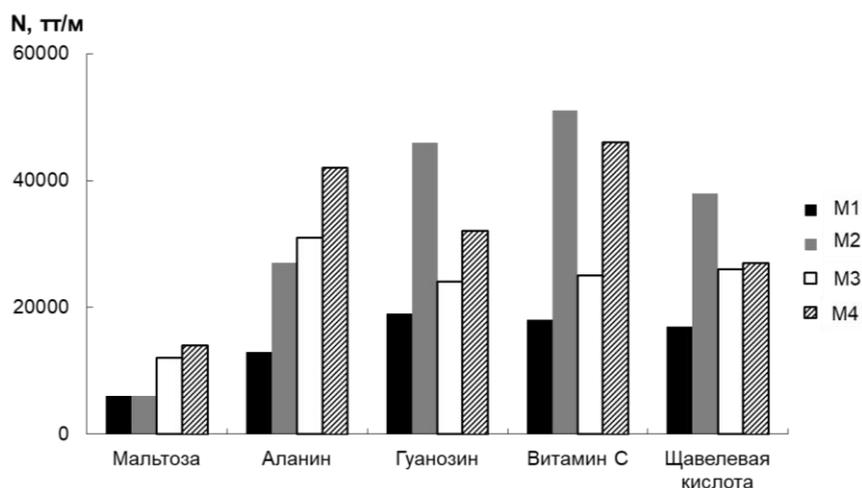


Рис. 30. Диаграмма эффективности определения модельных полярных веществ разной природы в условиях, указанных в табл. 9.

**Стабильность.** На рис. 31 приведены хроматограммы азотистых оснований и нуклеозидов, полученные на новых заполненных колонках М3 и М4 (первоначальные хроматограммы) и спустя длительное время их эксплуатации и хранения при комнатной температуре. Наблюдали значительное уменьшение времен и факторов удерживания рассматриваемых полярных веществ на фазах М3 и М4, а также эффективности фазы М3 после длительного хранения колонок, что может быть связано с деградацией неподвижной фазы и потерей привитых групп.

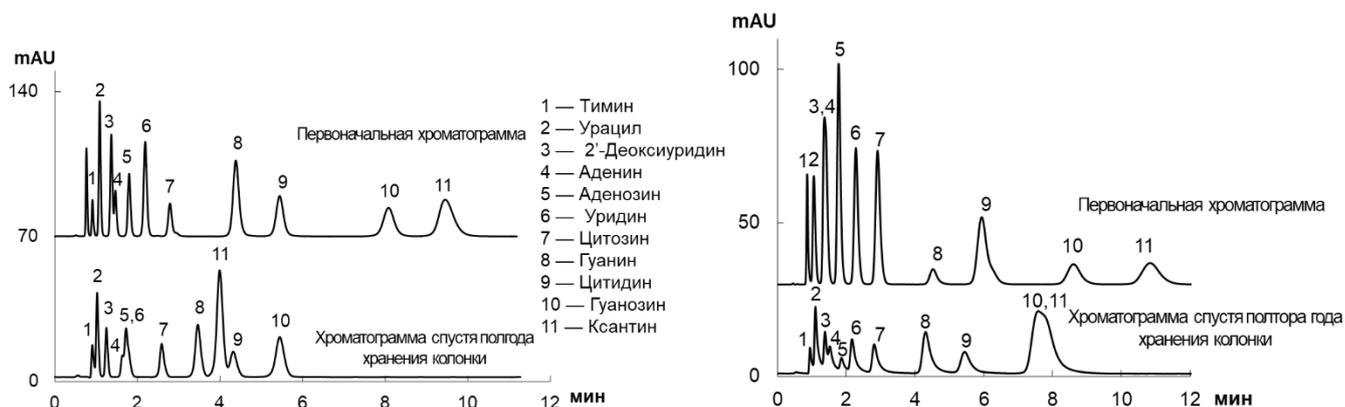


Рис. 31. Хроматограммы удерживания полярных веществ в ходе эксплуатации колонок (М4 — 2.10% N, *слева*); (М3 1.70% N, *справа*); ПФ: 20 мМ ААБ (рН 4.7) — CH<sub>3</sub>CN (10:90%); УФ-детектирование при 254 нм; скорость потока 1 мл/мин.

\* \* \*

Таким образом, на первом этапе работы установлено, что содержание азота, то есть концентрация привитых аминогрупп в разных партиях аминофаз коррелирует с факторами удерживания аминокислот, азотистых оснований и нуклеозидов, витаминов В<sub>2</sub> и В<sub>12</sub>, — тех веществ, для которых характерны адсорбционные взаимодействия, включая образование водородных связей с функциональными группами сорбента. Для аналитов, в удерживание которых в гидрофильном режиме распределение вносит больший вклад (углеводы), именно оценка гидрофильности способствует предсказанию свойств аминофаз. Следовательно, важно не только контролировать содержание азота в партиях 3-аминопропилсиликагеля, но также информативной является оценка гидрофильности сорбента по тесту Танака, с помощью которой можно будет судить об удерживании различных полярных веществ и выбирать требуемые партии аминофазы для хроматографического разделения соединений конкретных классов или для их дальнейшего модифицирования. Для создания новых неподвижных фаз была выбрана наиболее гидрофильная матрица М3 (kU = 4.0) с 1.70% азота согласно результатам элементного анализа, в дальнейшем М3 обозначена как матрица С<sub>А</sub>.

## ГЛАВА 4. Сорбенты, синтезированные с помощью многокомпонентной реакции Уги

В соответствии с обзором литературы преимуществами реакции Уги для синтеза неподвижных фаз являются: высокий выход, быстрота протекания, мягкие условия проведения. В работе данная реакция была выбрана для создания функционального слоя новых фаз путем модифицирования 3-аминопропилсиликагеля. Важно отметить, что предложенная реакция характеризуется вариативностью и позволяет путем замены различных компонентов получать большое число производных. На первом этапе проводили выбор оптимальных условий реакции, выход которой зависит от ряда факторов, далее последовательно варьировали компоненты реакции на этапе синтеза: изоцианид, карбонильное соединение и кислоту, чтобы оценить влияние каждого формируемого структурного фрагмента на свойства получаемых неподвижных фаз.

### 4.1. Влияние условий реакции Уги

В соответствии с литературными данными, на выход продукта реакции Уги влияет время синтеза, растворитель, катализатора, температура, соотношение и природа реагентов. Важно отметить, что для проведения реакции на твердом носителе может требоваться значительное время.

В данной работе на основании факторов удерживания тестовых аналитов (Приложение 1) провели сравнение условий модифицирования матрицы С<sub>А</sub>. В случае использования *трет*-бутилизоцианида (сорбенты серии Б), *п*-толуолсульфонилметилизоцианида (сорбенты Т), этилизоцианацетата (сорбенты Э), диэтилизоцианометилфосфоната (сорбент Ф) ожидали уменьшения гидрофильных и анионообменных свойств сорбентов по сравнению с матрицей ( $kU = 4.0$ ,  $\alpha(AH) = 14.3$ ), аминопропильный фрагмент которой характеризуется меньшим значением параметра гидрофобности ( $\log P = 0.55$ ) и основными свойствами  $pK_a = 10.9$ . В случае использования 2-морфолиноэтилизоцианида (сорбенты М) прогнозировали увеличение гидрофильности. Фрагмент реакции Уги за счёт наличия третичного амина в структуре морфолина обладает основными свойствами с  $pK_a = 6.67$  (ACD/Labs 12.01). В отличие от аминопропильного фрагмента, протонированного в условиях разделения, остаток морфолина в

функциональном слое фаз М остаётся незаряженным за счёт смещения положений кислотно-основных равновесий в водно-органических смесях [161].

Для наглядного представления данных по сравнению параметров удерживания модельных веществ использовали цветовые шкалы и условные обозначения, приведенные в табл. 11. Выбор 15% в качестве границы равенства хроматографических параметров обусловлен воспроизводимостью результатов повторных синтезов. Селективность рассчитывали относительно одного соединения из класса. Увеличение интенсивности окраски связано с закономерным изменением факторов удерживания, эффективности и селективности разделения.

Таблица 11. Правила сравнения хроматографических параметров пары сорбентов

Изменение хроматографического параметра, %*	Обозначение
0-15	=
15-30	> или <
> 30	>> или <<
	корреляция $k'$ аналитов с $k_U$ сорбентов
	корреляция $k'$ аналитов** с $\alpha(AX)$

\* Пример расчёта процента изменения факторов удерживания:  $(k_2' - k_1') / k_2' \cdot 100\%$ ,  $k_2' > k_1'$  – факторы удерживания одного и того же аналита на разных сорбентах;

\*\* для аналитов, вклад в удерживание которых могут вносить электростатические взаимодействия: ксантин, аскорбиновая, никотиновая, карбоновые кислоты.

**Продолжительность проведения реакции.** Для проведения твёрдофазной реакции Уги время, требуемое для превращения реагентов, может быть значительно больше и достигать нескольких суток. Увеличение времени синтеза от 1 до 4 суток для пары сорбентов Мэ и Мэ4 с фрагментом 2-морфолиноэтилизоцианида в слое, привело к увеличению гидрофильности, а также факторов удерживания карбоновых и аминокислот (табл. 12). Для сорбентов МэКа и Мэ4Ка, полученных в присутствии хлорида аммония, наблюдали увеличение анионообменной селективности, но близкие значения гидрофильности.

Таблица 12. Влияние продолжительности проведения реакции Уги модифицирования 3-аминопропилсиликагеля на хроматографические параметры сорбентов

Параметр	Сорбент			
	Мэ	Мэ4	МэКа	Мэ4Ка
kU	3.2	3.5	4.1	4.0
$\alpha$ (АХ)	13.2	15.6	2.3	6.1
Сахара k'	=		=	
N, тт/м	>>		>>	
Азотистые k'	=		=	
N, тт/м	>		>	
Ксантин k'	<		<<	
Витамины k'	=		=	
$\alpha$	=		<	
N, тт/м	>		>	
АК 20/80* k'	<		=	
N, тт/м	=		=	
Кислоты k'	<		<	
N, тт/м	>		=	

**Влияние растворителя.** Согласно обзору литературы, наиболее высокие выходы реакции Уги происходят в спиртах: этаноле и метаноле. Проведено сравнение пяти пар фаз, отличающихся структурным фрагментом от изоцианида и полученных в разных растворителях: метаноле и этаноле, соответственно (табл. 13). Сорбент Бм, синтезированный в метаноле, близок по свойствам с матрицей, в свою очередь сорбенте Бэ, полученный в этаноле, продемонстрировал существенное уменьшение факторов удерживания сахаров, азотистых оснований, нуклеозидов, карбоновых кислот и витаминов. Для сорбентов с фрагментами п-толуолсульфонилметилизоцианида (сорбенты Т) при замене метанола на этанол также наблюдали уменьшение факторов удерживания ксантина, витаминов, аминокислот и карбоновых кислот более чем на 15%. Существенное уменьшение анионообменной селективности (на 20%), фактора удерживания уридина kU (на 30%) и аскорбиновой и никотиновой кислот происходит для сорбентов Э при этой же замене растворителя. Уменьшение факторов удерживания нейтральных и заряженных соединений при переходе от метанола к этанолу для сорбентов серий Б, Т и Э с менее гидрофильным по сравнению с матрицей функциональным слоем может быть следствием увеличения выхода реакции Уги в этаноле.

Таблица 13. Влияние растворителя, используемого в реакции Уги модифицирования 3-аминопропилсиликагеля, на хроматографические параметры сорбентов

Параметр	Сорбенты									
	Бм	Бэ	Тм4	Тэ4	Эм	Ээ	Мм4	Мэ4	Мм4Ка	Мэ4Ка
kU	3.4	3.2	3.3	2.9	3.8	2.7	3.7	3.5	3.8	4.0
$\alpha$ (АХ)	13.3	12.3	16.8	14.1	15.0	11.9	23.0	15.6	3.0	6.1
Сахара k'	>>		=		=		<<		=	
N, тт/м	<<		>				<		>>	
Азотистые k'	>>		=		-		>		=	
N, тт/м	>>		=				>		>	
Ксантин k'	<<		>		-		>>		<<	
Витамины k'	>		>		>>		>		<	
$\alpha$	>		>		>>		>>		=	
N, тт/м	=		=				>		=	
АК* k'	=		>		=		<		<	
$\alpha$	=		=		<		=		=	
N, тт/м	<		=				=		<	
Кислоты k'	>		>		>		=		<	
N, тт/м	>		>				=		<	

\*Для Бм, Бэ, Эм, Ээ данные получены при использовании подвижной фазы с содержанием ацетонитрила 85 об.%, для Тм4, Тэ4, Мм4, Мэ4, Мм4Ка, Мэ4Ка – с содержанием ацетонитрила 80 об.%

Таким образом, показано, что к увеличению степени модифицирования аминогрупп матрицы приводит использование этанола в качестве растворителя в реакции Уги. Использование изоцианидов, уменьшающих гидрофильность матрицы, и этанола приводит к уменьшению факторов удерживания полярных соединений, однако при этом существенно увеличивается эффективность, что позволяет добиться экспрессного разделения большого числа аналитов. На рис. 32 приведено сравнение эффективности и хроматограммы модельной смеси органических кислот на сорбентах Тм4, Тэ4 и матрице.

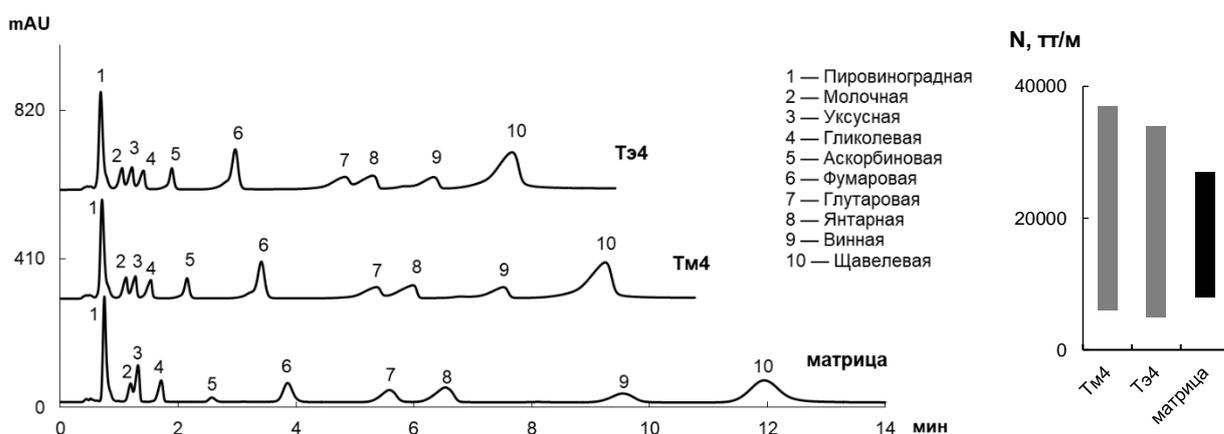


Рис. 32. Хроматограммы модельной смеси органических кислот, полученные на сорбентах Тэ4, Тм4, матрице (слева). Условия разделения указаны в табл. 9. Диапазоны эффективности (справа).

**Влияние катализатора.** Для увеличения степени модифицирования 3-аминопропилсиликагеля было предложено использовать  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и  $\text{ZnCl}_2$  в качестве катализаторов реакции.

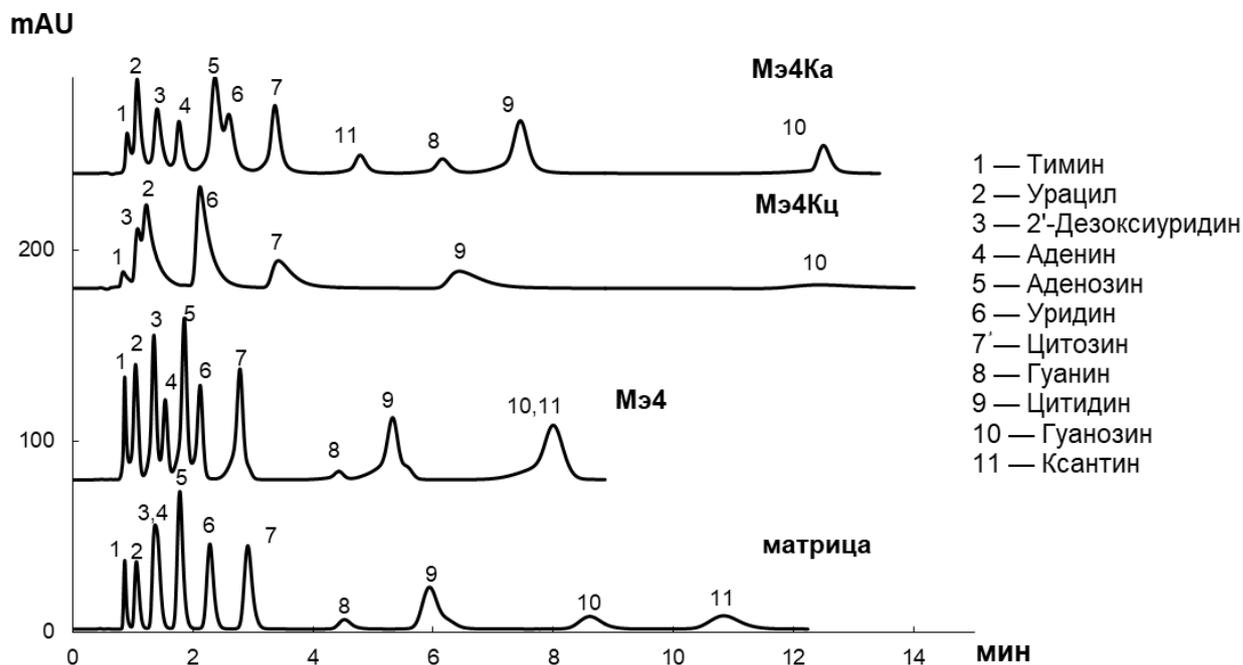


Рис. 33. Хроматограммы модельной смеси азотистых оснований и нуклеозидов, полученные на сорбентах Мэ4, Мэ4Ка, Мэ4Кц и матрице. Условия разделения указаны в табл. 9.

При добавлении катализатора для серии фаз с п-толуолсульфонилметилизоцианидом происходит уменьшение только факторов удерживания углеводов и ксантина. Близкая гидрофильность фаз может быть связана с достаточной степенью модифицирования аминогрупп матрицы в отсутствие катализатора для данного изоцианида.

Для самого гидрофильного изоцианида — 2-морфолиноэтилизоцианида проведено сравнение двух пар сорбентов, полученных с использованием катализатора  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и без него. Пара сорбентов Мм4 и Мэ4 продемонстрировала близкие значения гидрофильности и разные тенденции изменений удерживания сахаров, азотистых оснований, нуклеозидов и аминокислот, что может быть связано с не оптимальными условиями синтеза. Сорбенты Мм4Ка и Мэ4Ка обладают высокой гидрофильностью и относительно низкими значениями  $\alpha(\text{AX})$ , что может свидетельствовать о большей степени модифицирования аминогрупп матрицы (табл.14).

Добавление хлорида аммония в реакцию с 2-морфолиноэтилизоцианидом приводит к увеличению гидрофильности и уменьшению анионообменной селективности сорбентов М во всех случаях, что согласуется с увеличением

факторов удерживания незаряженных веществ и уменьшением факторов удерживания отрицательно заряженных в условиях разделения ксантина, аскорбиновой и никотиновой кислот. Уменьшение удерживания сахаров при переходе от Мэ4 к Мэ4Ка связано со сложной зависимостью их удерживания от степени модифицирования матрицы гидрофильным слоем. Аминопропилсиликагель содержит первичные аминогруппы, способные образовывать основания Шиффа с восстанавливающими сахарами, что приводит к их значительному удерживанию, тогда как для функционального слоя, формируемого по реакции Уги, это не характерно. Связь удерживания углеводов с гидрофильностью поверхности оказывается сложной: с одной стороны, увеличение степени модифицирования аминогрупп приводит к уменьшению факторов удерживания сахаров, с другой стороны, гидрофилизация поверхности для сорбентов серии М может приводить к их увеличению. Однако основным ограничением в применении солей в качестве катализаторов реакции Уги остается их низкая растворимость в реакционной смеси, что в случае использования хлорида цинка в реакции (сорбент Мэ4Кц) привело к низкой эффективности 4000-11000 тт/м и симметрии пиков (As 1.9-2.9) азотистых оснований и нуклеозидов (рис. 33), а также к сложностям уравнивания фаз.

Таблица 14. Влияние использования катализатора NH<sub>4</sub>Cl в реакции Уги модифицирования 3-аминопропилсиликагеля на хроматографические параметры сорбентов

Параметр	Сорбенты							
	Тэ4	Тэ4Ка	Мэ	МэКа	Мэ4	Мэ4Ка	Мм4	Мм4Ка
kU	2.9	2.8	3.2	4.1	3.5	4.0	3.7	3.8
α(AХ)	14.1	13.2	13.2	2.3	15.6	6.1	23.0	3.0
Сахара k'	>		=		>		<	
N, тт/м	>>		>		>>		<<	
Азотистые k'	=		<<		<		<	
N, тт/м	=		=		<		<	
Ксантин k'	>		>>		>>		>>	
Витамины k'	=		>>		>>		>>	
α	=		>>		>		>>	
N, тт/м	=		=		=		=	
АК 20/80 k'	=		<		=		=	
N, тт/м	>		<		=		>	
Кислоты k'	=		<		<		=	
N, тт/м	=		=		<		=	

#### 4.2. Влияние пространственного удаления функционального слоя, полученного по реакции Уги<sup>2</sup>

Остаточные силанольные группы 3-аминопропилсиликагеля могут взаимодействовать с аналитами, что приводит к затруднению массопереноса аналитов, низкой воспроизводимости и асимметрии хроматографических пиков. Помимо покрытия поверхности довольно объемными структурными фрагментами, одним из способов уменьшения влияния матрицы на удерживание аналитов является удаление функционального слоя от поверхности с помощью линкера. Диглицидиловые эфиры представляют собой популярный класс спейсеров, часто используемый для создания неподвижных фаз, например, новых анионообменников с пространственно удаленными четвертичными аммониевыми группами в линейных и разветвленных функциональных слоях, а также для гиперразветвленных анионообменников [156,157,158]. Использование диглицидилового эфира в качестве линкера (приложение 2) для закрепления дополнительного слоя первичных аминогрупп, которые могут участвовать в реакции Уги, может обеспечить возможность удаления полученного функционального структурного фрагмента от поверхности матрицы и потенциально позволяет увеличить общее количество фрагментов, образующихся в результате реакции Уги за счет введения до трех молекул 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (1,4-БДДГЭ).

В работе проводили сравнение двух фаз с одинаковым функциональным слоем, сформированным по реакции Уги с помощью ацетона, *трет*-бутилизотиоцианида, уксусной кислоты на поверхности матрицы (У) и с пространственным удалением такого же слоя от ее поверхности (Б-У). Сорбент, полученный с помощью 1,4-БДДГЭ, после введения линкера показал снижение значения фактора удерживания уридина до 1.5 для сорбента Б-У по сравнению с 2.3 для сорбента У, что, по-видимому, связано с наличием гидрофобных бутильных фрагментов в структуре спейсера. Селективность конфигурационных изомеров

---

<sup>2</sup> При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

2. **Chikurova N.Yu.**, Shemiakina A.O., Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V. Multicomponent Ugi reaction as a tool for fast and easy preparation of stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography. Part I: The influence of attachment and spacing of the functional ligand obtained via the Ugi reaction // J. Chromatogr. A. 2022. V. 1666. P. 462804. 50%.

$\alpha(V/A)$ , метеленовая  $\alpha(CH_2)$  и гидроксильная  $\alpha(OH)$  селективность практически не изменились, а значения  $\alpha(Tb/Tr) < 1$  подтвердили основную природу фаз.

Сорбент У, содержащий функциональный фрагмент, сформированный по реакции Уги вблизи поверхности матрицы, продемонстрировал значительное удерживание сахаров, повышенную селективность и разделение до базовой линии ( $R_s > 1.5$ ) для пары мальтоза/лактоза по сравнению с матрицей (рис. 34). Показано, что факторы удерживания и эффективность снижаются для всех рассматриваемых классов полярных аналитов на сорбенте Б-У после пространственного удаления структурного фрагмента, созданного в результате реакции Уги, что согласуется с значительным уменьшением гидрофильности по результатам теста Танака и может быть связано с значительной гидрофобностью введенного линкера. Разделение смеси 5 углеводов на сорбенте Б-У возможно лишь при использовании подвижной фазы с меньшей элюирующей силой, в то время как сорбент У обеспечил разделение 9 сахаров менее чем за 12 минут при использовании ацетонитрила и воды (85:15, по объему) в качестве подвижной фазы, обеспечивающей лучшую растворимость реальных образцов в водно-органических средах.

Таким образом, пространственное удаление слоя, сформированного по реакции Уги с помощью 1,4-БДДГЭ в качестве линкера нецелесообразно для тестируемых классов полярных веществ, поскольку оно придает некоторую гидрофобность по сравнению с исходной матрицей.

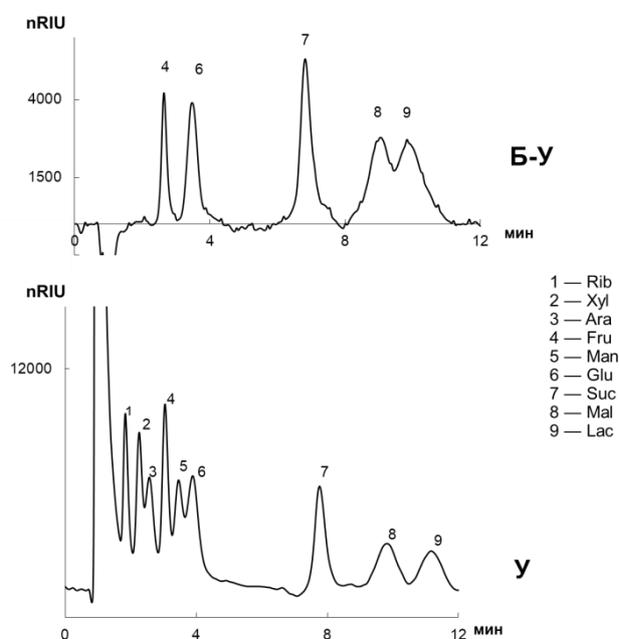


Рис. 34. Хроматограммы модельных смесей сахаров на фазах У и Б-У. Подвижная фаза:  $H_2O/CH_3CN$ , 10:90% для фазы Б-У, 15:85% для У; скорость потока, 1 мл/мин, рефрактометрическое детектирование.

### 4.3. Влияние природы изоцианида<sup>3</sup>

В рамках данной серии сравнивали 5 неподвижных фаз, полученных по реакции Уги при использовании следующих изоцианидов: трет-бутилизоцианида, п-толуолсульфонилметилизоцианида, этилизоцианацетата, диэтилизоцианометилфосфоната, а также 2-морфолиноэтилизоцианида. В качестве карбонильного соединения использовали ацетон, а в качестве кислотного компонента — гликолевую кислоту. Влияние структурного фрагмента изоцианида в слое на хроматографические свойства изучали на примере сорбентов, полученных в условиях, приводящих к наибольшей степени модифицирования матрицы: при использовании катализатора и этанола в течение 96 часов. Для упрощения в данной части работы фазы обозначены по первой букве соответствующего изоцианида.

Таблица 15. Данные теста Танака для сорбентов с различными изоцианидами и факторы удерживания некоторых веществ

Параметр	матрица	Б	Т	Э	Ф	М (АЦ)
log R (Уги)	0.55	1.67	1.82	0.79	0.68	0.04
k <sub>U</sub>	4.0	3.2	2.8	2.8	3.3	4.0
α (CH <sub>2</sub> )	1.5	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4
α (ОН)	2.0	1.8	1.7	1.8	1.9	2.3
α (V/A)	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4
α (СХ)	0	0.2	0.2	0.2	0.1	0.9
α (АХ)	14.3	12.3	13.2	12.7	13.6	6.1
Гуанозин	17.2	13.3	11.5	11.7	14.2	23.0
Щавелевая кислота	25.0	16.8	18.2	14.5	24.1	32.3
Ксантин	21.9	11.9	9.4	9.9	13.0	8.1
Витамин С	55.2	27.9	22.6	22.8	31.4	23.9
В3 кислота	12.3	8.5	7.9	7.8	9.0	5.8

**Гидрофильность.** По фактору удерживания уридина согласно тесту Танака (табл. 15) сорбенты расположены в следующем ряду: Т (2.8) = Э (2.8) < Б (3.2) = Ф (3.3) < матрица (4.0) = М (4.0). В качестве параметра, характеризующего

<sup>3</sup> При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

3. Чикурова Н.Ю., Шемякина А.О., Брыскина Д.Э., Нуриев В.Н., Комаров А.А., Статкус М.А., Ставрианиди А.Н., Чернобровкина А.В. Новый сорбент для гидрофильной хроматографии на основе силикагеля, модифицированного по реакции Уги // Журн. аналит. химии. 2021. Т.76. № 9. С. 832. 40%.

гидрофильность, может рассматриваться не только удерживание уридина, но и другого нуклеозида, незаряженного в условиях разделения. Так, по фактору удерживания гуанозина сорбент М, полученный с использованием 2-морфолиноэтилизоцианида, характеризуется большей гидрофильностью по сравнению с матрицей. Как отмечено ранее, в данных условиях разделения удерживание органических кислот определяется в большей степени гидрофильностью фаз: удерживание щавелевой кислоты также коррелирует с гидрофильностью сорбентов приведенной серии. Равенство факторов удерживания уридина для пар Т, Э и Б, Ф возможно, связано с различной степенью модифицирования матрицы, обусловленной различной реакционной способностью изоцианидов.

**Ионообменная селективность.** Уменьшение анионообменной селективности, а также удерживания анионов ксантина, аскорбиновой и никотиновой кислот (табл. 15) отмечено при модифицировании матрицы только 2-морфолиноэтилизоцианидом. В то время как сорбенты Б, Т, Э и Ф демонстрируют значения анионообменной селективности близкие к значению для матрицы, хотя удерживание витаминов кислотной природы уменьшается значительно. Вероятно, меньшие факторы удерживания аскорбиновой и никотиновой кислот на данных фазах обусловлены еще и меньшей гидрофильностью.

Необходимо еще раз подчеркнуть, что азотистые основания и нуклеозиды кроме высокой полярности характеризуются способностью к протонированию и депротонированию при определённой кислотности среды, то есть электростатические взаимодействия могут вносить вклад в их удерживание. При используемой подвижной фазе ААБ рН 4.7 / ацетонитрил ксантин находится в форме аниона [162]. Действительно, при уменьшении анионообменной селективности и гидрофильности по сравнению с матрицей на сорбентах данной серии, различающихся изоцианидом: Т, Э, Б, Ф и М, наблюдали уменьшение удерживания ксантина. Хроматограммы модельной смеси азотистых оснований и нуклеозидов приведены на рис.35. Однако на сорбенте М с близкой к матрице гидрофильностью наблюдали существенное уменьшение удерживания ксантина, что непосредственно связано с уменьшением анионообменной селективности на данном сорбенте. Важно подчеркнуть, что эффективность по модельным анализам

по сравнению с матрицей значительно возрастает для всех сорбентов серии (Приложение 1).

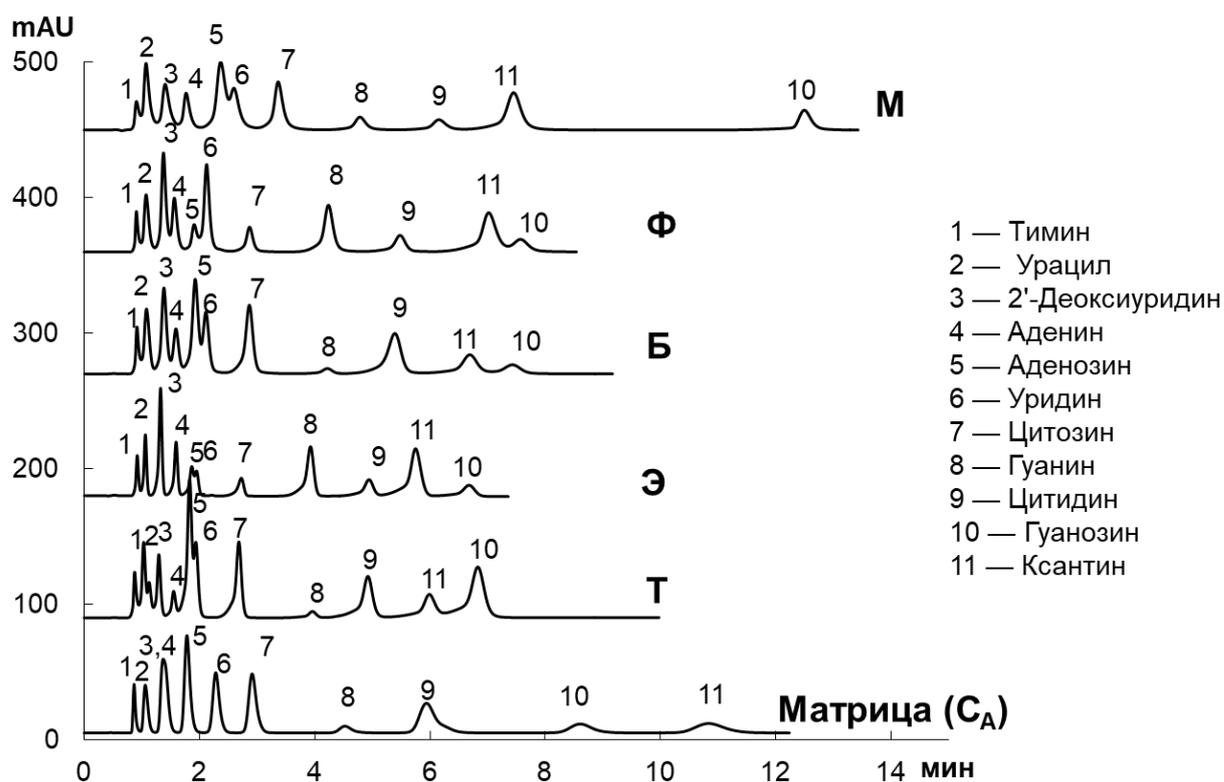


Рис.35. Хроматограммы модельной смеси азотистых оснований и нуклеозидов. Условия разделения указаны в табл. 9. Для упрощения фазы обозначены по первой букве соответствующего изоцианида.

\*\*\*

Таким образом, введение в структуру функционального слоя фрагмента от этилизоцианацетата или п-толуолсульфонилметила приводит к уменьшению гидрофильности и анионообменных свойств при существенном увеличении эффективности. Использование диэтилизоцианометилфосфоната в синтезе приводит к меньшим изменениям в удерживании тестовых аналитов на сорбентах серии Ф, что связано с близкой гидрофильностью немодифицированного и нового поверхностного слоя. Использование 2-морфолиноэтилизоцианида на стадии синтеза позволяет получить наиболее гидрофильный сорбент и позволяет сохранить значительную гидрофильность 3-аминопропилсиликагеля. Наименьшая анионообменная селективность для фазы М в отличие от Т, Э и Ф, вероятно, связана с большей степенью модифицирования аминогрупп матрицы. Показано, что использование именно 2-морфолиноэтилизоцианида для синтеза сорбентов по реакции Уги является наиболее перспективным и позволяет вводить гидрофильный фрагмент 2-морфолиноэтила в структуру получаемых фаз.

#### 4.4. Влияние природы карбонильного компонента

В рамках данной серии синтезировали 4 сорбента по реакции Уги при использовании самого гидрофильного 2-морфолиноэтилизоцианида, выбранного в предыдущем разделе, а также гликолевой кислоты в качестве кислотного компонента, и 4 различных карбонильных соединений: ацетона, 2-ацетилфурана, 2-ацетилпиррола и ацетальдегида.

Согласно тесту Танака, модифицирование по реакции Уги в данной серии практически не влияет на следующие свойства фаз: селективность по конфигурационным изомерам  $\alpha(V/A)$ , — значения находятся в интервале (1.35-1.41), — метиленовую  $\alpha(CH_2)$  и селективность по гидроксильной группе  $\alpha(OH)$ . Все синтезированные сорбенты демонстрируют основную природу поверхности ( $\alpha(Tb/Tr) < 1$ ). Однако в данной серии сорбентов, различающихся фрагментом от карбонильного соединения, два параметра изменяются значительно: гидрофильность  $kU$  и анионообменная селективность  $\alpha(AX)$  (табл. 16).

**Гидрофильность.** Сорбенты АП, АА и АЦ, полученные с использованием 2-ацетилпиррола, ацетальдегида и ацетона, соответственно, демонстрируют значительную гидрофильность, что коррелирует с низкими параметрами гидрофобности соответствующих структурных фрагментов.

Таблица 16. Данные теста Танака для сорбентов с различными карбонильными соединениями

Сорбент	Матрица $C_A$	АЦ (М)	АФ	АП	АА
$\log P$ (Уги)	0.34	-0.71	0.35	-0.14	-0.69
$k(U)$	4.0	4.0	2.8	3.8	3.1
$\alpha(AX)$	14.3	6.1	12.8	19.8	24.7
$\alpha(CX)$	0	0.9	0.1	0	0
$\alpha(CH_2)$	1.5	1.4	1.3	1.4	1.4
$\alpha(OH)$	2.1	2.3	1.8	2.0	1.9
$\alpha(V/A)$	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
$\alpha(Tb/Tr)$	0.7	0.9	0.7	0.7	0.6

Несмотря на высокую гидрофильность для всех полученных сорбентов наблюдали значительное уменьшение факторов удерживания *углеводов* по сравнению с матрицей (Приложение 3). В данном случае как было отмечено ранее, это является следствием превращения первичных аминогрупп в амидные. Таким образом, уменьшение факторов удерживания сахаров для фаз с функциональным слоем, полученным по реакции Уги, свидетельствует об успешном протекании

реакции модифицирования аминогрупп (рис. 36). Однако наблюдали увеличение селективности разделения сахаров: по сравнению с матрицей, на всех синтезированных фазах значительно улучшилось разделение пары мальтоза-лактоза, обладающих одинаковым значением параметра гидрофобности Ханша ( $\log P = -5.46$ , Epiweb 4.1). Селективность для данной пары наибольшая для самых гидрофильных сорбентов серии, полученных с использованием ацетона АЦ и 2-ацетилпиррола АП. Для всех фаз с новыми функциональными слоями эффективность значительно возросла по сравнению с матрицей, особенно на фазе АП со структурным фрагментом 2-ацетилпиррола (рис. 36, Приложение 3).

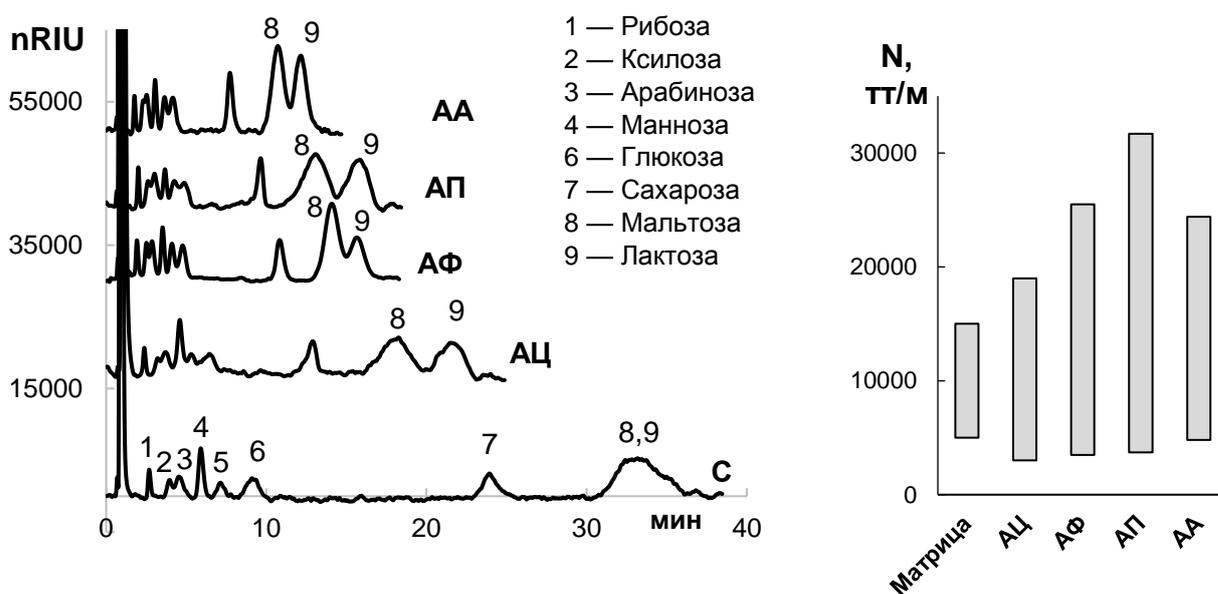


Рис. 36. Хроматограммы смеси углеводов (слева) и эффективность (справа), полученные на матрице и фазах АЦ, АФ, АП и АА в условиях, указанных в табл. 9.

Факторы удерживания нуклеозидов и азотистых оснований согласуются с гидрофильностью фаз и ожидаемо принимают наибольшие значения для сорбентов АЦ, АП и АА. Уменьшение факторов удерживания аналитов происходит на сорбенте АФ с ацетилфураном. Функциональный фрагмент, образующийся в результате реакции Уги в данном случае, характеризуется относительно высоким коэффициентов гидрофобности  $\log P (\text{Уги}) = 0.35$ , вследствие чего сорбент АФ демонстрирует меньшую гидрофильность. Использование 2-ацетилпиррола и ацетальдегида в реакции Уги привело к улучшению селективности некоторых пар соединений (Приложение 3): на матрице в выбранных условиях разделение пары 2'-дезоксигуанозин-аденин невозможно, в то время как оно достигается на сорбентах АА и АП; разделение пары аденозин-уридин на сорбентах АЦ и АФ происходит не до базовой линии ( $R_s = 1.1$ ), в свою очередь использование 2-ацетилпиррола и ацетальдегида привело к полному разделению данных аналитов

(рис. 37). Сорбент АП по сравнению с сорбентом АА продемонстрировал полное разделение пары гуанин-цитидин. Более того, использование 2-ацетилпиррола привело к увеличению эффективности по отношению к азотистым основаниям и нуклеозидам практически в 2 раза на сорбенте АП (до 80000 тт/м) по сравнению с остальными сорбентами и матрицей (рис. 37, Приложение 3).

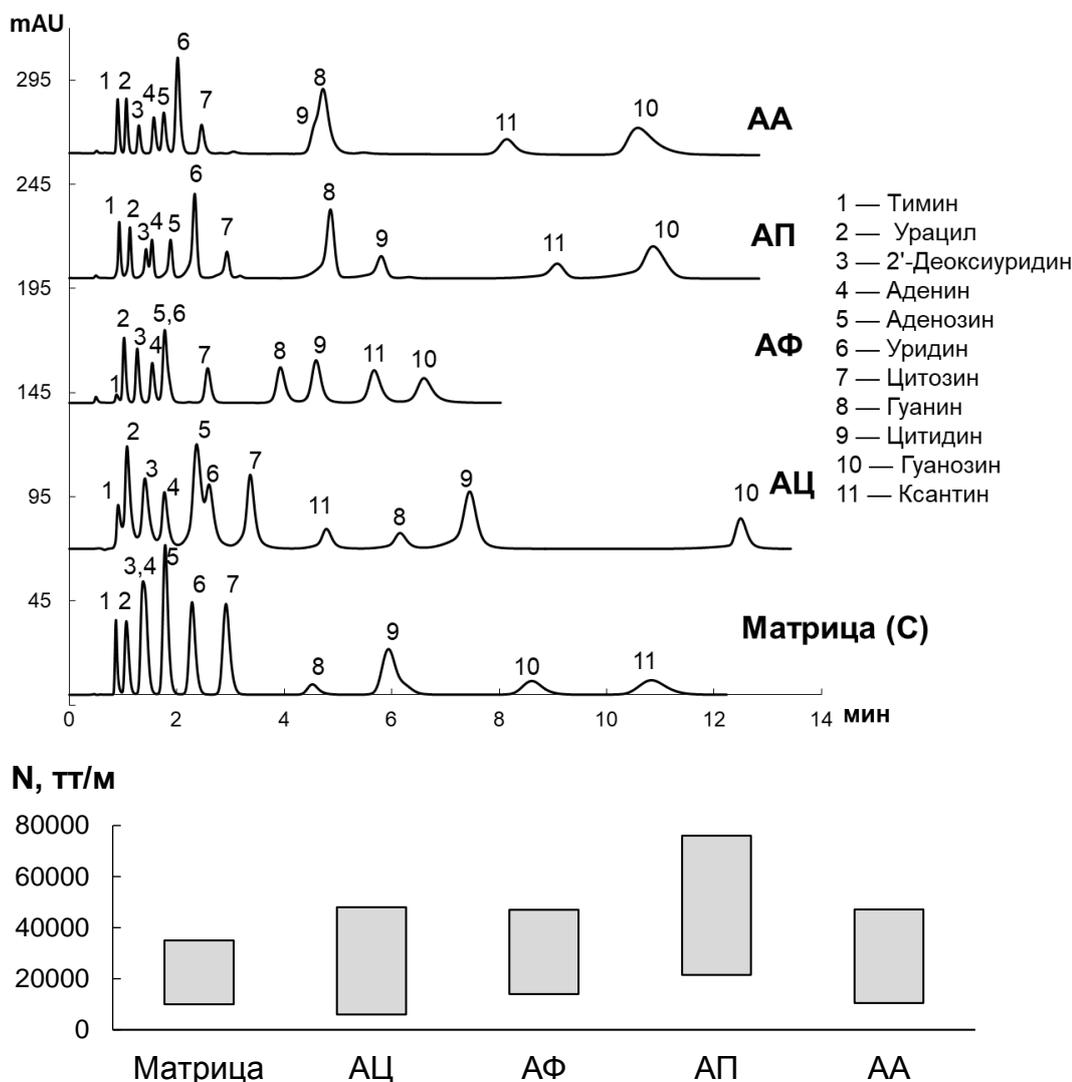


Рис. 37. Хроматограммы смеси азотистых оснований и нуклеозидов (сверху) и эффективность (снизу), полученные на матрице и сорбентах АЦ, АФ, АП и АА в условиях, указанных в табл. 9.

Основное влияние структуры функционального слоя сорбента в данном случае наблюдали для селективности разделения пары серин-аланин, структурно различающихся только присутствием гидроксильной группы. При увеличении гидрофильности сорбента по тесту Танака селективность разделения пары увеличивалась. Так, лучшую селективность разделения наблюдали для наиболее гидрофильных фаз АП и АЦ. Для наименее гидрофильного в приведенной серии

сорбента АФ отмечена самую низкую селективность по данной паре аминокислот, при этом также отмечено изменение порядка элюирования веществ (рис. 38).

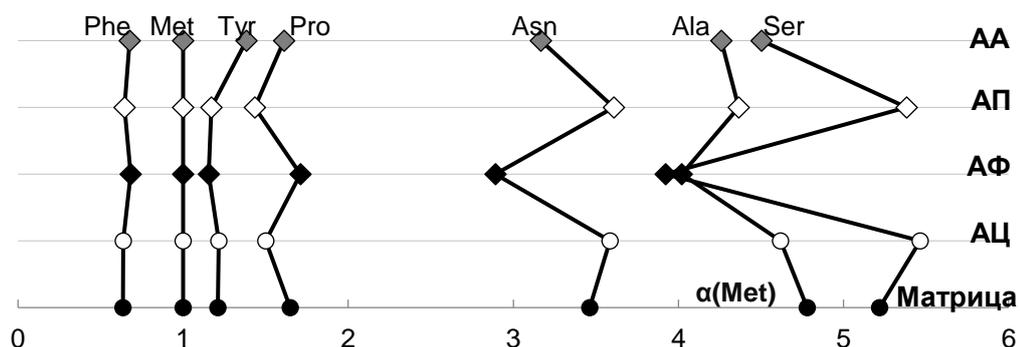


Рис. 38. Шкалы селективности для аминокислот. Фактор селективности — метионин. Получены для матрицы и сорбентов АЦ, АФ, АП и АА в условиях, указанных в табл. 9.

Хроматограммы модельных смесей аминокислот приведены рис. 39. Для всех синтезированных фаз возможно приемлемое разделение 6-7 аминокислот в выбранных условиях за 10-15 минут.

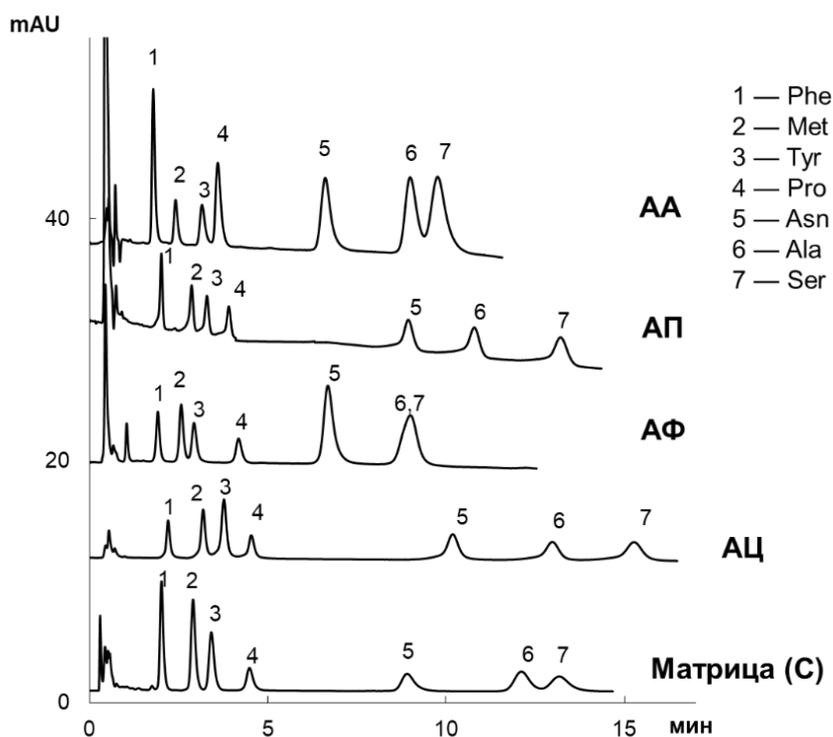


Рис. 39. Хроматограммы модельных смесей аминокислот в условиях, указанных в табл.9. Сорбенты: Матрица, АЦ, АП, АФ, АА.

В данной серии фаз, также наблюдали корреляцию между факторами удерживания кислот (рис. 40) и гидрофильностью сорбентов по тесту Танака. Наиболее гидрофильный сорбент АЦ продемонстрировал наибольшие факторы удерживания карбоновых кислот.

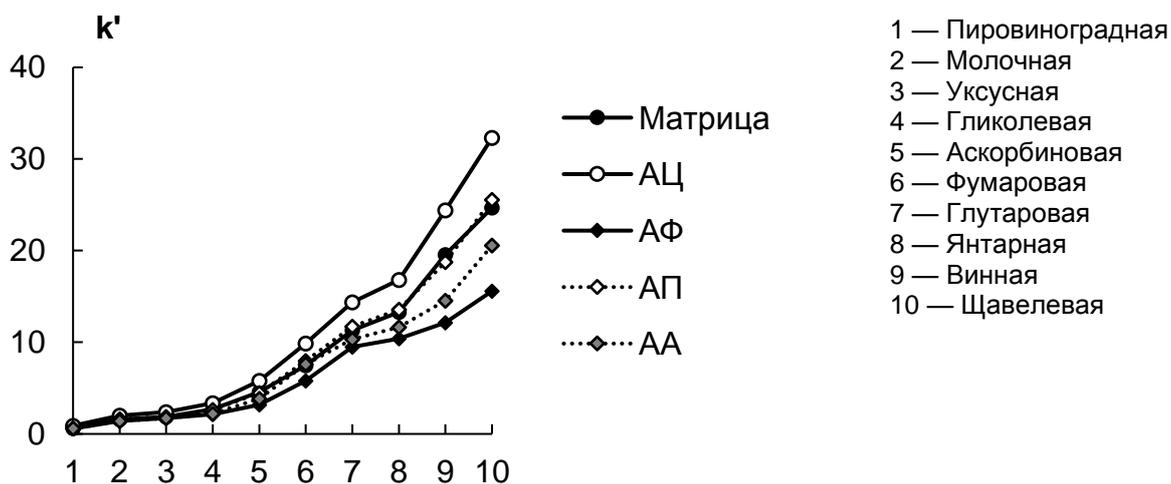


Рис. 40. Факторы удерживания органических кислот, полученные на матрице и сорбентах АЦ, АФ, АП и АА в условиях, указанных в табл. 9.

**Ионообменная селективность.** Согласно тесту Танака катионообменная селективность  $\alpha(\text{СХ})$  значительно отличается от нуля только для сорбента АЦ, полученного с использованием ацетона, однако малая величина  $\alpha(\text{СХ})=0.9$  не отмечает наличие катионообменной селективности [116]. Наблюдали высокую анионообменную селективность для сорбентов с 2-ацетилпирролом (АП) и ацетальдегидом (АА) по сравнению с матрицей и сорбентом с ацетоном М (АЦ), и как следствие увеличение факторов удерживания на данных фазах аскорбиновой и никотиновой кислот (Приложение 3).

На сорбентах АП и АА за счет высокой анионообменной селективности происходит отталкивание положительно заряженного тиамин, вследствие чего время удерживания для него снижается, а селективность относительно рибофлавина — увеличивается (рис. 41). Стоит отметить, что произошло улучшение разрешения пары витаминов В<sub>1</sub>/В<sub>2</sub> на всех модифицированных сорбентах по сравнению с матрицей и с серией сорбентов, полученных с использованием ацетона, при этом наилучшее разделение наблюдали для сорбентов АП и АА (рис. 41). Таким образом, замена карбонильного компонента в реакции Уги позволила обеспечить полное разрешение данной пары. Сорбент АП также показал самую высокую эффективность — до 60000 тт/м.

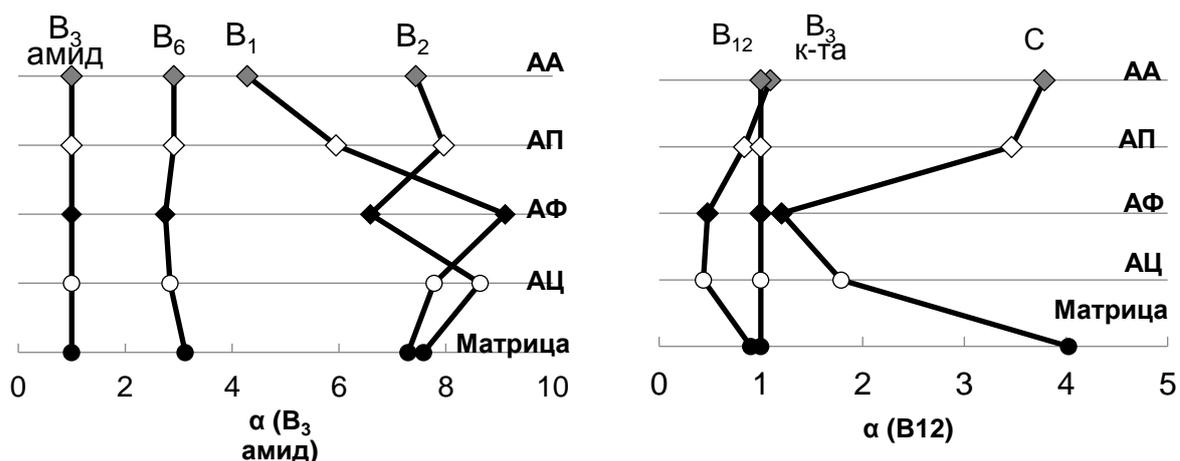


Рис. 41. Шкалы селективности для слабоудерживаемых витаминов относительно B<sub>3</sub> амида (слева). Шкалы селективности для сильноудерживаемых витаминов относительно B<sub>12</sub> (справа). Получены для матрицы и сорбентов АЦ, АФ, АП и АА в условиях, указанных в табл. 9.

Таким образом, показано, что наиболее перспективным является использование 2-ацетилпиррола в качестве карбонильного соединения в реакции Уги, что приводит к значительному увеличению эффективности колонок по всем классам модельных аналитов не только по сравнению с матрицей, но и по сравнению с другими сорбентами, модифицированными по реакции Уги. Также сорбент АП обладает высокой гидрофильностью и анионообменной селективностью согласно тесту Танака, вследствие чего демонстрирует высокую селективность разделения полярных веществ.

## 4.5. Влияние природы кислотного соединения

### 4.5.1. Использование бифункциональных аминокислот

В данной серии было синтезировано 2 сорбента по реакции Уги при использовании ацетона, 2-морфолиноэтилизоцианида и двух аминокислот — серина и аспарагина, соответственно, — в качестве четвертого компонента реакции. Сравнение полученных сорбентов проводили с матрицей, а также с сорбентом АЦ, полученном при использовании гликолевой кислоты и того же карбонильного соединения и изоцианида.

**Гидрофильность.** Несмотря на отрицательные параметры гидрофобности структурных фрагментов с аминокислотами (табл. 17), увеличения гидрофильности не наблюдали. Для тех классов соединений, на которые в значительной степени влияет гидрофильность — аминокислот, азотистых оснований и нуклеозидов, замена гликолевой кислоты на аминокислоту на стадии синтеза не привела к значительным изменениям. Эффективность и селективность разделения были сопоставимы.

Таблица 17. Данные теста Танака для сорбентов с аминокислотами

Сорбент	Матрица С <sub>A</sub>	АЦ	СЕР	АСП
log P (Уги)	0.34	-0.71	-1.27	-2.80
k(U)	4.0	4.0	3.0	3.2
$\alpha$ (АХ)	14.3	6.1	15.9	15.5
$\alpha$ (СХ)	0	0.9	0	0
$\alpha$ (СН <sub>2</sub> )	1.5	1.4	1.3	1.3
$\alpha$ (ОН)	2.1	2.3	1.8	1.9
$\alpha$ (V/A)	1.4	1.4	1.4	1.4
$\alpha$ (Тb/Тр)	0.7	0.9	0.8	0.8

Такой подход также незначительно повлиял на разделение органических кислот. Однако сорбенты СЕР и АСП с аминокислотами продемонстрировали улучшение разрешения пары кислот молочная/уксусная по сравнению с матрицей и сорбентом АЦ (рис. 42): разрешение составило 1.3 и 1.2 для сорбентов СЕР, АСП соответственно, тогда как на матрице и сорбенте АЦ оно составляло менее 1.0.

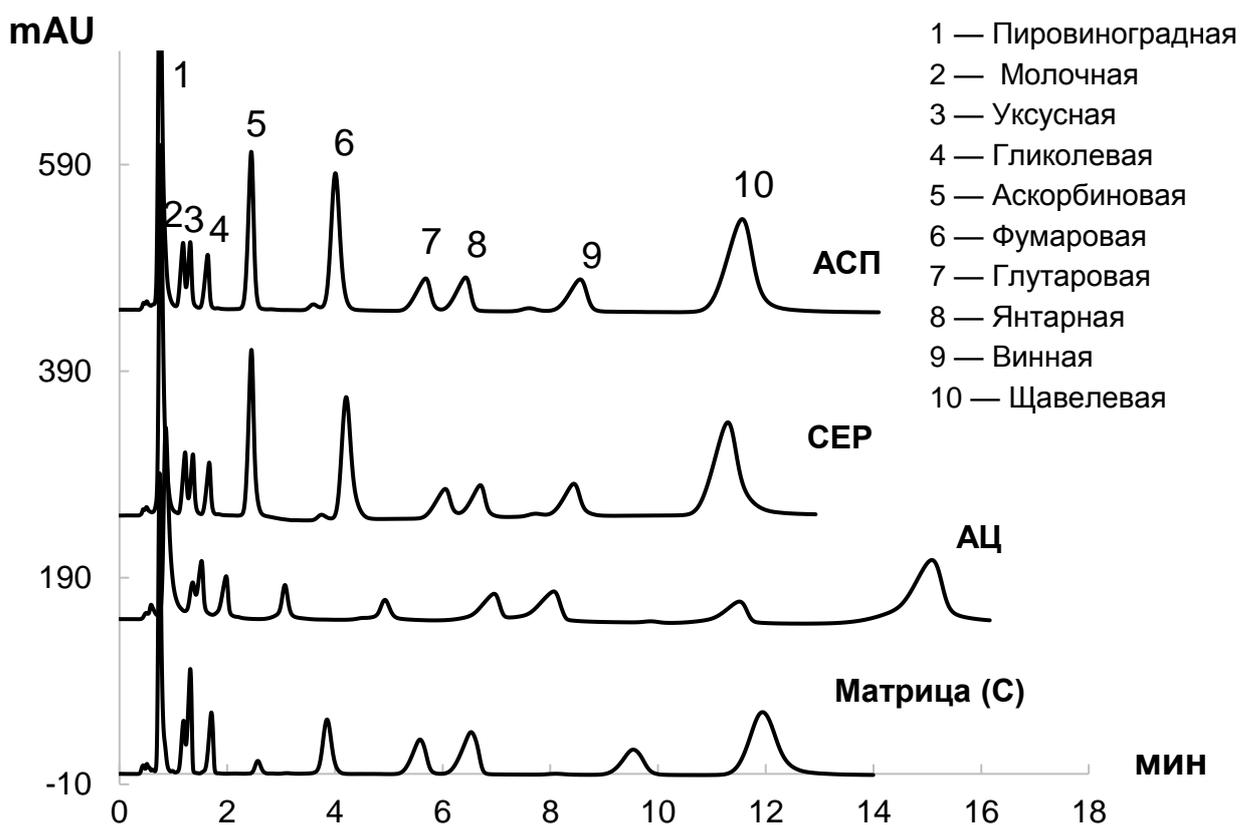


Рис. 42. Хроматограммы смеси органических кислот, полученные на матрице и сорбентах АЦ, СЕР и АСП в условиях, указанных в табл. 9.

В свою очередь введение аминокислоты в слой сорбентов позволило улучшить разделение углеводов. Фазы с фрагментами аминокислот показали лучшие формы пиков углеводов и увеличение эффективности по данным веществам. При этом удалось сократить время разделения без потерь в селективности (рис. 43). Селективность по паре мальтоза/лактоза на сорбенте СЕР с серином в слое больше, чем на АСП с аспарагином.

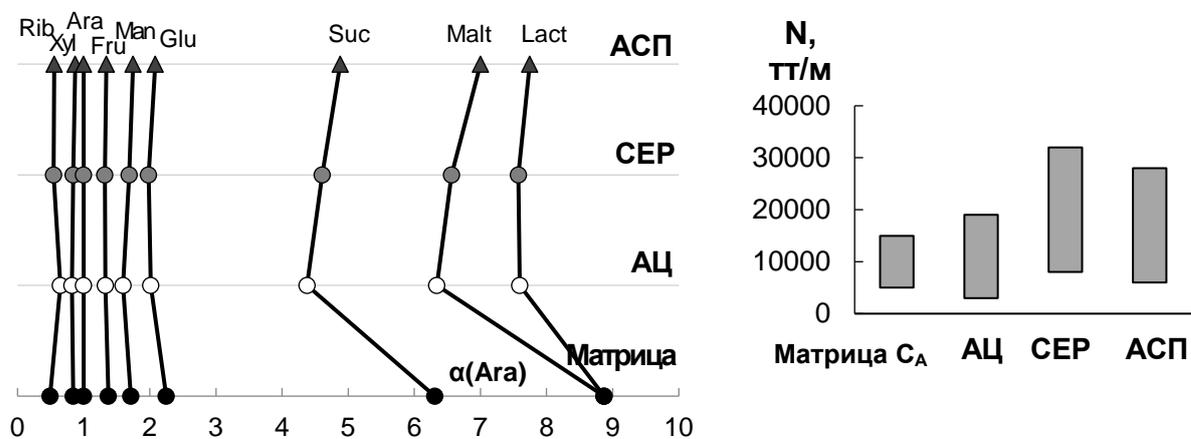


Рис. 43. Шкалы селективности для углеводов. Фактор селективности — арабиноза (слева). Эффективность сорбентов по углеводам (справа). Получены для матрицы и сорбентов АЦ, СЕР и АСП в условиях, указанных в табл. 9.

**Ионообменная селективность.** Доказательством успешного введения структурных фрагментов аминокислот в функциональный слой может служить увеличение анионообменной селективности по сравнению с матрицей и сорбентом АЦ, что может быть вызвано дополнительными аминогруппами, входящими в состав серина и аспарагина. Увеличение  $\alpha$  (АХ) привело к улучшению селективности на фазах АСП и СЕР по паре слабоудерживаемых  $V_1/V_2$ , для сильноудерживаемых — улучшение селективности по паре  $V_{12}/C$  (рис. 44). Так, по сравнению с использованием карбоновой кислоты, аминокислоты в составе фрагмента, сформированного по реакции Уги, приводят к лучшей селективности разделения витаминов.

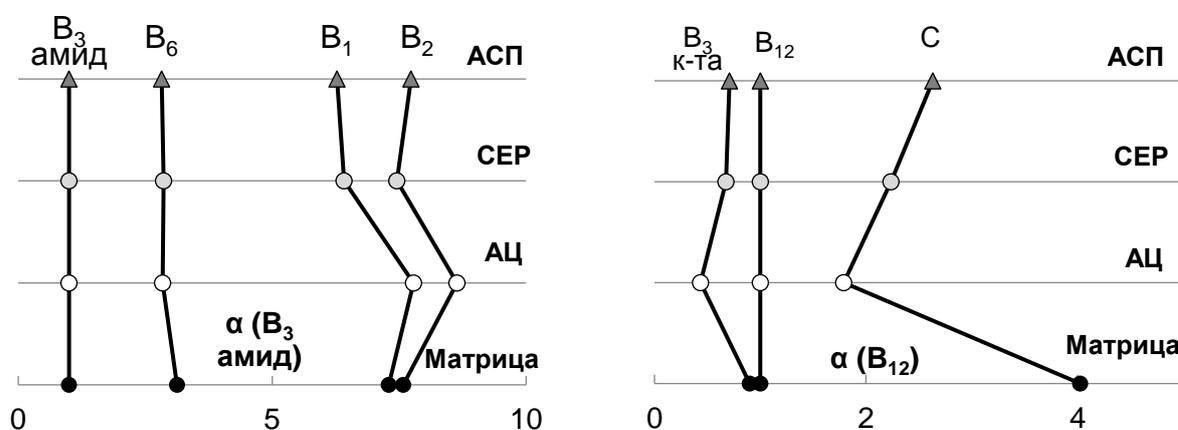


Рис. 44. Шкалы селективности для слабоудерживаемых витаминов относительно  $V_3$  амида (слева). Шкалы селективности для сильноудерживаемых витаминов относительно  $V_{12}$  (справа). Получены для матрицы и сорбентов АЦ, СЕР и АСП в условиях, указанных в табл. 9.

\*\*\*

Подводя итог, можно сделать вывод о том, что замена органической кислоты на аминокислоту для синтеза сорбентов по реакции Уги может быть целесообразной только для нескольких классов аналитов (углеводы, витамины). Стоит отметить, что такой подход может быть полезным для контролируемого сохранения или увеличения анионообменной селективности, например, для полимерных сорбентов, что может быть использовано в ионной хроматографии.

## 4.5.2. Использование полимерных кислот

Как было отмечено в обзоре литературы, значительным преимуществом сорбентов с полимерными функциональными слоями, является их высокая гидролитическая стабильность. Применительно к методу ГИХ полимерный функциональный слой также обладает рядом достоинств, среди которых эффективное экранирование матрицы, гидрофилизация поверхности и возможности управления селективностью благодаря широкому разнообразию полимерных соединений.

Для введения полимера в функциональный слой фаз впервые использовали подход, заключающийся в применении многокомпонентой клик-реакции Уги, один из компонентов которой представлял собой полимерное соединение, в данном случае — поликислоту. В данной серии фаз оценивали влияние полимерного слоя и различных факторов, таких как: способ закрепления функционального слоя, количество карбоксильных групп, содержание амидных групп, молекулярная масса полимера, соотношение матрица:полимер по массе, — на характеристики разделения модельных веществ. В качестве карбонильного компонента для всей серии фаз использовали наименее стерически затрудненный ацетальдегид, в качестве четвертого компонента реакции — 2-морфолиноэтилизотиоцианид. Показано (табл. 6) существенное увеличение содержания углерода по сравнению с матрицей согласно данным элементного анализа, а следовательно, успешное закрепление полимеров предложенным способом. В данном разделе для каждого фактора будут подчеркнуты основные изменения, которые он вызывает.

### 4.5.2.1. Влияние поликислоты

Изначально использовали полимолочную кислоту для создания полимерного функционального слоя по реакции Уги (табл. 5). Сравнение синтезированного сорбента ПМ 1:0.01 проводили с матрицей С<sub>А</sub> и с сорбентом АА, с мономерным функциональным слоем и различающимся с таковым лишь структурным фрагментом кислотного соединения. Массу полимера на стадии синтеза взяли в 100 раз меньше по сравнению с массой аминопропилсиликагеля (сорбент ПМ 1:0.01), что связано с низкой растворимости полимолочной кислоты в среде проведения реакции Уги. Для растворения полимера использовали смесь

дихлорметана и этанола (1:1) в отличие от традиционного проведения реакции в этаноле или водно-этанольной смеси.

Несмотря на низкое значение коэффициента гидрофобности для структурного фрагмента, получаемого по реакции Уги с использованием полимолочной кислоты, сорбент ПМ 1:0.1 продемонстрировал уменьшение гидрофильности согласно по сравнению с матрицей и сорбентом АА, при этом наблюдали значительное увеличение анионообменной селективности (табл. 18).

Таблица 18. Данные теста Танака матрицы и сорбентов АА и ПМ 1:0.01

Сорбент	$\log P$ (Уги)	k(U)	$\alpha$ (AX)	$\alpha$ (CX)	$\alpha$ (CH <sub>2</sub> )	$\alpha$ (OH)	$\alpha$ (V/A)	$\alpha$ (Tb/Tr)
Матрица С <sub>A</sub>	0.34	4.0	14.3	0	1.5	2.1	1.4	0.7
АА	-0.69	3.0	24.7	0	1.4	1.9	1.4	0.6
ПМ 1:0.01	-1.36	2.2	51.8	0	1.3	1.9	1.5	0.3

Факторы удерживания углеводов на таком сорбенте существенно меньше по сравнению с матрицей, что говорит об ее успешном модифицировании, и также значительно ниже по сравнению с сорбентом АА с мономерным слоем, что может свидетельствовать о бóльшей степени экранирования матрицы полимером (рис. 45). Результаты элементного анализа также подтверждают модифицирование матрицы: происходит увеличение доли углерода от 6.52 % для матрицы до 10.33% для сорбента ПМ 1:0.01. В целом сорбент с полимолочной кислотой продемонстрировал ухудшение селективности разделения углеводов по сравнению с фазой АА, однако селективность для пары мальтоза-лактоза на таком сорбенте лучше, чем на матрице.

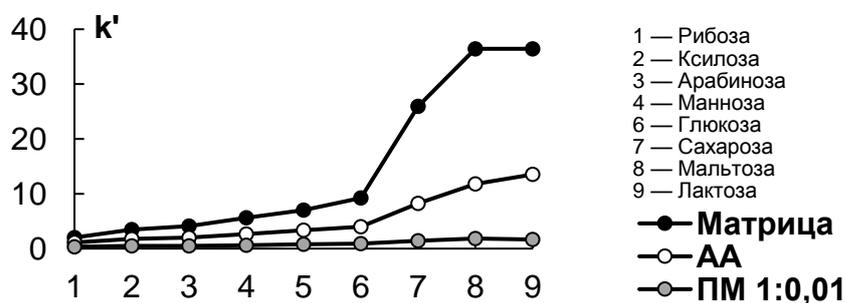


Рис. 45. Факторы удерживания углеводов, полученные на матрице и сорбентах АА и ПМ 1:0.01 в условиях, указанных в табл. 9.

В отличие от факторов удерживания углеводов факторы удерживания азотистых оснований, нуклеозидов, витаминов и аминокислот на фазе с полимером в слое не уменьшались по сравнению с фазой АА с мономерным фрагментом. Не

наблюдали также снижения факторов удерживания органических кислот на фазе ПМ 1:0.01, однако, показано сильное ухудшение селективности: внутри одно- и двухзарядных кислот разделение практически не происходило (рис. 46). Такая тенденция была характерна для всех фаз с полимерными кислотами в функциональном слое.

Сорбент с полимолочной кислотой продемонстрировал уменьшение эффективности по отношению практически ко всем модельным анализам: углеводам, азотистым основаниям и нуклеозидам, витаминам, органическим кислотам, что вероятно вызвано конформационной подвижностью длинных полимерных цепей и ограничениями массопереноса. Этот эффект характерен для большинства фаз с полимерами в функциональном слое [89, 90].

Таким образом, при создании полимерного функционального слоя с помощью полимолочной кислоты, несмотря на достаточную гидрофильность ( $kU = 2.2$ ) фазы происходит значительное уменьшение факторов удерживания углеводов по сравнению с матрицей и фазами, содержащими мономерные фрагменты, и может свидетельствовать о лучшем экранировании матрицы полимерным слоем. Однако использование полимолочной кислоты в реакции Уги неблагоприятно повлияло на хроматографические характеристики разделения модельных анализов и требовало дальнейших шагов по гидрофилизации поверхности.

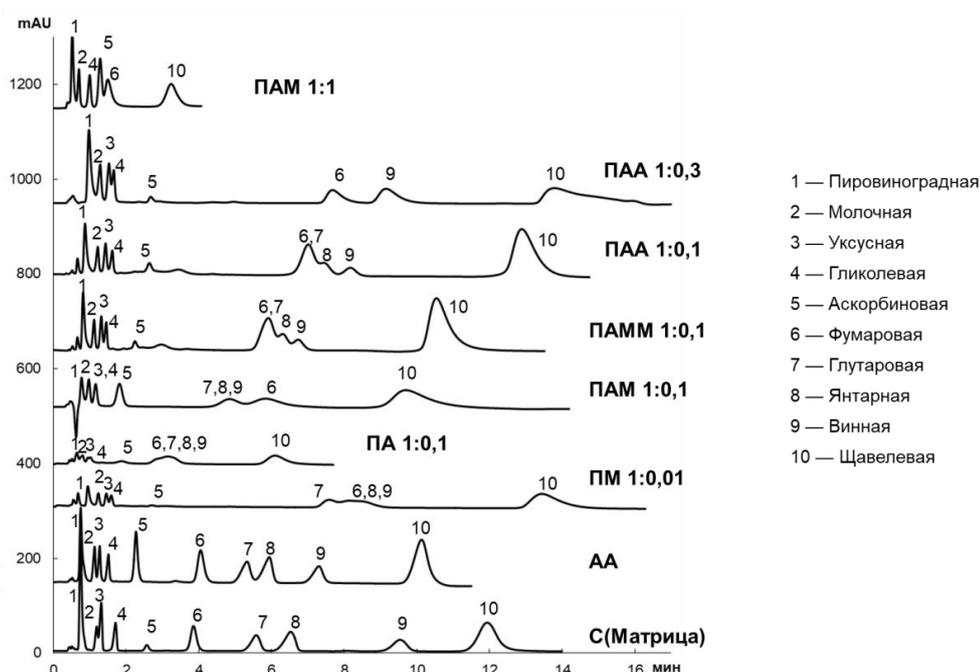


Рис. 46. Хроматограммы смеси органических кислот, полученные на матрице и сорбентах с полимерами в функциональном слое в условиях, указанных в табл. 9.

#### 4.5.2.2. Изменение способа закрепления функционального слоя

Сначала изменили способ закрепления полимерного слоя за счет замены полимолочной кислоты на полиакриловую, содержащую реакцию способную карбоксильную группу в каждом звене (рис. 47). В таком случае полимер может закрепляться не в виде длинных цепей, а в виде обволакивающей частицу структуры, многократно закрепленной с помощью структурного фрагмента, полученного по реакции Уги.

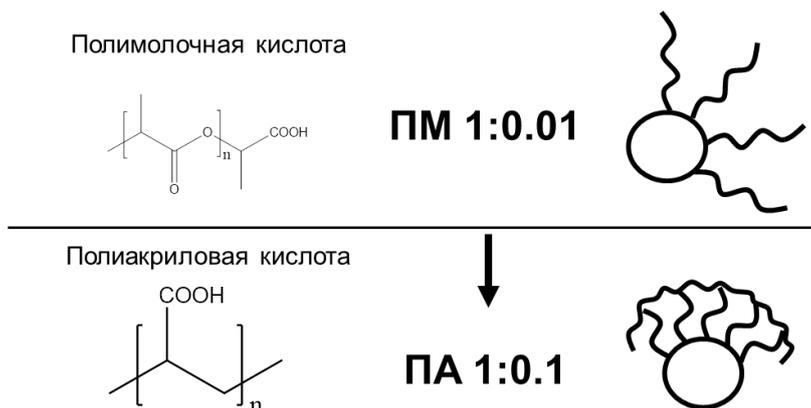


Рис. 47. Изменение способа закрепления функционального слоя

Изменение способа закрепления слоя согласно тесту Танака привело к уменьшению гидрофильности, что согласуется с параметрами гидрофобности, формируемых по реакции Уги структурных фрагментов, а также к уменьшению анионообменной селективности (табл. 19). Последнее может быть объяснено тем, что для сорбента с полимолочной кислотой ПМ с большим значением  $\alpha(\text{AX}) = 51.8$  ввиду стерических затруднений может быть осложнено протекание заключительной стадии реакции Уги — перегруппировки Мумма: трансформации вторичного амина в амид (рис. 48). В то время как анионообменная селективность  $\alpha(\text{AX}) = 16.8$  для ПА 1:0.1 с полиакриловой кислотой не указывает на увеличение количества анионообменных вторичных аминогрупп в слое, что вероятно связано с традиционным осуществлением перегруппировки Мумма.

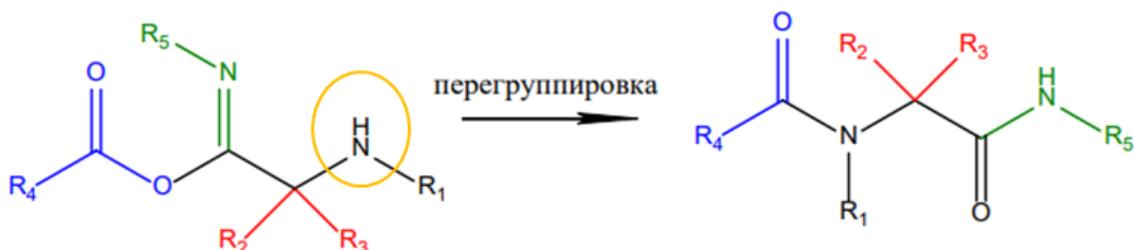


Рис. 48.Схема перегруппировки Мумма.

Таблица 19. Данные теста Танака для сорбентов ПМ 1:0.01 и ПА 1:0.1

Сорбент	log P (Уги)	k(U)	$\alpha$ (AX)	$\alpha$ (CX)	$\alpha$ (CH <sub>2</sub> )	$\alpha$ (OH)	$\alpha$ (V/A)	$\alpha$ (Tb/Tr)
ПМ 1:0.01	-1.36	2.2	51.8	0	1.3	1.9	1.5	0.3
ПА 1:0.1	0.17	2.0	16.8	0	1.3	2.0	1.5	0.5

Ввиду близкой гидрофильности двух сравниваемых сорбентов, наблюдали схожие хроматографические характеристики аналитов, удерживаемых по распределительному или адсорбционному механизмам. Изменение способа закрепления функционального слоя существенно влияет лишь на те модельные аналиты, преобладающий вклад в удерживание которых вносят электростатические взаимодействия, например, на сорбенте ПА 1:0.1 происходит уменьшение факторов удерживания ксантина, никотиновой и аскорбиновой кислот, что согласуется с уменьшением анионообменной селективности данной фазы.

Последнее подтверждает изучение удерживания гербицидов и фосфоновых кислот, находящихся в заряженном состоянии в выбранных хроматографических условиях. Факторы удерживания гербицидов и фосфоновых кислот на сорбенте ПА 1:0.1 существенно уменьшаются, что можно объяснить уменьшением  $\alpha$  (AX) (рис. 49). Этот факт также согласуется со значительным вкладом электростатических взаимодействий в удерживание данных аналитов.

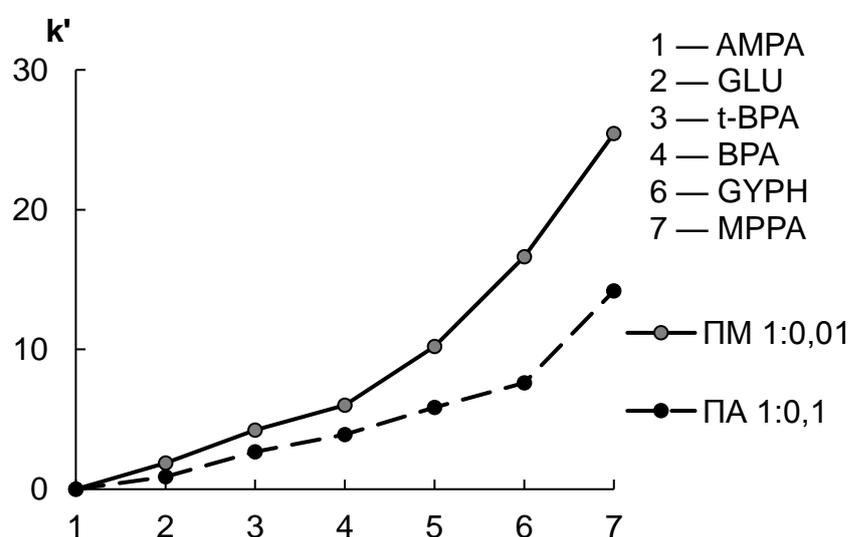


Рис. 49. Факторы удерживания пестицидов и фосфоновых кислот, полученные на матрице и сорбентах ПМ 1:0.01 и ПА 1:0.1 в условиях, указанных в табл. 9.

#### 4.5.2.3. Сравнение выхода реакции при использовании полиакриловой кислоты и сополимера акриловой кислоты и акрилата натрия

На следующем этапе работы оценивали количество привитого слоя в случае использования акриловой кислоты и ее сополимера с натриевой солью, соответственно. В таком случае ввиду получения близких структурных фрагментов по реакции Уги, вероятно, можно оценить выход реакции и степень модифицирования полимером. рН водно-органической смеси полимерной кислоты до реакции составил 3.82, а сополимера с солью – 4.50.

Таблица 20. Данные теста Танака для сорбентов ПА 1:0.1 и ПА-с 1:0.1

Сорбент	k(U)	$\alpha(AX)$	$\alpha(CX)$	$\alpha(CH_2)$	$\alpha(OH)$	$\alpha(V/A)$	$\alpha(Tb/Tr)$
ПА 1:0.1	2.0	16.8	0	1.3	2.0	1.5	0.5
ПА-с 1:0.1	2.6	25.8	0	1.4	2.0	1.5	0.4

Существенное увеличение факторов удерживания углеводов (рис. 50) на сорбенте ПА-с 1:0,1 по сравнению с ПА 1:0,1 может свидетельствовать о меньшем выходе реакции при использовании сополимера, а, следовательно, о менее эффективном экранировании матрицы. Сорбент ПА-с 1:0.1 по сравнению с ПА 1:0.1 продемонстрировал большее удерживание других рассматриваемых полярных соединений (сильноудерживаемых витаминов, органических кислот), схожее удерживание азотистых оснований и нуклеозидов и слабоудерживаемых витаминов, что согласуется с гидрофильностью сравниваемых фаз согласно тесту Танака (табл. 20). Наблюдали уменьшение эффективности по органическим кислотам и аминокислотам, а также по витаминам на фазе, для получения которой на стадии синтеза использовали сополимер.

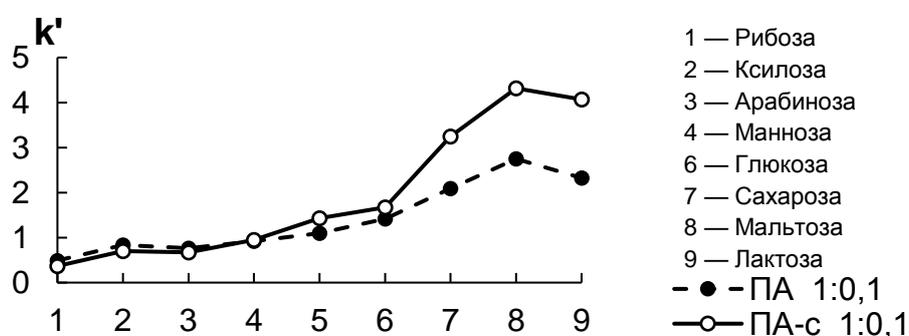


Рис. 50. Факторы удерживания углеводов, полученные на сорбентах ПА 1:0.1 и ПА-с 1:0.1 в условиях, указанных в табл.9.

Таким образом, показано, что для создания полимерных функциональных слоев по реакции Уги перспективнее применять непосредственно полимерные кислоты, а не их сополимеры с солями с целью увеличения степени модифицирования матрицы.

#### 4.5.2.4. Увеличение числа карбоксильных групп

Дальнейшим этапом многоступенчатой гидрофилизации функционального слоя стало увеличение числа карбоксильных групп в его структуре. Для этого на стадии синтеза заменили полиакриловую кислоту на сополимер акриловой и малеиновой кислот (рис. 51).

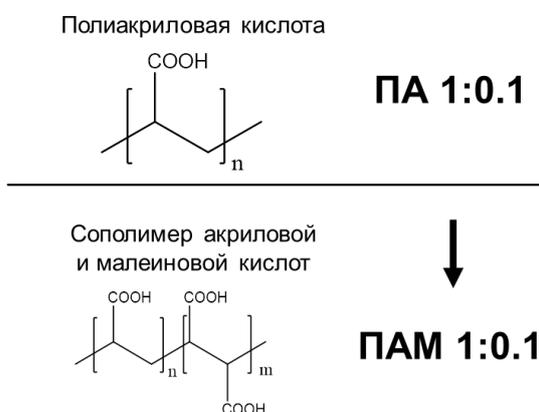


Рис. 51. Увеличение числа карбоксильных групп

Использование сополимера, обеспечивающего образование более полярного структурного фрагмента, действительно привело к получению сорбента с бóльшей гидрофильностью  $kU = 3.1$ . Ожидается, для сорбента ПАМ 1:0.1 наблюдали уменьшение анионообменной селективности, так как, вероятно, в таком случае остается больше карбоксильных групп, не принимающих непосредственного участия в самой реакции. Такие результаты получены даже несмотря на по-видимому меньшую степень модифицирования в случае ПАМ согласно данным элементного анализа (табл. 6) и удельной поверхности ( $172 \text{ м}^2/\text{г}$  для ПА 1:0.1 и  $185 \text{ м}^2/\text{г}$  для ПАМ 1:0.1;  $200 \text{ м}^2/\text{г}$  – для аминопропилсиликагеля  $S_A$ ).

Таблица 21. Данные теста Танака для сорбентов ПА 1:0.1 и ПАМ 1:0.1

Сорбент	$\log P$ (Уги)	$k(U)$	$\alpha(AX)$	$\alpha(CX)$	$\alpha(CH_2)$	$\alpha(OH)$	$\alpha(V/A)$	$\alpha(Tb/Tr)$
ПА 1:0.1	0.17	2.0	16.8	0	1.3	2.0	1.5	0.5
ПАМ 1:0.1	-2.20	3.1	10.2	0.2	1.3	2.1	1.5	0.5

Повышение гидрофильности функционального слоя привело к увеличению факторов удерживания практически для всех тестовых веществ: углеводов, азотистых оснований и нуклеозидов, аминокислот и органических кислот. Сорбент ПАМ 1:0.1 показал улучшение селективности разделения углеводов, сильноудерживаемых витаминов, азотистых оснований и нуклеозидов. Наблюдали улучшение разрешения для слабоудерживаемых азотистых оснований и нуклеозидов, а также для пары ксантин/гуанин (рис. 52). Введение дополнительных карбоксильных групп в структуру сорбента привело к увеличению эффективности (Приложение 3) для следующих классов соединений: углеводов, азотистых оснований и нуклеозидов.

Таким образом, гидрофилизация функционального слоя успешно реализуется благодаря введению дополнительных карбоксильных групп с помощью сополимера акриловой и малеиновой кислот. Дальнейшим шагом увеличения гидрофильности может стать либо включение амидных групп в слой либо увеличение количества привитого полимера благодаря увеличению соотношения матрица:полимер по массе, что будет рассмотрено в следующих разделах.

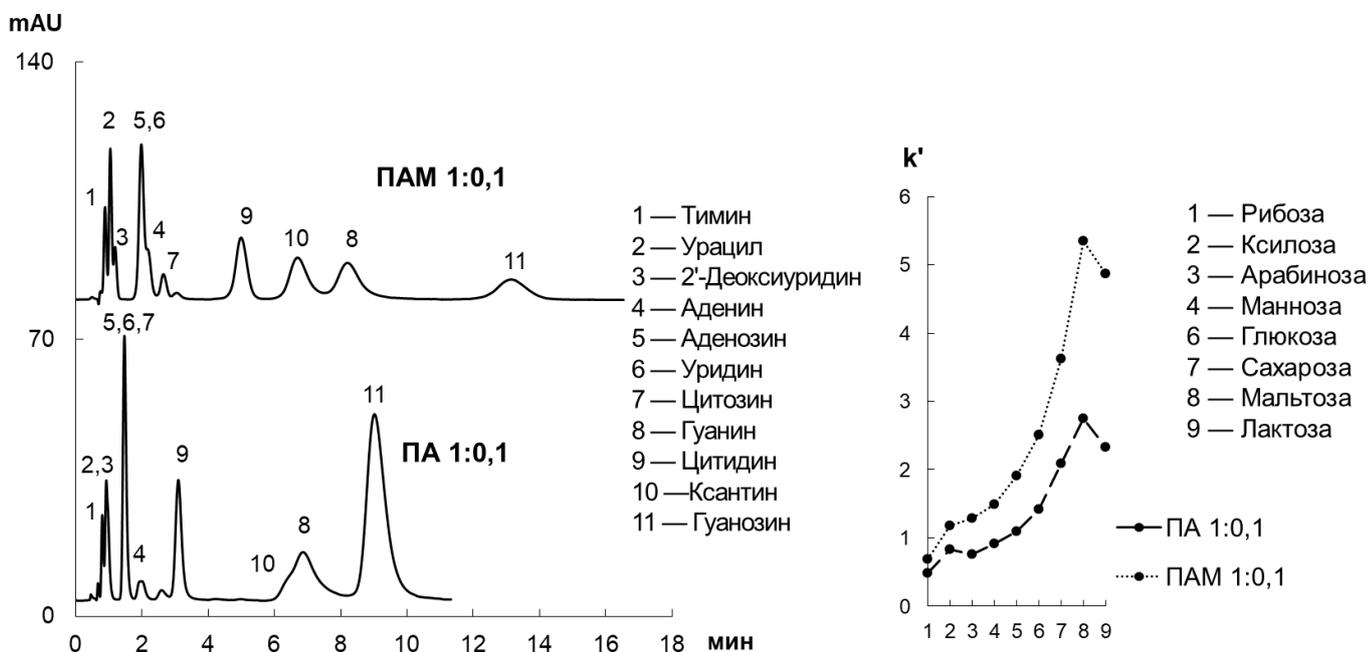


Рис. 52. Хроматограммы (слева) смеси азотистых оснований и нуклеозидов, полученные на сорбентах ПА 1:0.1 и ПАМ 1:0.1 в условиях, указанных в табл. 9. Факторы удерживания углеводов (справа), полученные на сорбентах ПА 1:0.1 и ПАМ 1:0.1 в условиях, указанных в табл. 9.

#### 4.5.2.5. Увеличение молекулярной массы полимерной кислоты

Помимо гидрофиллизации поверхности, также важно увеличить эффективность получаемых фаз с полимерным слоем, обычно характеризующихся невысокой эффективностью. Для этой цели было решено увеличить молекулярную массу сополимера акриловой и малеиновой кислот (70000 г/моль). Результаты теста Танака (табл. 22) свидетельствуют об уменьшении гидрофильности и увеличении анионообменной селективности. Последнее может быть связано с затруднительным протеканием финальной стадии реакции модифицирования — трансформации вторичного амина в амид — для полимера с большой массой.

Таблица 22. Данные теста Танака для сорбентов ПАМ 1:0.1 и ПАММ 1:0.1

Сорбент	k(U)	$\alpha(\text{AX})$	$\alpha(\text{CX})$	$\alpha(\text{CH}_2)$	$\alpha(\text{OH})$	$\alpha(\text{V/A})$	$\alpha(\text{Tb/Tr})$
ПАМ 1:0.1	3.1	10.2	0.2	1.3	2.1	1.5	0.5
ПАММ 1:0.1	2.4	26.9	0	1.3	1.9	1.4	0.4

Увеличение массы звена сополимера с 2000 до 70000 г/моль привело к повышению эффективности колонки ПАММ 1:0.1 по всем классам модельных аналитов, по-видимому, за счет облегчения массопереноса в более равномерно закрепленном функциональном слое, сформированном при использовании длинного линейного полимера (рис. 53).

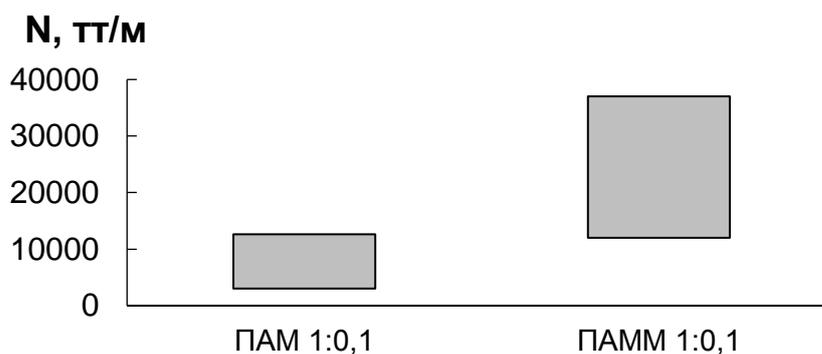


Рис. 53. Эффективность колонок по органическим кислотам. Получено для ПАМ 1:0.1 и ПАММ 1:0.1 в условиях, указанных в табл. 9.

Несмотря на небольшое уменьшение фактора удерживания уридина ( $k_U = 2.4$ ) фаза ПАММ 1:0.1 показала улучшение селективности разделения следующих веществ: углеводов и витаминов. Для органических кислот практически не отмечено изменение факторов удерживания, при этом за счет

высокой эффективности наблюдали лучшую разделяющую способность внутри групп одно- и двухзарядных аналитов. Хроматограммы разделения органических кислот представлены рис. 46. Таким образом, применение полимерных соединений с большими молекулярными массами на стадии синтеза по Уги является перспективным, поскольку приводит к получению сорбентов с высокой эффективностью.

#### 4.5.2.6. Включение амидных групп в функциональный слой сорбентов

Следующим этапом стало введение амидных групп в функциональный слой фаз. Для этого на стадии синтеза (рис. 54) вместо сополимера акриловой и малеиновой кислот (сорбент ПАММ 1:0.1) использовали сополимер неполной натриевой соли акриловой кислоты и акриламида также с большой молекулярной массой (150000 г/моль). Согласно тесту Танака (табл. 23) наблюдали увеличение гидрофильности по тесту Танака для сорбента с амидными группами ПАА 1:0.1.

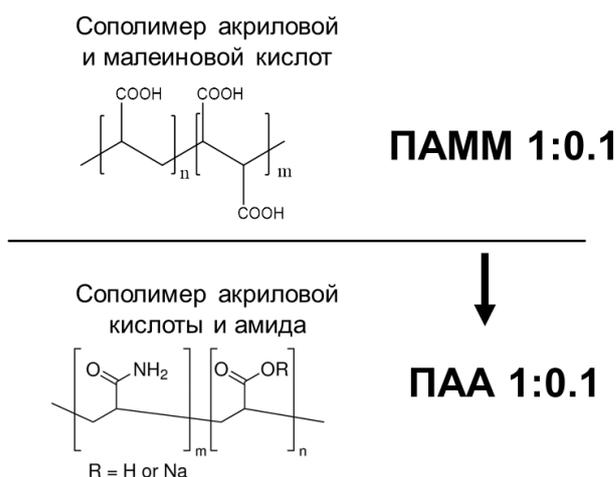


Рис. 54. Включение амидных групп

Таблица 23. Данные теста Танака для сорбентов ПАММ 1:0.1 и ПАА 1:0.1

Сорбент	log P (Уги)	k(U)	$\alpha$ (AX)	$\alpha$ (CX)	$\alpha$ (CH <sub>2</sub> )	$\alpha$ (OH)	$\alpha$ (V/A)	$\alpha$ (Tb/Tr)
<b>ПАММ 1:0.1</b>	-2.20	2.4	26.9	0	1.3	1.9	1.4	0.4
<b>ПАА 1:0.1</b>	-3.04	3.0	28.7	0	1.4	1.9	1.4	0.4

В свою очередь, увеличение гидрофильности сорбента ПАА 1:0.1 привело к увеличению факторов удерживания модельных аналитов: углеводов, аминокислот и органических кислот, близкие факторы удерживания продемонстрировали азотистые основания и нуклеозиды и витамины. Включение дополнительных амидных групп в функциональный слой сорбента позволило увеличить селективность по углеводам, витаминам и аминокислотам. Отдельно можно

подчеркнуть значительное увеличение факторов удерживания углеводов и селективности их разделения, хотя до этого сорбенты с полимерным слоем, полученным по реакции Уги, демонстрировали относительно низкую селективность по данным веществам. При этом удалось сохранить высокую эффективность благодаря использованию полимера с большой молекулярной массой, для витаминов и аминокислот отмечено ее увеличение по сравнению с фазой ПАММ 1:0.1. Также наблюдали увеличение селективности для пары водорастворимых витаминов В<sub>1</sub>/В<sub>6</sub> (Рис. 55).

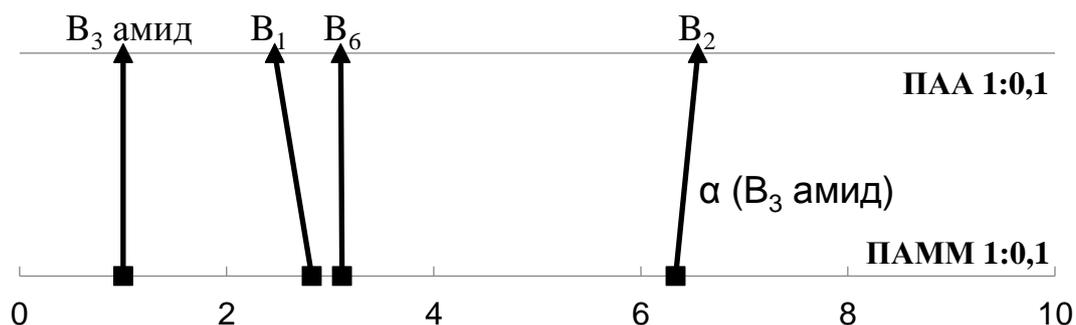


Рис. 55. Шкалы селективности для слабоудерживаемых витаминов. Фактор селективности — В<sub>3</sub> амид. Получены для сорбентов ПАММ 1:0.1 и ПАА 1:0.1 в условиях, указанных в табл. 9.

Как показано ранее, для увеличения выхода реакции модифицирования необходимо применять полные полимерные кислоты, а не их сополимеры с солями. Также необходимо отметить, что на стадии синтеза использовали коммерчески доступный сополимер неполной натриевой соли акриловой кислоты и амида, что вероятно оказало влияние на степень модифицирования матрицы.

Таким образом, показано улучшение разделяющей способности сорбентов при такой гидрофилизации благодаря увеличению селективности по полярным веществам и эффективности при использовании линейного полимера с большой молекулярной массой.

#### 4.5.2.7. Увеличение соотношения матрица:полимер по массе

Влияние соотношения матрица:полимер по массе рассмотрено на двух парах сорбентов, полученных при использовании сополимера акриловой и малеиновой кислот (фазы ПАМ), а также сополимера акриловой кислоты и ее амида (фазы ПАА). Для первой пары сорбентов ввиду большой растворимости сополимера акриловой и малеиновой кислот в этаноле на стадии синтеза удалось увеличить массу полимера в 10 раз по сравнению с исходной, для второй пары сорбентов —

только в 3 раза ввиду низкой растворимости сополимера акриловой кислоты и ее амида.

Таблица 24. Данные теста Танака для сорбентов ПАМ 1:0,1 и ПАМ 1:1, ПАА 1:0.1 и ПАА 1:0.3.

Сорбент	k(U)	$\alpha$ (AX)	$\alpha$ (CX)	$\alpha$ (CH <sub>2</sub> )	$\alpha$ (OH)	$\alpha$ (V/A)	$\alpha$ (Tb/Tr)
<b>ПАМ 1:0.1</b>	3.1	10.2	0.2	1.3	2.1	1.4	0.5
<b>ПАМ 1:1</b>	3.6	0.7	3.1	1.5	2.6	1.4	0.9
<b>ПАА 1:0.1</b>	3.0	28.7	0	1.4	1.9	1.4	0.4
<b>ПАА 1:0.3</b>	2.7	34.8	0	1.4	2.0	1.5	0.4

Показано увеличение гидрофильности (табл. 24) при увеличении соотношения матрица:полимер для первой пары сорбентов ПАМ, что согласуется с результатами элементного анализа: значительное увеличение доли углерода от 11.11 % для ПАМ 1:0.1 до 13.27 % для сорбента ПАМ 1:1 и свидетельствует об увеличении количества привитого полимера. При увеличении соотношения матрица: полимер по массе при использовании первого сополимера акриловой и малеиновой кислот наблюдали без потери в гидрофильности полное подавление анионообменной селективности и появление катионообменной селективности, связанное со значительным увеличением количества карбоксильных групп в случае сорбента ПАМ 1:1. Однако во втором случае для фаз ПАА увеличение доли углерода не было столь существенным: от 8.83% для ПАА 1:0,1 до 9.32% для ПАА 1:0.3. Увеличение массы полимера в 3 раза для сорбентов серии ПАА не привело к возрастанию гидрофильности. Кроме того, для второй пары сорбентов в целом показаны близкие значения параметров согласно тесту Танака, что может говорить о незначительном увеличении количества привитого сополимера и, вероятно, связано с его низкой растворимостью в водно-органической среде на стадии синтеза фаз.

Показано, что увеличение соотношения матрица:полимер по массе в обоих случаях приводит к уменьшению факторов удерживания сахаров (Приложение 3) и может свидетельствовать о лучшем экранировании 3-аминопропилсиликагеля бóльшим количеством полимера. Для первой серии сорбентов ПАМ наблюдали увеличение факторов удерживания азотистых оснований, нуклеозидов и аминокислот на сорбенте ПАМ 1:1, что согласуется с увеличением его гидрофильности. Необходимо отметить, существенное уменьшение факторов

удерживания ксантина, витаминов кислотой природы и органических кислот (рис. 56), а также увеличение фактора удерживания тиамина на сорбенте ПАМ 1:1 по сравнению с ПАМ 1:0.1, что согласуется с изменением ионообменных селективностей на данных сорбентах. Однако вторая пара фаз ПАА продемонстрировала близкие значения факторов удерживания модельных веществ (рис. 56), кроме углеводов и аминокислот. Увеличение соотношения матрица:полимер по массе не оказало благоприятного влияния на эффективность по рассматриваемым модельным анализам для обеих пар неподвижных фаз, что вероятно можно объяснить образованием менее тонкого функционального слоя и затруднением массопереноса веществ.

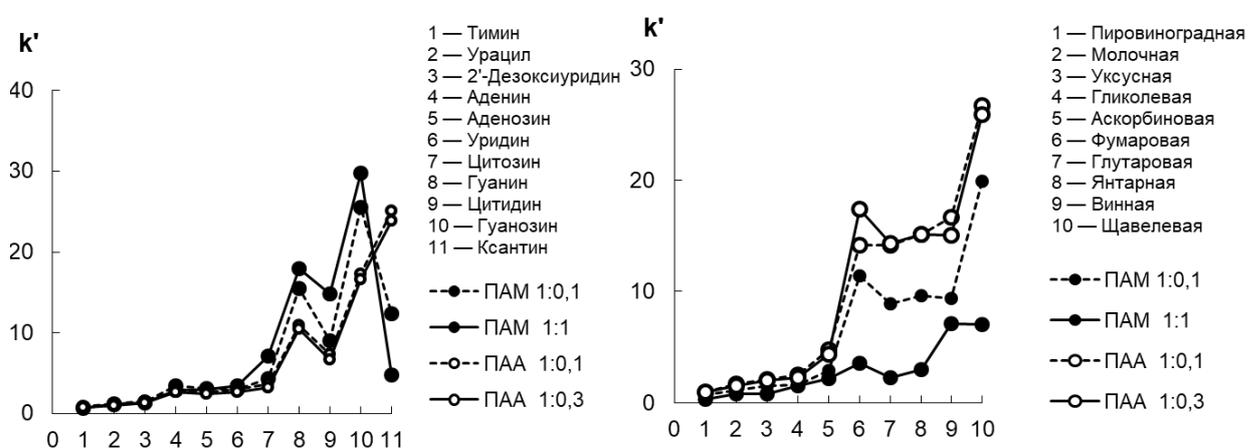


Рис. 56. Факторы удерживания азотистых оснований и нуклеозидов (слева) и органических кислот (справа), полученные на сорбентах ПАМ и ПАА в условиях, указанных в табл. 9.

Таким образом, увеличение соотношения матрица:полимер по массе в целом приводит к увеличению количества привитого полимера. Однако изменение удерживания веществ при увеличении массы полимера, используемого на стадии синтеза, существенно зависит от его природы. Так, для фазы, полученной с помощью сополимера акриловой и малеиновой кислот, увеличение данного соотношения в 10 раз приводит к существенному изменению хроматографических параметров вплоть до обращения ионообменных селективностей.

#### 4.5.2.8. Гидрофобные взаимодействия

Формирование полимерного функционального слоя с помощью поликислот по реакции Уги привело к возможности приемлемого удерживания неполярных веществ. Фазы с фрагментами полимерных кислот продемонстрировали предпосылки к разделению смеси алкилбензолов, чего не наблюдали на матрице и сорбентах с мономерным слоем (рис. 57). При этом порядок удерживания таких гидрофобных соединений соответствовал обращенно-фазовому режиму, то есть определялся гидрофобными взаимодействиями. Однако интересно отметить, что при значительном увеличении массы полимера на стадии синтеза на сорбенте ПАМ 1:1 вновь отсутствовала возможность разделения гидрофобных алкилбензолов: разделение как и на матрице становится невозможным. Этот эффект, вероятно, можно объяснить уменьшением доступности для взаимодействий с аналитами гидрофобных  $\text{CH}_2$ -фрагментов получаемых фаз при увеличении количества привитого полимера. Метиленовая селективность (1.47) на фазе ПАМ 1:1 близка к таковой (1.49) на матрице.

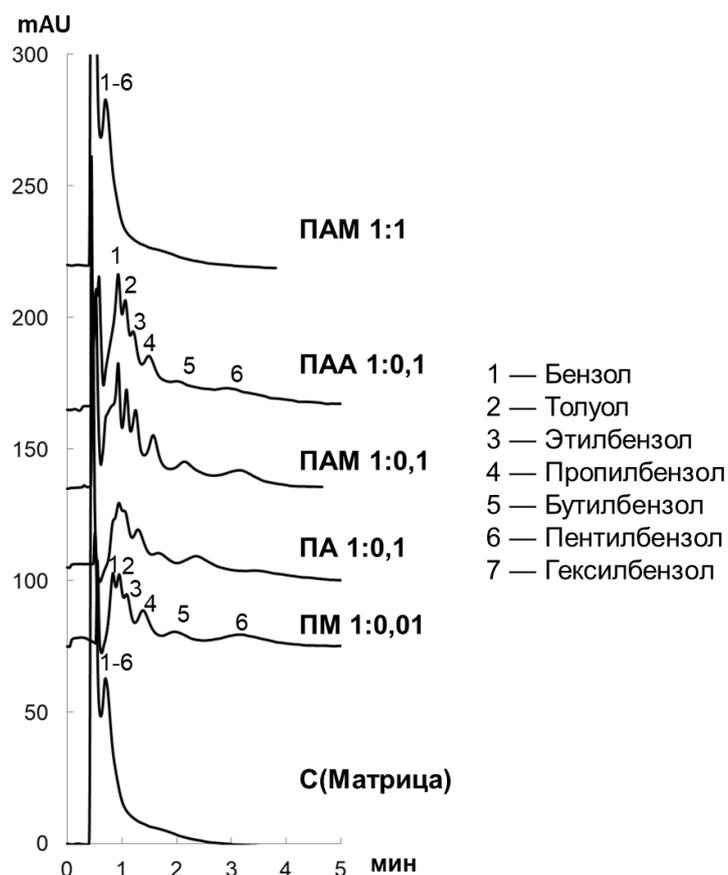


Рис. 57. Хроматограммы смеси алкилбензолов, полученные на матрице и сорбентах с полимерами в функциональном слое в условиях, указанных в табл. 9.

Изменение в порядке выхода для некоторых веществ также может указывать на наличие гидрофобных взаимодействий. Например, фумаровая кислота на фазах с полимерами в слое удерживается дольше глутаровой (рис. 46), а также меняется порядок элюирования — гуанина и цитидина — на противоположный величинам их параметров Ханша (рис. 58), что характерно для фаз на основе гидрофобной матрицы ПС-ДВБ [163] и также может быть маркером наличия гидрофобных взаимодействий.

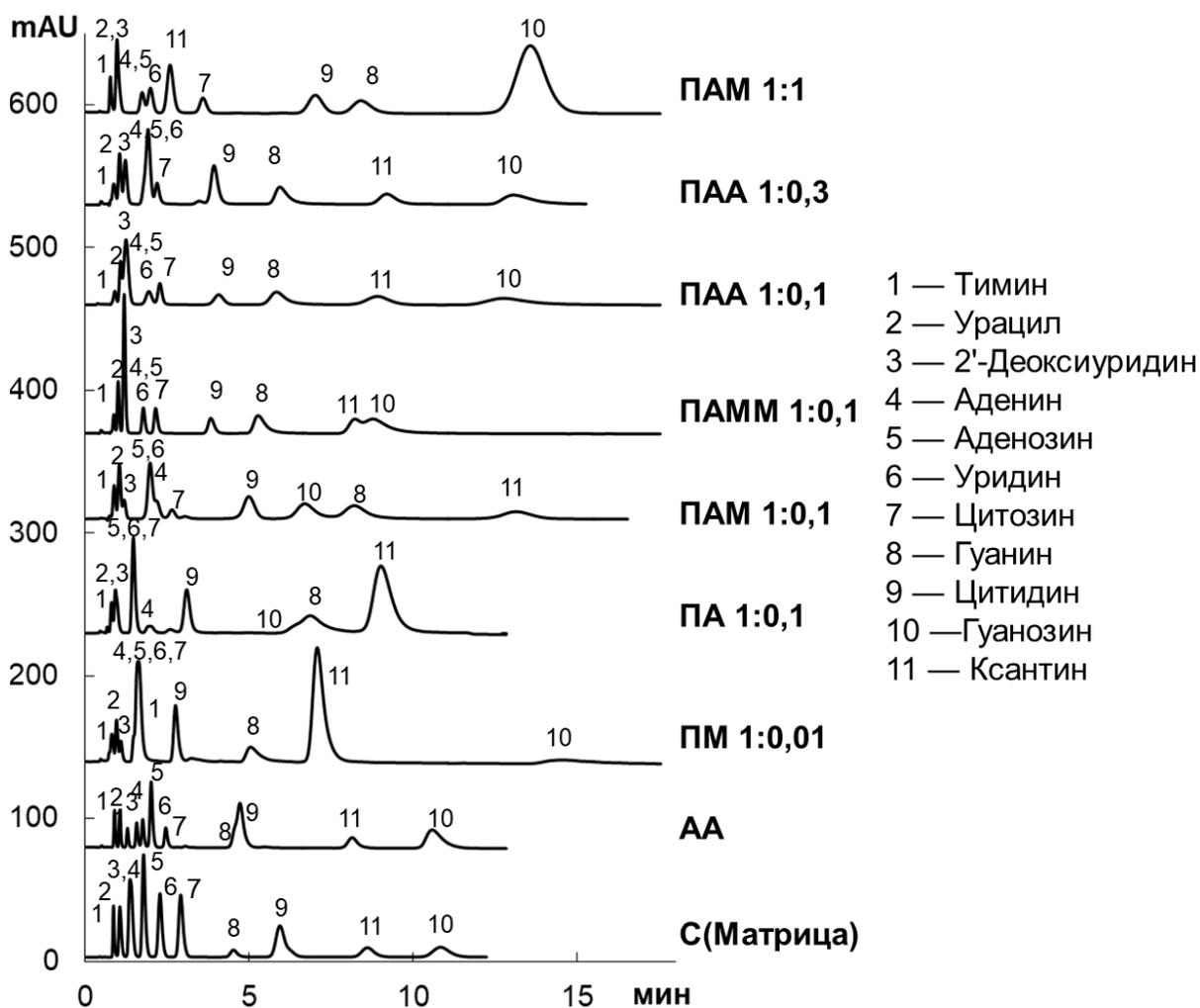


Рис. 58. Хроматограммы смеси азотистых оснований и нуклеозидов, полученные на матрице, сорбенте АА и сорбентах с полимерами в функциональном слое в условиях, указанных в табл. 9.

Для оценки диапазона реализации режимов ВЭЖХ на колонке ПАМ 1:0.1 для различных типов веществ: п-толуолсульфоната натрия (SPTS), гуанозина, фенилаланина, аденина и цитидина построены U-образные графики путем изменения доли ацетонитрила в подвижной фазе. Как видно из рис. 59 переход от ГИХ к обращенно-фазовому режиму происходит не для всех аналитов — только

для гидрофобного аниона SPTS и для относительно гидрофильного аденина ( $\log P = -0.73$ ). Несмотря на то, что данный переход реализуется лишь при более чем 80% водной фазы, его осуществление для аденина также может свидетельствовать о таких взаимодействиях с функциональным слоем. Тем не менее, показано, что сильнополярные гуанозин ( $\log P = -1.71$ ) и цитидин ( $\log P = -2.46$ ) могут удерживаться только за счет гидрофильных взаимодействий с неподвижной фазой и при увеличении доли воды их удерживание уменьшалось. Последнее, а также реализация перехода к ОФ режиму для менее полярных веществ только при большой доле водной составляющей, свидетельствует о все еще значительной роли гидрофильных взаимодействий и высокой полярности получаемых фаз с полимерами в слое.

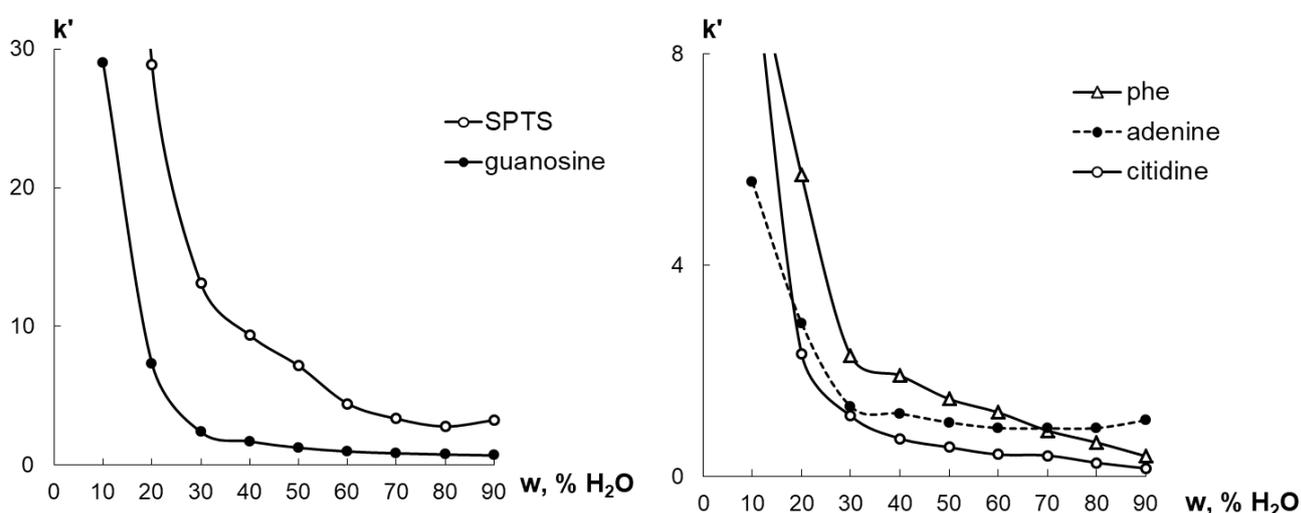


Рис. 59. Свойства неподвижной фазы ПАМ 1:0.1. U-образные графики для п-толуолсульфоната натрия (SPTS), гуанозина, фенилаланина, аденина и цитидина. ПФ: Вода:ацетонитрил. УФ-детектирование при 254 нм и 220 нм для фенилаланина.

Ввиду возможности реализации и гидрофильных, и гидрофобных взаимодействий была предпринята попытка разделения веществ разных классов, обладающих различными свойствами и гидрофильностью, на сорбенте с полимером в слое ПА 1:0.1. Как будет показано в главе 8, на удерживание гербицидов и фосфоновых кислот значительно влияет непосредственная концентрация буферного раствора в элюенте, в свою очередь на времена удерживания остальных аналитов, таких как, например, серин в большей степени влияет соотношение буферного раствора и ацетонитрила. Для одновременного разделения веществ данных классов важно, чтобы гербициды и фосфоновые кислоты демонстрировали приемлемые времена удерживания, и не происходило

размывание пиков. Для этого была взята большая концентрация буферного раствора (150 мМ). Коэффициенты асимметрии для гербицидов и фосфоновых кислот лежат в диапазоне 0.4-0.5, для сахаров, серина и аскорбиновой кислоты — 0.8-0.9. Эффективность веществ в такой модельной смеси достигала 16000 тт/м для витамина С. Хроматограмма представлена на рис. 60.

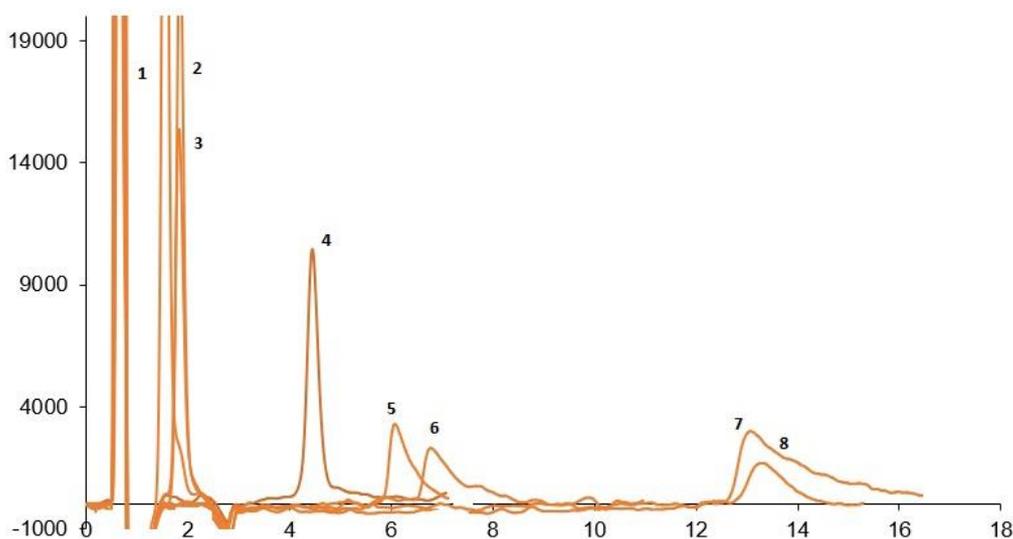


Рис. 60. Хроматограмма смеси аналитов разных классов, полученная на сорбенте ПА 1:0.1. Подвижная фаза: ацетонитрил / 150 мМ АФБ, рН 4.0 (70/30, об./об.). Рефрактометрическое детектирование. Скорость потока: 1 мл/мин. Аналиты: 1 — Лактоза, 2 — Раффиноза, 3 — Серин, 4 — Витамин С, 5 — t-ВРА, 6 — ВРА, 7 — АМРА, 8 — ГУРН.

Таким образом, введение различных полимерных кислот в функциональный слой сорбентов с помощью реакции Уги привело к приемлемому удерживанию и разделению гидрофобных алкилбензолов в режиме ОФ ВЭЖХ благодаря появлению гидрофобных взаимодействий при определенных массовых соотношениях матрицы и полимера, взятых на стадии синтеза. Также на примере гидрофобных алкилбензолов показано, что данные взаимодействия могут уменьшаться при существенном увеличении соотношения матрица:полимер по массе. Продемонстрированы предпосылки разделения веществ разных классов.

#### 4.6. Сравнение мономерного и полимерного слоя, полученного по реакции Уги

Как отмечено выше, на сорбентах с поликислотами по сравнению с матрицей, наблюдали предпосылки к разделению гидрофобных алкилбензолов в ОФ режиме, изменение селективности некоторых пар соединений, вызванное появлением гидрофобных взаимодействий. Однако необходимо еще раз подчеркнуть полное отсутствие данных предпосылок на фазах с мономерными слоями. В одинаковых условиях провели разделение галогенуксусных кислот: трихлоруксусной (ТСАА), дихлоруксусной (ДСАА), хлоруксусной кислот (МСАА), а также дибромуксусной (ДБАА) и бромуксусной кислот (МБАА) на сорбентах с моно- и полимерными слоями. Как будет показано в главе 8, на фазах с мономерным слоем галоген в структуре кислот не оказывает влияния на удерживание данных соединений. Однако на сорбенте с поликислотой, например, ПАМ 1:0.1 становится возможным разделение дибромуксусной и дихлоруксусной кислот, несмотря на уменьшение эффективности по данным веществам, как и по остальным модельным анализам. Хроматограмма приведена на рис. 61.

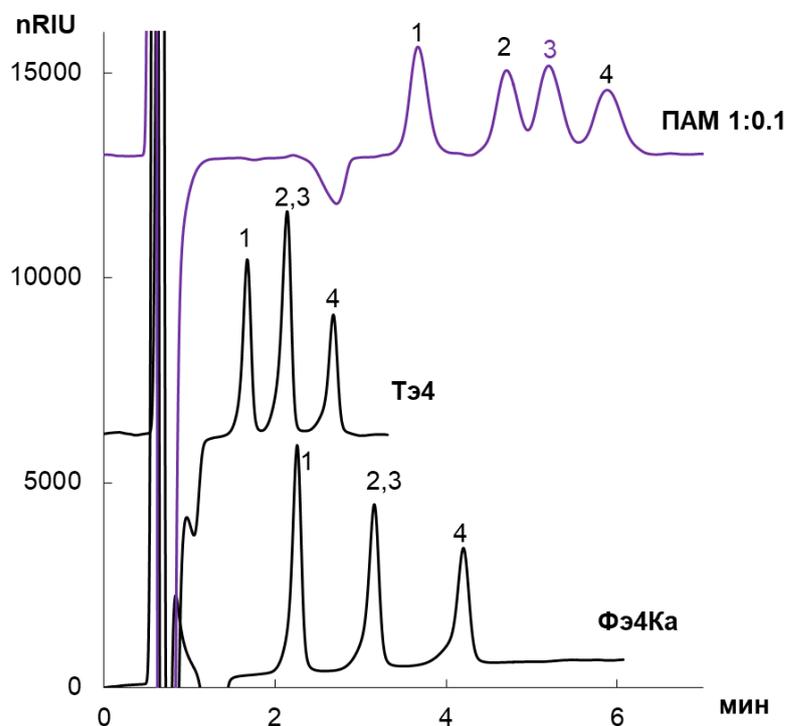


Рис. 61. Хроматограммы галогенуксусных кислот, полученные на сорбентах Фэ4Ка и Тэ4, а также на ПАМ 1:0.1. Подвижная фаза 100мМ АФБ рН 4.0 —  $\text{CH}_3\text{CN}$  (90:10, об.%); 1 мл/мин; рефрактометрическое детектирование. 1 — ТСАА, 2 — ДСАА, 3 — ДБАА, 4 — МСАА.

Для сравнения удерживания гербицидов и фосфоновых кислот на сорбентах с моно- и полимерным слоем выбраны фазы, различающиеся только используемой кислотой, с одинаковой гидрофильностью: АА ( $kU = 3.1$ ) и ПАМ 1:0.1 ( $kU = 3.1$ ), соответственно. Как будет показано в главе 8, увеличение удерживания гербицидов, продуктов их распада и фосфоновых кислот при постоянной доле ацетонитрила в подвижной фазе происходит при увеличении анионообменной селективности неподвижной фазы. Однако, показано, что факторы удерживания ряда наиболее гидрофобных гербицидов и фосфоновых кислот (*t*-ВРА, ВРА, ЕТN) на сорбентах с полимерным слоем выше (рис. 62), чем в случае мономерных структурных фрагментов, несмотря на меньшую анионообменную селективность на сорбенте ПАМ 1:0.1 ( $\alpha(AX) = 10.2$ ) по сравнению с сорбентом АА ( $\alpha(AX) = 24.7$ ). Этот эффект, вероятно, также вызван появлением гидрофобных взаимодействий на фазах с полимерной кислотой в условиях, характерных для ОФ ВЭЖХ. На сорбенте ПАМ 1:0.1 было продемонстрировано разделение 7 фосфоновых кислот и гербицидов за 15 мин. Хроматограмма приведена на рис. 62. Также отмечено улучшение формы пиков данных аналитов (GYPH, PPA) по сравнению с фазами, в структуре которых нет полимерных функциональных слоев.

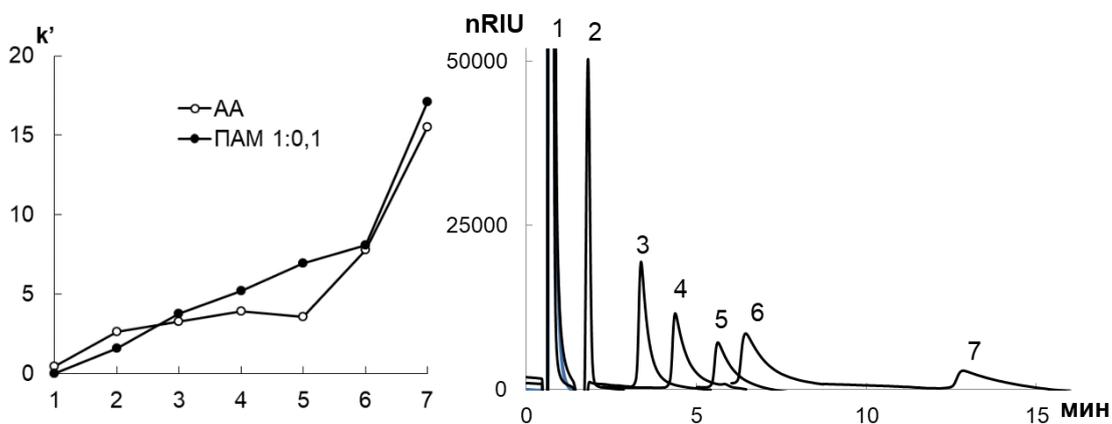


Рис. 62. Факторы удерживания данных аналитов на сорбенте с мономерным слоем АА и на сорбенте с полимерным слоем ПАМ 1:0,1 (слева). Хроматограммы 7 фосфоновых кислот и пестицидов, полученные на сорбенте ПАМ 1:0.1 (справа). Подвижная фаза 100мМ АФБ рН 4.0 —  $CH_3CN$  (90:10, об.%); 1 мл/мин; рефрактометрическое детектирование. 1 — АМРА, 2 — GLU, 3 — *t*-ВРА, 4 — ВРА, 5 — ЕТN, 6 — GYPH, 7 — PPA.

Как упоминалось ранее, несмотря на достаточную гидрофильность (рис. 63, слева) при создании полимерного функционального слоя на всех сорбентах происходит заметное уменьшение факторов удерживания сахаров (рис. 63, справа) по сравнению и с матрицей, и с фазами, содержащими мономерные фрагменты, и может свидетельствовать о лучшем экранировании 3-аминопропилсиликагеля. Такие функциональные слои могут стать перспективными для экранирования альтернативных матриц, таких как, например, полистирол-дивинилбензол.

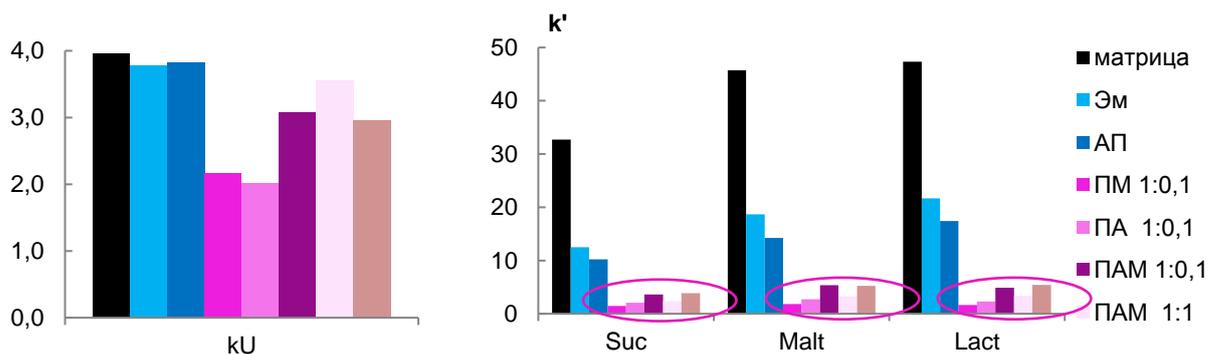


Рис. 63. Гидрофильность сорбентов (слева) и факторы удерживания сахаров (справа) на матрице ( $C_A$ ) и на сорбентах с мономерным (голубой цвет) и полимерным слоем (розовый цвет). Условия указаны в табл. 9.

Однако существенное уменьшение факторов удерживания приводит к значительному ухудшению разделения веществ данного класса на фазах с полимерным слоем. Напротив, сорбенты с мономерным слоем демонстрируют отличную перспективу разделения многокомпонентной смеси сахаров благодаря повышенной эффективности и селективности по сравнению с матрицей. В свою очередь, несколько сниженные по сравнению с матрицей факторы удерживания углеводов, ввиду замены аминогрупп матрицы на амидные, позволяют реализовать более экспрессное разделение. В то время как использование испарительного детектора светорассеяния и градиентного элюирования может обеспечить быстрое разделение бóльшего количества углеводов, в том числе олигосахаридов.

Так, на сорбенте Эм, демонстрирующем лучшую эффективность по сахарам в серии сорбентов, различающихся структурным фрагментом от изоцианида, за 20 мин было достигнуто разделение модельной смеси 10 сахаров, включая трисахарид раффинозу, факторы удерживания которого слишком высоки в изократическом режиме элюирования. Соотношение воды и ацетонитрила в подвижной фазе изменяли в интервале 14–27% и 86–73% соответственно. Сорбент

Эм продемонстрировал приемлемую форму пиков (коэффициенты асимметрии 1.0–2.1) и хорошее разрешение для смеси сахаров, в том числе пары мальтоза/лактоза. Хроматограмма и условия элюирования приведены на рис. 64.

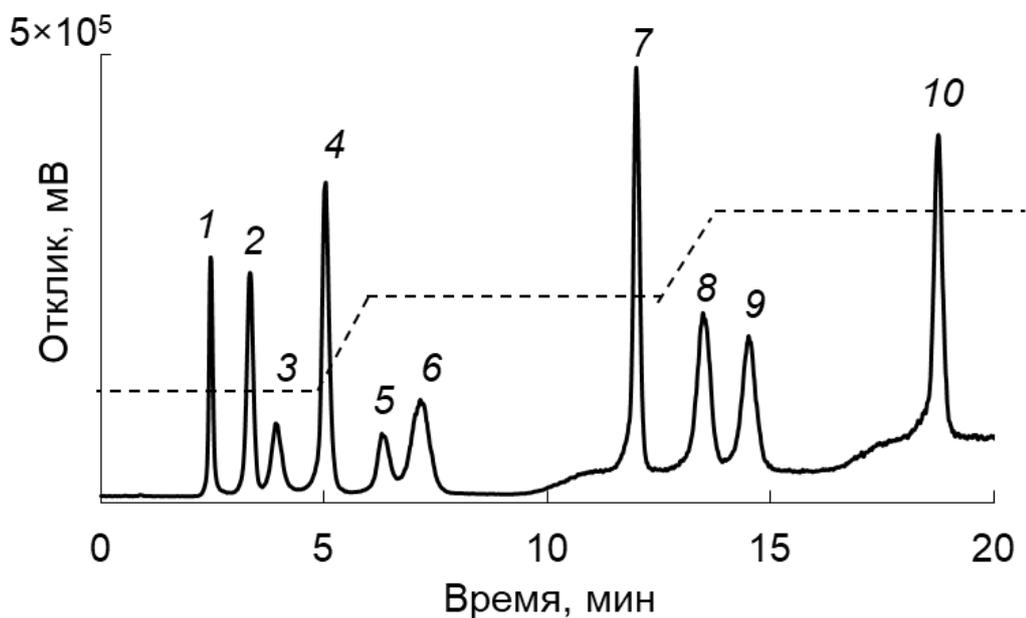


Рис. 64. Хроматограмма модельной смеси сахаров на сорбенте Эм. Условия разделения: ПФ: H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN; градиентное элюирование (а) 0–5.5 мин, 14% H<sub>2</sub>O; 6.5–12.5 мин, 22% H<sub>2</sub>O; 13.5–26.5 мин, 27% H<sub>2</sub>O; 28.5–32.5 мин, 14% H<sub>2</sub>O; Детектирование по светорассеянию; температура колонки 30°C; 1 — рибоза, 2 — ксилоза, 3 — фруктоза, 4 — глюкоза, 5 — сахароза, 6 — мальтоза, 7 — лактоза.

**Стабильность.** Для оценки перспективности использования полученных сорбентов изучили стабильность фаз, полученных по реакции Уги, на примере фазы АФ с мономерным слоем и фазы ПАМ 1:0.1 с полимерным слоем. Для этого через колонку (после ее тестирования по всем модельным классам аналитов) непрерывно пропускали 5 — 10 литров подвижной фазы, фиксировали времена удерживания полярных веществ различной природы: витаминов, азотистых оснований и нуклеозидов после 0.5 — 1 литра элюента. Смесь подобрали индивидуально для каждого сорбента. Для фазы АФ с мономерным слоем времена и факторы удерживания аналитов в течение пропускания 5 литров элюента изменялись несущественно (рис. 65), однако после пропускания 5 литров подвижной фазы наблюдали уменьшение эффективности по всем выбранным аналитам в 2 раза (рис. 66). Как было показано ранее, 3-аминопропилсиликагель, используемый в качестве матрицы данного сорбента, сам по себе нестабилен в

процессе эксплуатации. Формирование мономерного слоя не позволяет увеличить его стабильность.

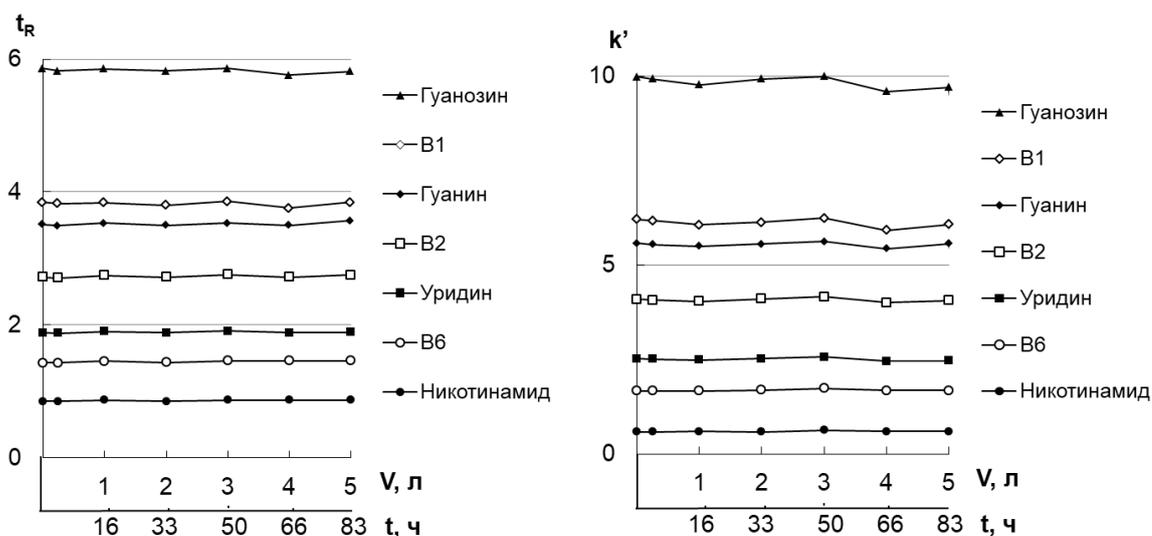


Рис. 65. Изменение времен (слева) и факторов удерживания (справа) полярных веществ в ходе эксплуатации колонки с сорбентом АФ; подвижная фаза: 100 мМ ААБ (рН 5.4) —  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10:90%); УФ-детектирование при 270 нм; скорость потока 1 мл/мин.

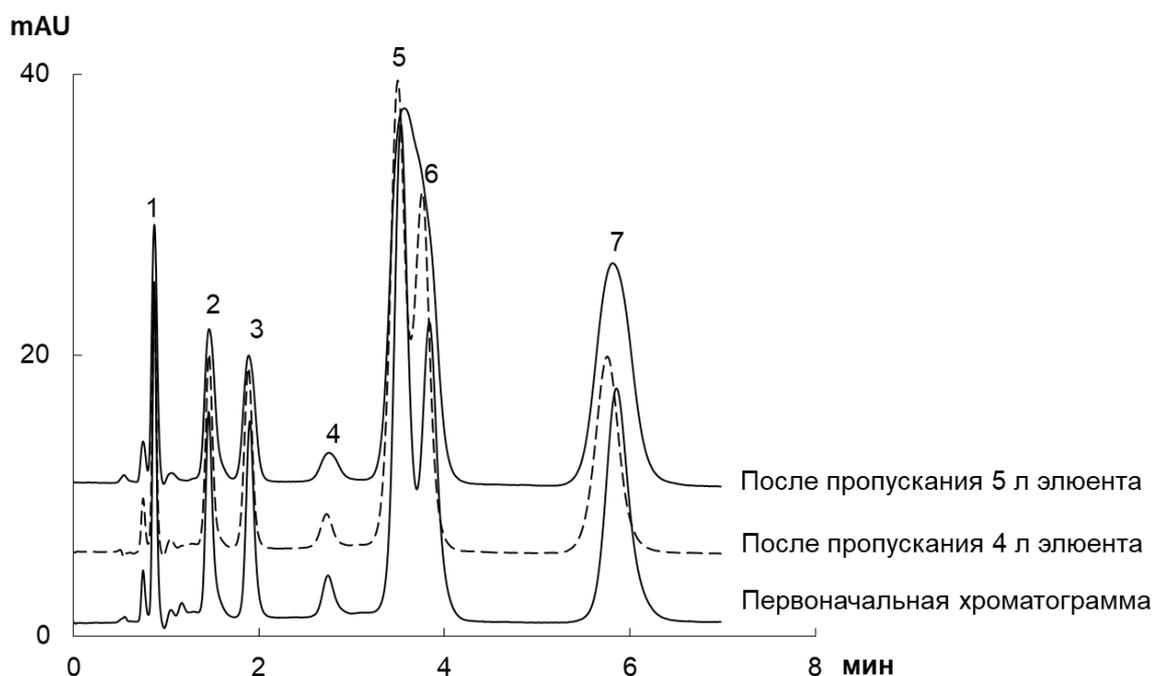


Рис. 66. Хроматограммы удерживания полярных веществ в ходе эксплуатации колонки с сорбентом АФ; подвижная фаза: 100 мМ ААБ (рН 5.4) —  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10:90%); УФ-детектирование при 270 нм; скорость потока 1 мл/мин: 1 — Никотинамид, 2 —  $B_6$ , 3 — уридин, 4 —  $B_2$ , 5 — гуанин, 6 —  $B_1$ , 7 — гуанозин.

Колонка с полимерным слоем продемонстрировала бóльшую стабильность: показано незначительное изменение времен и факторов удерживания веществ на

ПАМ 1:0.1 в течение пропускания 10 литров элюента (рис. 67). В данном случае эффективность по всем рассматриваемым веществам, наоборот, возросла в 1.5 раза после пропускания 6.5 литров подвижной фазы, и далее не происходило ее существенного изменения (рис. 68). Этот эффект, вероятно, можно объяснить стабилизацией полимерного слоя, сформированного по реакции Уги, после пропускания значительного объема элюента.

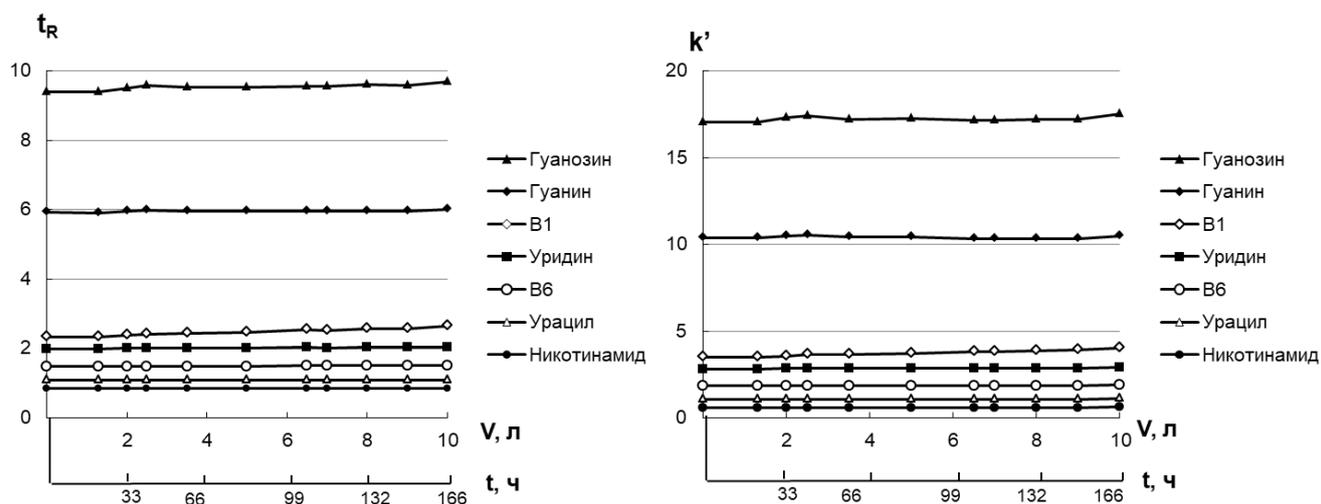


Рис. 67. Изменение времен (слева) и факторов удерживания (справа) полярных веществ в ходе эксплуатации колонки с сорбентом ПАМ 1:0.1; подвижная фаза: 100 мМ ААБ (рН 5.4) —  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10:90%); УФ-детектирование при 270 нм; скорость потока 1 мл/мин.

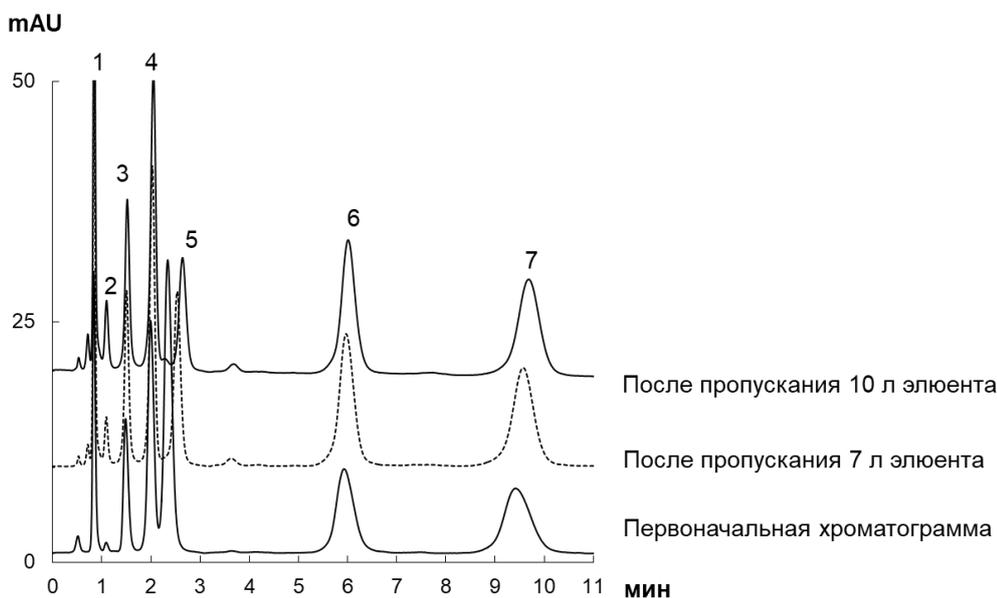


Рис. 68. Хроматограммы удерживания полярных веществ в ходе эксплуатации колонки с сорбентом ПАМ 1:0.1; подвижная фаза: 100 мМ ААБ (рН 5.4) —  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10:90%); УФ-детектирование при 270 нм; скорость потока 1 мл/мин: 1 — Никотинамид, 2 — урацил, 3 — В<sub>6</sub>, 4 — уридин, 5 — В<sub>1</sub>, 6 — гуанин, 7 — гуанозин.

## ГЛАВА 5. Сорбенты на основе различных матриц, модифицированных эремомицином<sup>4</sup>

Как было показано в обзоре литературы, применительно к методу ГИХ создание функциональных слоев с антибиотиками имеет ряд преимуществ: полярные группы на поверхности, в том числе амидные, могут обеспечить существенную гидрофилизацию поверхности, а большой размер молекул — значительное экранирование разных матриц. Более того, сорбенты с хиральными селекторами в слое также возможно использовать для разделения энантиомеров.

Важно отметить, что можно варьировать способ закрепления антибиотика к поверхности матрицы. Использование бифункционального линкера 1,4-БДДГЭ позволяет увеличить количество закрепляемых макромолекул благодаря его разветвлению на поверхностных аминогруппах (от одной до трех на каждую исходную), а также дополнительно повысить степень экранирования матрицы.

В работе изучали свойства сорбентов на основе силикагеля и ПС-ДВБ, модифицированных эремомицином, закрепленным на поверхности разных матриц различными способами. Исследовали удерживание полярных соединений на хиральном сорбенте Диасфер-110-Ere (ЗАО “БиоХимМак СТ”) на основе силикагеля с иммобилизованным с помощью линейного глицидоксипропильного спейсера эремомицином. Получили новую фазу на основе 3-аминопропилсиликагеля с использованием бифункционального спейсера 1,4-БДДГЭ, на эпоксидных фрагментах которого далее закрепляли эремомицин. Показано, что такой подход является перспективным также для гидрофилизации гидрофобной матрицы ПС-ДВБ, при этом в [92] установлено, что два цикла модифицирования приводит к наибольшей эффективности фаз по отношению к полярным веществам. В связи с этим для закрепления эремомицина на поверхности ПС-ДВБ предварительно создавали разветвленный слой 1,4-БДДГЭ в результате двух циклов модифицирования (табл. 8). Для оценки вклада функционального слоя с эремомицином изучали разделяющие способности матриц или продуктов предыдущих стадий, не содержащих антибиотик. Таким образом, прототипами для сравнения стали пары сорбентов С-Э и С (силикагель), С<sub>А</sub>-Б-Э и С<sub>А</sub>-Б на основе 3-аминопропилсиликагеля, П-2Б-Э и П-2Б на основе ПС-ДВБ.

---

<sup>4</sup> При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

4. **Чикурова Н.Ю.**, Просунцова Д.С., Ставрианиди А.Н., Староверов С.М., Ананьева И.А., Смоленков А.Д., Чернобровкина А.В. Новые многофункциональные сорбенты для ВЭЖХ на основе различных матриц, модифицированных эремомицином // Журн. аналит. химии. 2023. Т. 78. №5. С. 1. 60%.

## 5.1. Гидрофильность и ионообменные селективности

**Гидрофильность.** Согласно результатам теста Танака, представленным в табл. 25, сорбенты, модифицированные эремомицином ( $\log P = -3,21$  согласно Eriweb 4.1), продемонстрировали большие величины фактора удерживания уридина  $k_U$  по сравнению с соответствующими матрицами и сорбентами-прототипами, что свидетельствует об успешном введении гидрофильных фрагментов в структуру функциональных слоев.

Таблица 25. Величины коэффициентов селективности теста Танака и факторов удерживания модельных веществ

Параметр	$k(U)$	$\alpha (AX)$	$\alpha (CX)$	$\alpha (CH_2)$	$\alpha (OH)$	$\alpha (V/A)$	$\alpha (Tb/Tr)$
С	0.8	0.1	45.1	1.1	1.1	1.2	1.2
С-Э	2.5	1.7	1.6	1.1	1.4	1.3	1.1
$C_A$ -Б	1.6	26.9	0	1.2	1.6	1.4	0.4
$C_A$ -Б-Э	2.0	19.4	0	1.2	1.7	1.4	0.5
П-2Б	0.4	271.3	0	1.1	2.3	1.3	0.2
П-2Б-Э	1.2	34.1	0	1.1	1.8	1.3	0.5

При рассмотрении нейтральных полярных сахаров и цвиттер-ионных аминокислот в качестве модельных объектов для попарного сравнения полученных сорбентов показано, что при модифицировании эремомицином всех трех типов матриц (на основе силикагеля С, с пространственным удалением функционального слоя  $C_A$ -Б и полимерной матрицы П-2Б) факторы удерживания сахаров и аминокислот значительно увеличивались (табл. 26), что согласовалось с увеличением гидрофильности по результатам теста Танака. Наибольшее увеличение факторов удерживания сахаров (в 2–3 раза) и аминокислот (в 2–3.5 раза) отмечено для пары: матрица С и сорбент С-Э без значительного удаления функционального слоя. При сравнении сорбентов  $C_A$ -Б-Э и С-Э, различающихся способами закрепления эремомицина в функциональных слоях, наблюдали меньшие факторы удерживания практически всех полярных нейтральных и цвиттер-ионных веществ на сорбенте  $C_A$ -Б-Э, что, вероятно, связано с наличием в структуре гидрофобных бутильных фрагментов. Таким образом, показано, что удерживание аналитов зависит от длины и структуры линкера.

Наименьшее увеличение факторов удерживания сахаров — до 1.5 раз при введении эремомицина в функциональный слой — среди рассматриваемых фаз показала пара сорбентов на основе ПС-ДВБ, что может свидетельствовать о

сохранении значительного влияния гидрофобной матрицы на удерживание полярных нейтральных сахаров, несмотря на увеличение гидрофильности

Таблица 26. Величины факторов удерживания модельных веществ

	Вещество	С	С-Э	С <sub>А</sub> -Б	С <sub>А</sub> -Б-Э	П-2Б	П-2Б-Э
Сахара	Сахароза	1.5	3.4	1.4	2.3	1.2	1.2
	Лактоза	2.0	4.9	1.9	3.2	1.2	1.6
	Мальтоза	1.7	4.7	2.0	3.0	1.3	1.7
Аминокислоты	Фенилаланин	1.4	3.7	2.0	2.2	2.5	3.4
	Пролин	3.1	6.3	2.8	3.5	0.7	1.7
	Аспарагин	2.6	9.3	5.5	6.9	2.2	4.2
	Серин	3.9	8.5	8.8	10.6	3.1	4.7
	Урацил	0.5	1.8	0.8	1.1	0.4	1.3
	Уридин	2.2	3.3	1.7	2.1	0.7	1.6
	Аденозин	1.8	4.5	2.0	2.6	0.9	1.8
	Аденин	2.2	5.1	2.5	3.0	1.0	2.2
	Цитозин	3.2	17.9	2.7	4.6	0.7	8.3
	Цитидин	3.0	10.4	3.8	5.4	1.2	4.0
Витамины	Гуанин	2.5	28.0	7.5	11.1	2.1	14.9
	Гуанозин	2.5	72.6	8.9	18.4	3.1	29.8
	Ксантин	1.0	17.3	16.3	21.0	4.2	31.1
	Никотинамид	0.8	1.1	0.5	0.6	0.2	0.3
	В <sub>6</sub>	2.0	2.0	1.4	1.7	0.5	0.8
	В <sub>2</sub>	3.0	5.1	2.1	2.7	0.9	1.9
	В <sub>1</sub>	69.4	12.9	0.6	1.2	0.02	0.7
Кислоты	Никотиновая кислота	1.7	5.2	10.8	10.8	3.1	4.9
	В <sub>12</sub>	18.8	16.0	4.8	6.2	0.1	0.4
	Витамин С	2.0	5.5	18.7	17.5	2.7	4.0
Алкилбензолы	Пировиноградная	0.5	1.1	0.7	0.9	2.3	2.1
	Аскорбиновая	1.0	1.9	2.2	2.8	2.2	2.3
	Глутаровая	3.7	8.8	7.0	9.5	14.3	18.8
	Винная	3.9	6.5	6.4	8.1	16.1	13.8
	Щавелевая	4.0	7.0	14.5	16.4	20.4	19.2
	Фумаровая	4.4	7.4	7.2	9.1	23.2	26.9
Алкилбензолы	Бензол	—	—	—	—	2.4	2.2
	Толуол	—	—	—	—	3.2	3.0
	Этилбензол	—	—	—	—	4.1	3.9
	Пропилбензол	—	—	—	—	5.6	5.4
	Бутилбензол	—	—	—	—	8.0	7.8
	Пентилбензол	—	—	—	—	11.0	10.9
	Гексилбензол	—	—	—	—	15.8	15.7

Введение эремомицина в функциональные слои на всех матрицах также привело к увеличению факторов удерживания азотистых оснований и нуклеозидов (табл. 26). Интересно отметить, что наблюдали увеличение фактора удерживания наиболее гидрофильного гуанозина в 30 раз для пары сорбентов на основе силикагеля после закрепления эремомицина, а для пары сорбентов на основе ПС-ДВБ — в 10 раз. Такое значительное изменение факторов удерживания полярного вещества доказывает перспективность использования антибиотиков для гидрофилизации поверхности различных матриц.

Необходимо отметить увеличение факторов удерживания незаряженных витаминов при модифицировании различных матриц эремомицином, а также увеличение факторов удерживания всех витаминов при модифицировании матрицы на основе ПС-ДВБ (табл. 26), что свидетельствует в пользу экранирования гидрофобной поверхности.

**Катионообменная селективность.** Установлено существенное уменьшение катионообменной селективности  $\alpha(CX)$  для сорбента на основе силикагеля С-Э по сравнению с матрицей С (табл. 25), что указывает на экранирование отрицательного заряда силикагеля при закреплении антибиотика.

Таблица 27. Уравнения и коэффициенты корреляции логарифмической и билогарифмической зависимостей факторов удерживания тиамин от доли водной части (10–30%) в подвижной фазе (1, 2) или от концентрации (3) буферного раствора (10–100 мМ)

Сорбент	$\lg k'=f_1(w(H_2O))$	$r_1$	$\lg k'=f_2(\lg w(H_2O))$	$r_2$	$\lg k'=f_3(\lg C)$	$r_3$
С	$y = -4.4x + 2.2$	0.978	$y = -1.9x - 0.1$	0.999	$y = -0.5x + 0.5$	0.998
С-Э	$y = -5.4x + 1.7$	0.991	$y = -2.3x - 1.1$	0.999	$y = 0.2x + 0.5$	0.995

Условия: подвижная фаза  $CH_3CN$ –ААБ с рН 5.4; скорость потока – 1 мл/мин; УФ-детектирование при 270 нм.

Согласно данным табл. 27, на матрице С реализуется адсорбционный механизм удерживания тиамин со значительным вкладом электростатических взаимодействий, а на сорбенте С-Э наблюдается увеличение вклада распределительного механизма в сочетании с адсорбционным вследствие гидрофилизации поверхности сорбента при введении эремомицина. При этом уменьшение факторов удерживания тиамин с возрастанием концентрации элюирующего иона в подвижной фазе и крутизна  $-0.5$  соответствующей зависимости (3) для силикагеля сменяется обратным наклоном со снижением

вклада электростатических взаимодействий до 0.2 в случае С-Э (табл. 27), что может свидетельствовать об отталкивании положительно заряженного аналита или эффекте высаливания. Полученные результаты совместно с уменьшением катионообменной селективности  $\alpha(CX)$  подтвердили успешное экранирование отрицательного заряда силикагеля с помощью антибиотика, что отразилось на факторах удерживания положительно заряженного тиамина, уменьшившихся в пять раз на сорбенте С-Э по сравнению с фазой С (табл. 26) и привело к уменьшению селективности по паре витаминов В<sub>1</sub>/В<sub>2</sub> (рис. 69).

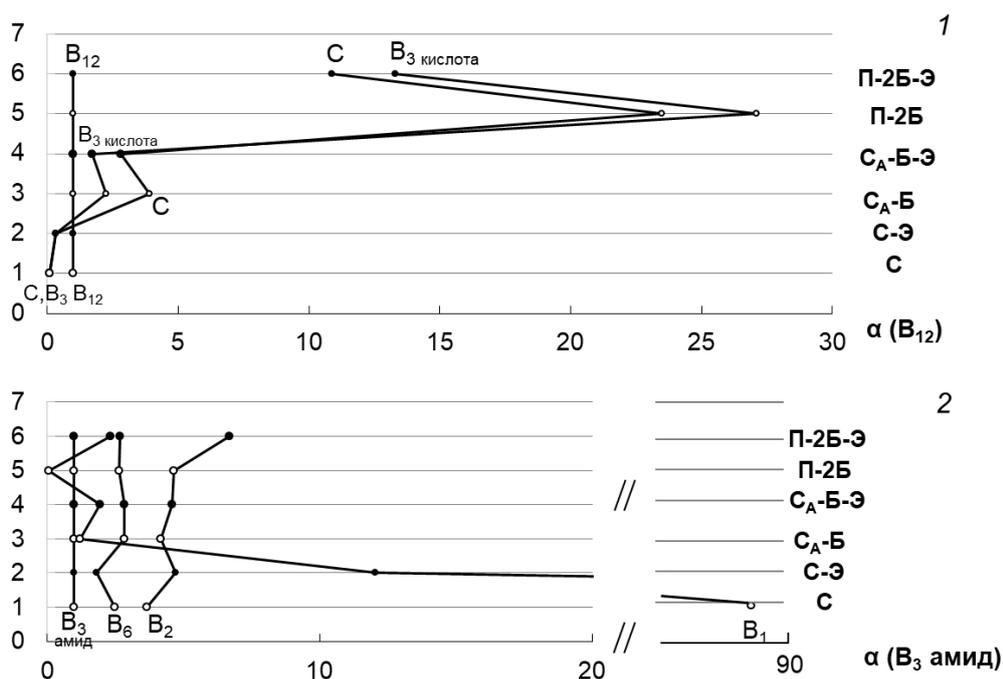


Рис. 69. Шкалы селективности витаминов в условиях, указанных в табл. 9.

**Анионообменная селективность.** Сорбенты С<sub>А</sub>-Б и П-2Б характеризуются положительным зарядом поверхности и ярко выраженной анионообменной селективностью  $\alpha(AX)$  вследствие протонирования аминогрупп в хроматографических условиях, увеличения степени их замещения вплоть до кватернизации атомов азота исходных матриц при присоединении до трех молекул 1,4-БДДГЭ к каждой аминогруппе. Существенное уменьшение величин  $\alpha(AX)$  для двух пар сорбентов на основе разных матриц после их модифицирования эремомицином – С<sub>А</sub>-Б-Э и П-2Б-Э – аналогично свидетельствует об экранировании положительного заряда эремомицином.

Эффект экранирования положительно заряженной поверхности наблюдается также при оценке селективности (рис. 69) пары никотинамид/В<sub>1</sub>: на сорбенте с

пространственным удалением функционального слоя С<sub>А</sub>-Б-Э по сравнению с прототипом С<sub>А</sub>-Б происходит ее увеличение, а для сорбентов на основе полимерной матрицы П-2Б и П-2Б-Э селективность для этой пары витаминов иная. На сорбенте П-2Б с большой анионообменной селективностью (табл. 25) реализуется электростатическое отталкивание положительно заряженного тиамин, и он элюируется практически с мертвым временем. Введение эремомицина в функциональный слой и в случае гидрофобной матрицы приводит к значительному уменьшению анионообменной селективности для сорбента П-2Б-Э и позволяет увеличить удерживание тиамин.

Для сорбента С<sub>А</sub>-Б-Э отмечено уменьшение селективности для пары никотиновая/аскорбиновая кислота по сравнению с прототипом С<sub>А</sub>-Б, что согласуется с уменьшением его анионообменной селективности (табл. 25) и, как следствие, меньшим удерживанием диссоциированных и отрицательно заряженных карбоксильных групп аналитов. В случае сорбентов на основе ПС-ДВБ наблюдали увеличение факторов удерживания этих кислот без значимого изменения селективности для их пары несмотря на существенное уменьшение анионообменной селективности сорбента П-2Б-Э по сравнению с прототипом П-2Б. На основании полученных результатов можно заключить, что именно повышение гидрофильности функционального слоя сорбента способствует возрастанию факторов удерживания и вносит существенно больший вклад в удерживание веществ кислотной природы, чем его анионообменная селективность.

При модифицировании эремомицином матриц на основе силикагеля и аминопропилсиликагеля происходило увеличение факторов удерживания кислот практически в два раза (табл. 26), что согласуется с увеличением гидрофильности k<sub>U</sub> в три раза и появлением анионообменной селективности в случае пары фаз С/С-Э. На примере пары С<sub>А</sub>-Б/С<sub>А</sub>-Б-Э наблюдали увеличение факторов удерживания кислот только на 15–35% при возрастании гидрофильности на 20% и сохранении высокой анионообменной селективности, на порядок большей, чем для С-Э. Незначительное увеличение до 10% факторов удерживания ряда кислот, кроме винной и шавелевой, по сравнению с прототипом на основе полимера наблюдали для сорбента П-2Б-Э с большей гидрофильностью и на порядок меньшей анионообменной селективностью по сравнению с П-2Б. Результаты, полученные

для этого ряда кислот, согласуются с таковыми для аскорбиновой и никотиновой кислот в других условиях элюирования, что подтверждает правомерность сделанных выводов о доминирующем влиянии гидрофильности фазы на удерживание веществ кислотного характера.

Интересно отметить, что происходит изменение порядка элюирования щавелевой и фумаровой кислот на сорбентах на основе полимера по сравнению с фазами на основе силикагеля. Этот факт, вероятно, связан с гидрофобными взаимодействиями аналитов и ПС-ДВБ, которые сохраняются после модифицирования эремомицином.

Гидроксильная селективность  $\alpha(\text{ОН})$  сорбентов возрастает для С-Э по сравнению с С, что согласуется с увеличением гидрофильности (табл. 25). Показано, что селективность по отношению к стереоизомерам  $\alpha(\text{V/A})$  и метиленовая селективность  $\alpha(\text{CH}_2)$  значительно не изменяются для полученных сорбентов по сравнению с соответствующими матрицами, а величины  $\alpha(\text{Tb/Tr}) < 1$  подтвердили основную природу сорбентов на основе аминопропилсиликагеля и полимера (С<sub>А-Б</sub>, С<sub>А-Б-Э</sub>, П-2Б, П-2Б-Э),  $\alpha(\text{Tb/Tr}) > 1$  — кислотную природу сорбентов на основе силикагеля (С, С-Э).

Таким образом, показано, что закрепление эремомицина позволяет экранировать различные матрицы и является хорошим способом их гидрофилизации.

## **5.2. Эффективность и разделяющая способность модифицированных сорбентов**

Среди всех сорбентов самую высокую эффективность продемонстрировали сорбенты на основе 3-аминопропилсиликагеля. Необходимо отметить значительное уменьшение эффективности практически по всем классам рассматриваемых соединений для сорбентов, модифицированных объемным антибиотиком, на основе силикагеля С-Э и на основе полимерной матрицы П-2Б-Э (рис. 70), что согласуется с литературными данными [102]. В свою очередь, эффективность сорбентов на основе 3-аминопропилсиликагеля по азотистым основаниям и нуклеозидам, витаминам и кислотам сопоставима, а случае сахаров сорбент С<sub>А-Б-Э</sub> продемонстрировал двукратное возрастание эффективности по сравнению с прототипом. Таким образом, способ закрепления эремомицина с

пространственным удалением функциональных групп и повышенная степень экранирования гидрофильной матрицы благодаря наличию спейсера позволяют сохранить эффективность при введении в слой молекул большого размера. В отличие от пространственного удаления слоя, сформированного по реакции Уги, в данном случае благодаря существенной гидрофилизации поверхности антибиотиком использование линкера напротив приводит к улучшению хроматографических характеристик и является целесообразным для всех классов тестируемых аналитов.

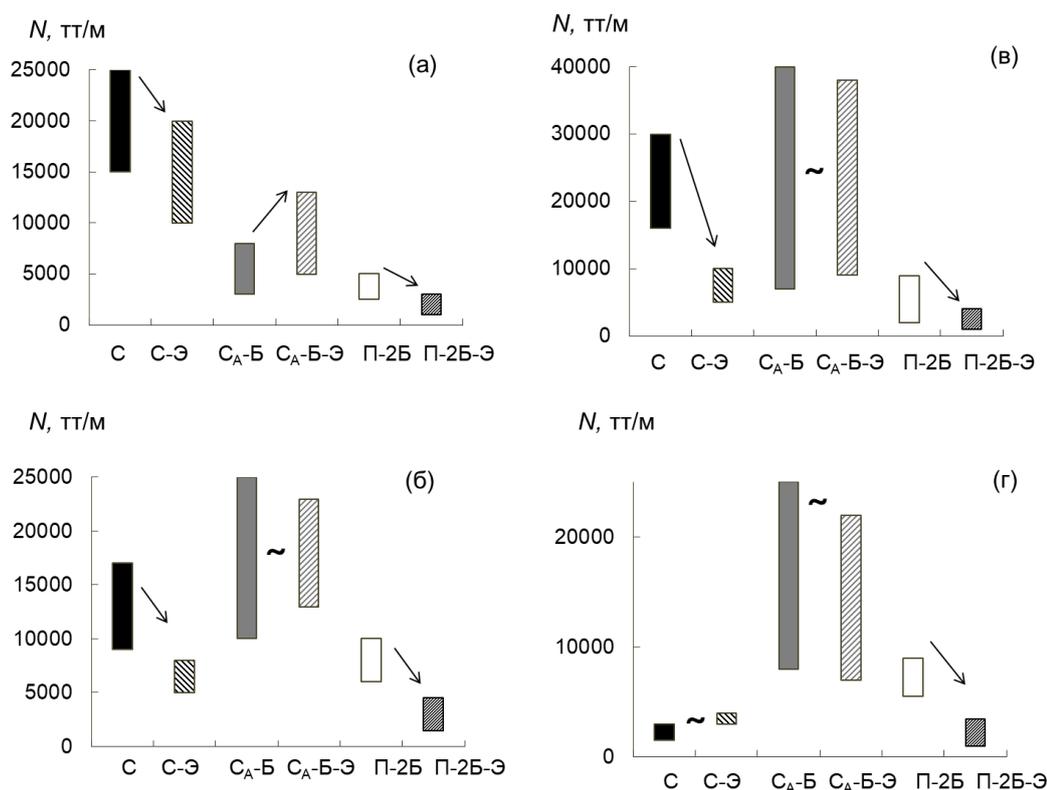


Рис. 70. Эффективность колонок по отношению к разным классам модельных веществ. Условия указаны в табл. 9 (а) Сахара, (б) Азотистые основания и нуклеозиды, (в) Витамины, (г) Органические кислоты.

Благодаря увеличению селективности пары никотинамид/В<sub>1</sub> на сорбенте С<sub>А</sub>-Б-Э по сравнению с прототипом С<sub>А</sub>-Б возможно разделение данной пары до базовой линии. В целом сорбенты, полученные при модифицировании эремомицином, продемонстрировали хорошую разделяющую способность и разрешение пиков семи витаминов (рис. 71). Доля водной фазы для сорбентов С-Э и П-2Б-Э с наибольшими факторами удерживания для разделения азотистых оснований и нуклеозидов составила 15%, для сорбента С<sub>А</sub>-Б-Э на основе

3-аминопропилсиликагеля — 10%. Благодаря сочетанию повышенной селективности сорбента С<sub>А</sub>-Б-Э и его высокой эффективности максимальная разделяющая способность данного сорбента включает 11 азотистых оснований и нуклеозидов. Хроматограммы смесей представлены на рис. 71.

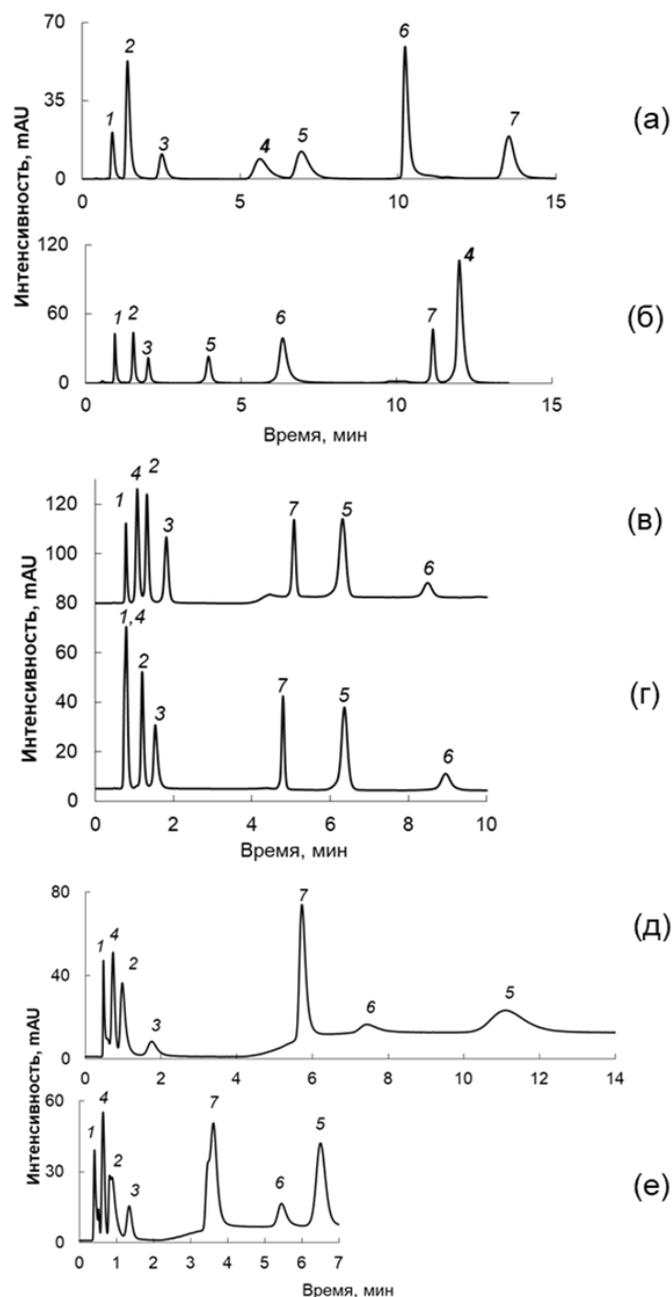


Рис. 71. Хроматограммы модельной смеси витаминов. ПФ: 100 мМ ААБ с рН 5.4—CH<sub>3</sub>CN. Сорбенты: С-Э (а), С (б); градиентное элюирование для С-Э: 0–8 мин 12% ААБ, 9.5–16 мин 24% ААБ; для С: 0–7.5 мин 10% ААБ, 9–16 мин 31% ААБ. Сорбенты С<sub>А</sub>-Б-Э (в), С<sub>А</sub>-Б (г); градиентное элюирование: 0–2 мин 10% ААБ, 3.5–10 мин 25% ААБ. Сорбенты П-2Б-Э (д), П-2Б (е); ПФ: 100 мМ АФБ с рН 3.0—CH<sub>3</sub>CN: градиентное элюирование для П-2Б-Э: 0–3.5 мин 10% АФБ, 4.7–15 мин 22% АФБ; для П-2Б: 0–1.5 мин 7% АФБ, 4.7–15 мин 15% АФБ; УФ-детектирование при 270 нм. 1 — никотинамид, 2 — В<sub>6</sub>, 3 — В<sub>2</sub>, 4 — В<sub>1</sub>, 5 — никотиновая кислота, 6 — витамин С, 7 — В<sub>12</sub>.

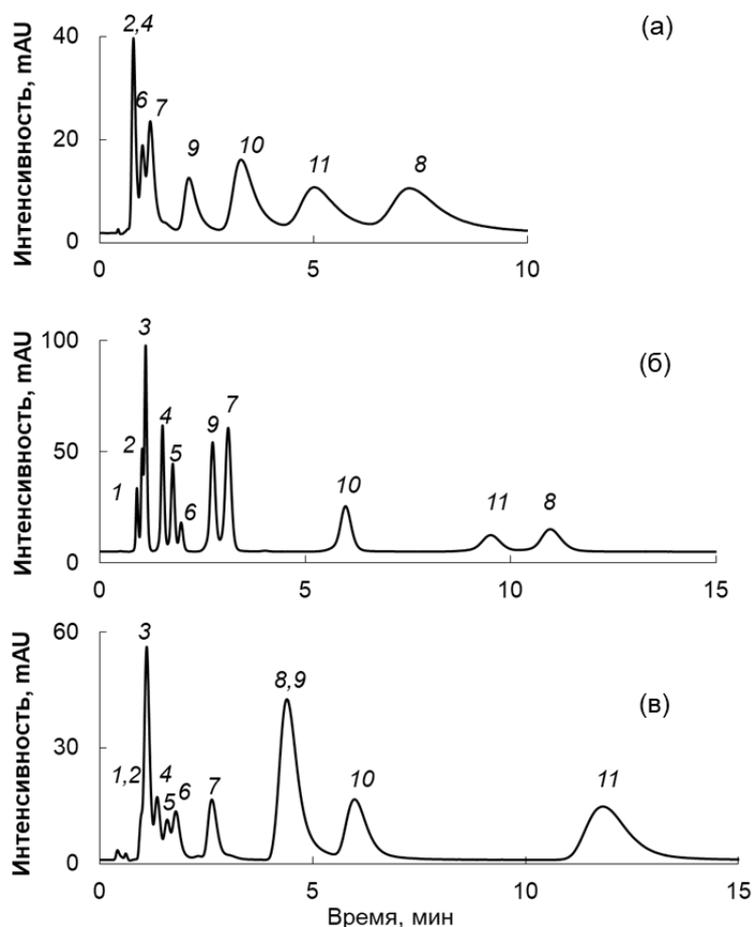


Рис. 72. Хроматограммы модельной смеси азотистых оснований и нуклеозидов. Сорбенты: П-2Б-Э (а), С<sub>А</sub>-Б-Э (б), С-Э (в); ПФ: 20 мМ ААБ с рН 4.7—СН<sub>3</sub>CN (15:85 для 1 и 3, 10 : 90 для 2); УФ-детектирование при 254 нм. 1 — тимин, 2 — урацил, 3 — 2'-дезоксуридин, 4 — уридин, 5 — аденозин, 6 — аденин, 7 — цитидин, 8 — ксантин, 9 — цитозин, 10 — гуанин, 11 — гуанозин.

### 5.3. Многофункциональные возможности сорбентов

*Разделение гидрофобных веществ.* Полученные гидрофильные сорбенты на основе силикагеля ожидаемо не удерживают гидрофобные алкилбензолы и, таким образом, эти фазы могут быть бифункциональными, пригодными для использования в режимах гидрофильной и хиральной хроматографии. Наличие гидрофобной матрицы ПС-ДВБ позволяет реализовать дополнительный тип взаимодействий аналитов с такой архитектурой новых неподвижных фаз, благодаря чему становится возможным разделение гидрофобных соединений в режиме ОФ ВЭЖХ [31].

Порядок элюирования алкилбензолов на полимерных сорбентах П-2Б и П-2Б-Э характерен для ОФ ВЭЖХ (рис. 73), и их удерживание увеличивается с уменьшением содержания ацетонитрила в элюенте. Разделения смеси

алкилбензолов в изократическом режиме удалось достичь за 10 мин при использовании воды и ацетонитрила в соотношении 20:80 (по объему). Факторы удерживания алкилбензолов на сорбенте П-2Б-Э несколько уменьшились по сравнению с прототипом П-2Б, что согласуется с большей гидрофильностью (табл. 25) сорбента П-2Б-Э, модифицированного эремомицином. Однако, как и для других классов модельных соединений, применение эремомицина для создания нового функционального слоя приводит к уменьшению эффективности на сорбенте П-2Б-Э в два раза. Таким образом, несмотря на гидрофилизацию поверхности, в случае модифицированного сорбента на основе ПС-ДВБ в значительной степени сохраняется влияние гидрофобной матрицы и возможна реализация различных типов взаимодействия аналитов с неподвижной фазой.

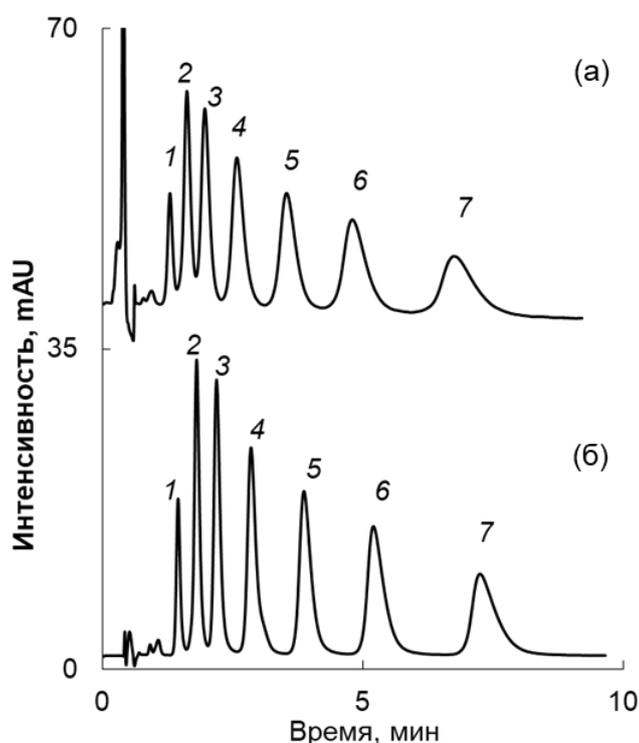


Рис. 73. Хроматограммы модельной смеси алкилбензолов. Сорбенты: П-2Б-Э (а), П-2Б (б); ПФ:  $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$  (20 : 80); УФ-детектирование при 254 нм. 1 — бензол, 2 — толуол, 3 — этилбензол, 4 — пропилбензол, 5 — бутилбензол, 6 — пентилбензол, 7 — гексилбензол.

*Разделение энантиомеров.* Закрепление хирального селектора в функциональном слое сорбента может обеспечить его энантиоселективность, проявление которой также будет свидетельствовать об эффективности модифицирования матрицы. На сорбенте П-2Б-Э изучили удерживание оптически активных соединений. Содержание органической добавки в элюенте варьировали

от 95% до 5%. Неподвижная фаза проявила энантиоселективность к аминокислотам, порядок удерживания которых характерен для гидрофильной хроматографии. Достигнуто разделение энантиомеров ряда аминокислот и их производных при элюировании подвижной фазой метанол–0.05%-ный буферный раствор ацетата триэтиламина с рН 4.0 (80 : 20) (валин  $\alpha = 2.2$ ,  $R_s = 1.1$ , лейцин  $\alpha = 2.5$ ,  $R_s = 1.3$ , КБЗ-аспарагин  $\alpha = 1.7$ ,  $R_s = 1.3$ ). При переходе на подвижную фазу состава ацетонитрил—10 мМ буферный раствор ацетата аммония с рН 5.2 достигли разделения энантиомеров 4-хлорфенилаланина до базовой линии при содержании ацетонитрила 60% ( $R_s = 1.8$ ,  $\alpha = 3.5$ ). Хроматограмма представлена на рис. 74. Проявленные хиральные свойства неподвижной фазы также подтверждают закрепление эремомицина на сорбенте.

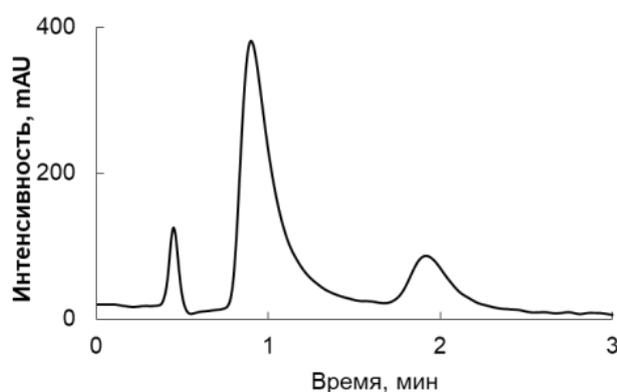


Рис. 74. Хроматограмма смеси энантиомеров 4-хлорфенилаланина. ПФ: 10 мМ ААБ с рН 5.2— $\text{CH}_3\text{CN}$  (60:40%). Скорость потока — 1 мл/мин.

**Стабильность.** Для оценки эксплуатационных характеристик полученных сорбентов изучили стабильность модифицированных фаз на основе трех различных матриц с эремомицином в функциональных слоях. Для этого через колонки (после их тестирования по всем модельным классам аналитов) непрерывно пропускали 10 л подвижной фазы, фиксировали времена удерживания полярных веществ различной природы (витаминов, азотистых оснований и нуклеозидов) через каждый 1 л элюента (рис. 75). Тестовые смеси аналитов подбирали индивидуально для каждого сорбента.

Максимальное изменение времен удерживания в процессе использования колонок С-Э, С<sub>А</sub>-Б-Э, П-2Б-Э составило 10%, для сильноудерживаемого гуанозина на колонке С<sub>А</sub>-Б-Э — 15%. В течение рассматриваемого времени пропускания элюента не отмечено значимых изменений селективности и эффективности для

всех неподвижных фаз. Таким образом, полученные сорбенты продемонстрировали достаточную стабильность в ходе эксплуатации.

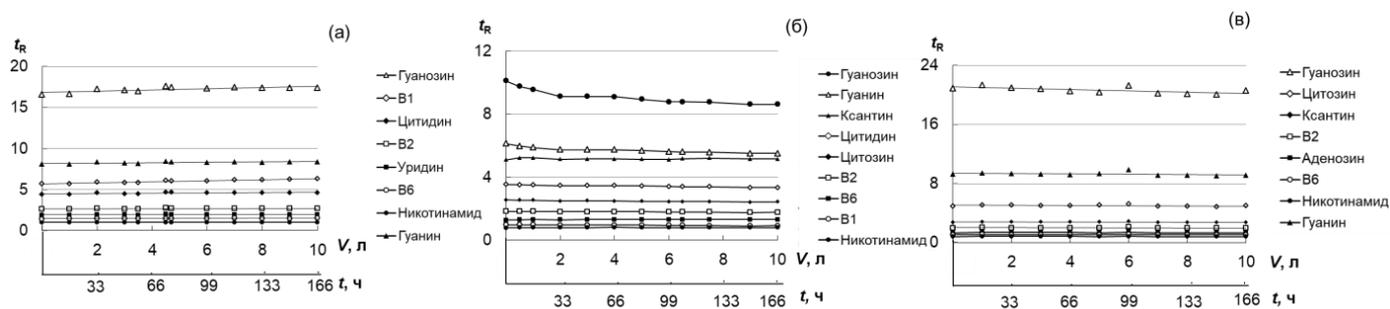


Рис. 75. Изменение времен удерживания полярных веществ в ходе эксплуатации колонок с сорбентами С-Э (а), С<sub>А</sub>-Б-Э (б), П-2Б-Э (в); подвижная фаза (а), (б): 100 мМ ААБ с рН 5.4—СН<sub>3</sub>CN (12 : 88 для сорбента С-Э, 10 : 90 для сорбента С<sub>А</sub>-Б-Э), подвижная фаза (в): 100 мМ АФБ (рН 3.0)—СН<sub>3</sub>CN (10:90%); УФ-детектирование при 270 нм; скорость потока 1 мл/мин.

Изучены три новые неподвижные фазы на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола для гидрофильной хроматографии, модифицированные гликопептидным антибиотиком эремومیцином. Показано, что использование антибиотика для создания новых гидрофильных функциональных слоев является перспективным подходом, поскольку приводит к увеличению гидрофильности поверхности разных типов матриц (силикагеля и ПС-ДВБ) и позволяет экранировать их заряд. Предложен способ закрепления эремومیцина с помощью спейсера 1,4-БДДГЭ, позволяющий сохранить высокую эффективность сорбентов, модифицированных макромолекулами. Полученные сорбенты на основе ПС-ДВБ являются многофункциональными и позволяют реализовывать режимы ГИХ, ОФ ВЭЖХ и хиральной хроматографии для определения и разделения как полярных, так и гидрофобных веществ, а также энантимеров благодаря наличию хирального селектора в функциональном слое.

## ГЛАВА 6. Сравнение способов конструирования слоев сорбентов

**Гидрофильность.** Сравнение гидрофильности фаз, полученных разными способами, и соответствующих матриц согласно тесту Танака приведено на рис. 76. Показано, что модифицирование матрицы по реакции Уги приводит к уменьшению или сохранению гидрофильности и в случае формирования мономерного, и в случае полимерного функциональных слоев. В свою очередь, использование эремомицина для создания новых гидрофильных функциональных слоев приводит к увеличению гидрофильности поверхности разных типов матриц: гидрофильность возрастает в 3 раза на сорбентах на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола. Таким образом, применение эремомицина является актуальным подходом для формирования слоя с высокой гидрофильностью, который можно использовать для разделения сильнополярных соединений.

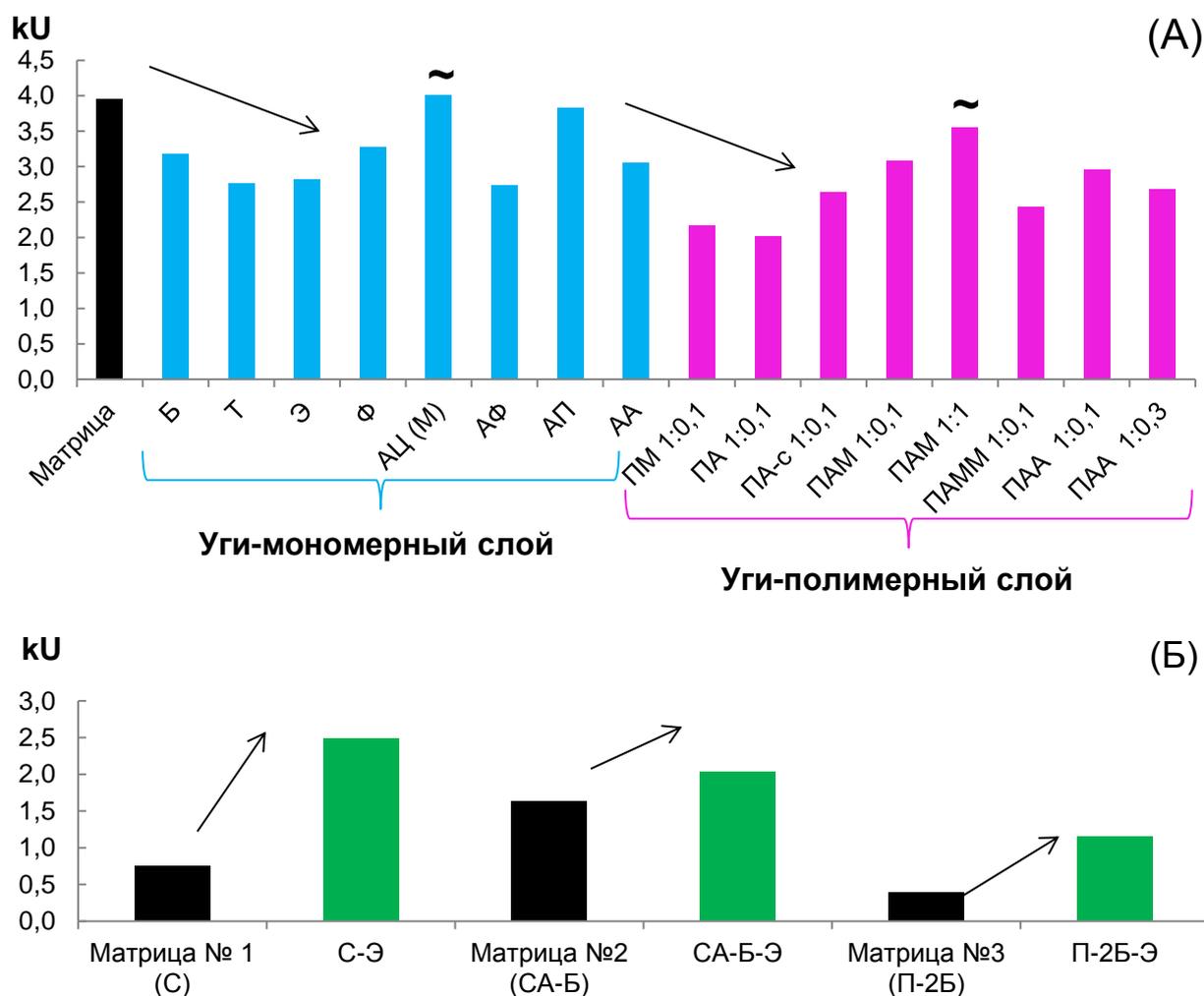


Рис. 76. Сравнение гидрофильности сорбентов, полученных в работе разными способами: по реакции Уги (А) и модифицированием эремомицином (Б), и соответствующих матриц. Получено в условиях, указанных в табл. 9.

**Эффективность.** Сравнение эффективности фаз, полученных разными способами, и соответствующих матриц на примере диаграмм эффективности по витаминам приведено на рис. 77. Значительное увеличение эффективности до 50% по сравнению с матрицей (до 60000 тт/м) на фазах, полученных по реакции Уги с мономерным функциональным слоем, для полярных веществ подтвердило перспективность формирования слоев с помощью данного подхода. Показано, что увеличить эффективность в случае полимерного функционального слоя, полученного по реакции Уги, можно за счет увеличения молекулярной массы используемого на стадии синтеза полимера. В то же время для сорбентов, модифицированных объемным эремомицином, отмечено значительное уменьшение эффективности практически по всем классам рассматриваемых соединений, на основе силикагеля и на основе полимерной матрицы (рис. 77). Однако, как было отмечено ранее, эффективность сорбентов на основе аминопропилсиликагеля сопоставима. Показано, что способ закрепления эремомицина с пространственным удалением слоя и повышенная степень экранирования гидрофильной матрицы благодаря наличию 1,4-БДДГЭ в качестве спейсера позволяют сохранить эффективность (до 40000 тт/м) при введении в слой молекул большого размера.

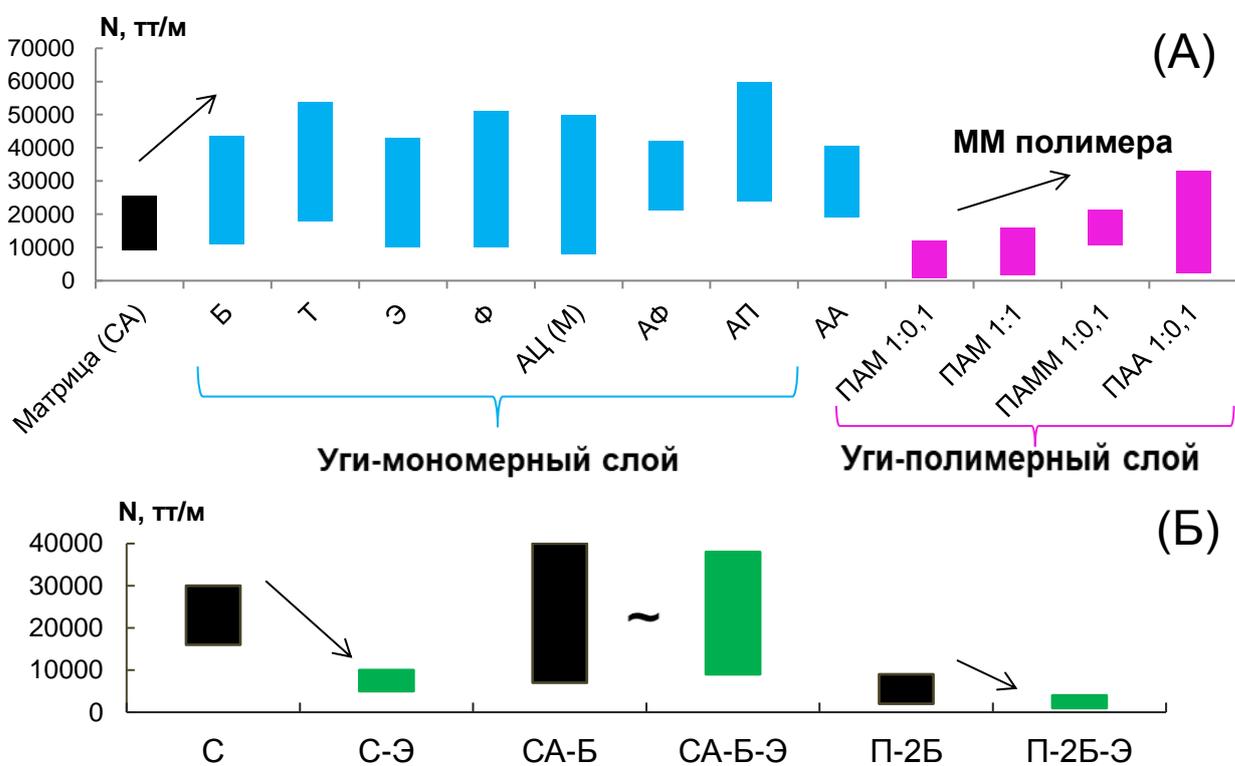


Рис. 77. Сравнение эффективности по витаминам для сорбентов, полученных в работе разными способами: по реакции Уги (А) и модифицированием эремомицином (Б), и для соответствующих матриц. Получено в условиях, указанных в табл. 9.

**Стабильность.** Сорбенты с эремомицином в слое продемонстрировали лучшую стабильность в ходе эксплуатации. После пропускания 10 л элюента не отмечено изменений времен удерживания, селективности и эффективности для всех неподвижных фаз. Сорбент, полученный по реакции Уги с мономерным слоем, продемонстрировал меньшую стабильность: после пропускания 5 л элюента не отмечено значимых изменений времен удерживания, однако наблюдали уменьшение эффективности в 2 раза. Меньшая стабильность данных фаз может быть связана с недостаточной стабильностью во времени непосредственно 3-аминопропилсиликагеля, представляющем матрицу (Глава 3). Однако, увеличить стабильность данной матрицы можно за счет формирования полимерного слоя по реакции Уги. Также сорбент в серии с эремомицином С<sub>А</sub>-Б-Э на основе этой же матрицы продемонстрировал отличную стабильность. Таким образом, показано, что, введение в слой полимерного соединения в первом случае и молекулы большого размера во втором — увеличивает стабильность слоя и уменьшает потерю привитых групп.

**Мультифункциональные возможности.** Показана возможность появления мультифункциональных возможностей при использовании полимерных веществ при соотношении матрица: полимер 1:0.1 по массе в случае сорбентов, полученным по клик-реакции Уги, а также на гидрофобной матрице ПС-ДВБ — для сорбентов, модифицированных антибиотиком.

**Особенные преимущества.** В работе продемонстрировано преимущество реакции Уги по сравнению с применением эремомицина для конструирования новых слоев — широкая вариативность последних. Изменение реагентов в реакции позволяет управлять свойствами неподвижной фазы, например, гидрофильностью и ионообменными селективностями. В свою очередь, использование эремомицина открывает возможность хирального разделения, что невозможно на вышеупомянутых сорбентах. Таким образом, каждый из подходов благодаря своим преимуществам можно использовать в зависимости от поставленных задач.

Лучшие фазы, полученные по реакции Уги, обеспечивают разделение **10** сахаров с эффективностью до  $20000\text{ }mm/m$ , **11** азотистых оснований и нуклеозидов, или **7** витаминов, **7** аминокислот, или **10** органических кислот с эффективностью до  $60000\text{ }mm/m$ . Лучшие сорбенты с эремомицином в слое обеспечивают разделение **9** азотистых оснований и нуклеозидов, или **7** витаминов, **6** аминокислот, или **6** органических кислот с эффективностью до  $40000\text{ }mm/m$ .

## ГЛАВА 7. Классификация свойств сорбентов

### 7.1. Электростатические взаимодействия

Для некоторых конкретных соединений, находящихся в ионной форме в условиях элюирования, например для ксантина, аскорбиновой и никотиновой кислот, преобладающий вклад вносят электростатические взаимодействия. Важно установить, возможно ли предсказать удерживание заряженных аналитов, основываясь на значениях ионообменных селективностей, когда условия элюирования, отличаются от условий теста.

Зависимость факторов удерживания витаминов кислотной природы от  $\alpha(AX)$ , полученная для 32 сорбентов на основе силикагеля, модифицированных эремомицином и полученных по реакции Уги, характеризуется коэффициентами корреляции для аскорбиновой кислоты  $r = 0.534$  и для никотиновой кислоты  $r = 0.832$ . Исключить вклад гидрофильных взаимодействий и увеличить значения корреляции зависимостей до  $r = 0.888$  и  $0.922$  соответственно удалось с помощью деления фактора удерживания витамина на фактор удерживания витамина  $B_2$  (рис. 78). Меньшая величина коэффициента корреляции ( $r$ ), наблюдаемая для аскорбиновой кислоты ( $0.888$ ), согласуется с участием различных механизмов ее удерживания, что позволяет ориентировочно прогнозировать ее удерживание. Таким образом, с помощью такого рода зависимостей можно ориентировочно предсказывать удерживание данных веществ, а также по предложенным параметрам оценивать анионообменную селективность фаз.

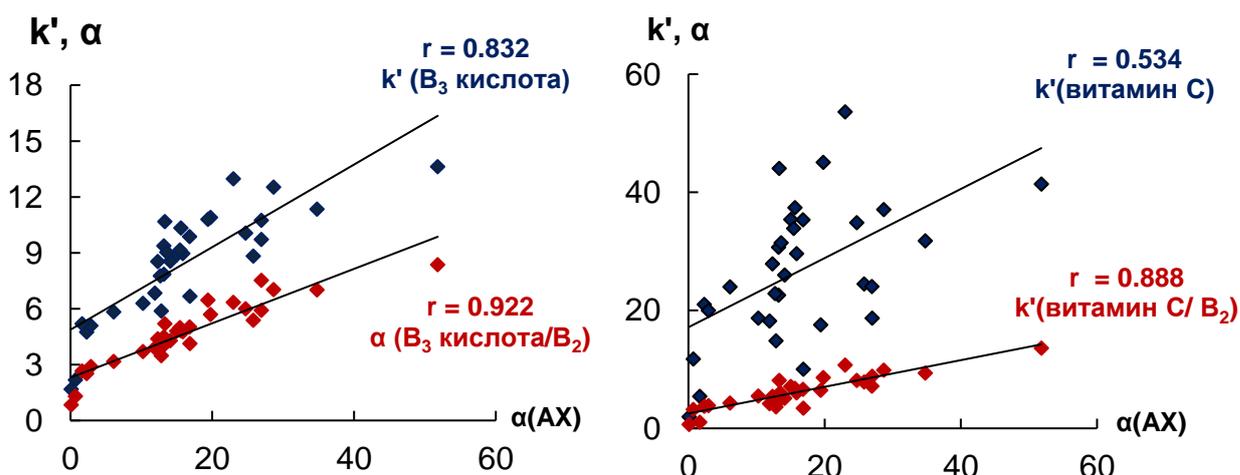


Рис. 78. Зависимость фактора удерживания никотиновой (слева) и аскорбиновой кислот (справа) или коэффициента селективности пар соответствующий витамин/витамин  $B_2$  от анионообменной селективности 32 полученных сорбентов.

В главах 3—5, на примере отдельных групп фаз, было показано, что в условиях элюирования, используемых в работе, удерживание органических кислот определяется в большей степени не ионообменной селективностью, а гидрофильностью фаз, что является, вероятно, следствием уменьшения анионообменной селективности при переходе от условий теста Танака (рН 4.7) к условиям разделения кислот (рН 7.0). Этот факт был подтверждён с помощью зависимости фактора удерживания винной кислоты от  $\alpha(\text{AX})$  и гидрофильности  $kU$ , соответственно, для 32 синтезированных сорбентов, а не только для групп фаз близкой функциональности (рис. 79). Показано, что в выбранных условиях разделения органические кислоты нельзя использовать для оценки ионообменной селективности: коэффициент корреляции факторов удерживания с  $\alpha(\text{AX}) = 0.110$ , а с гидрофильностью он равен 0.746.

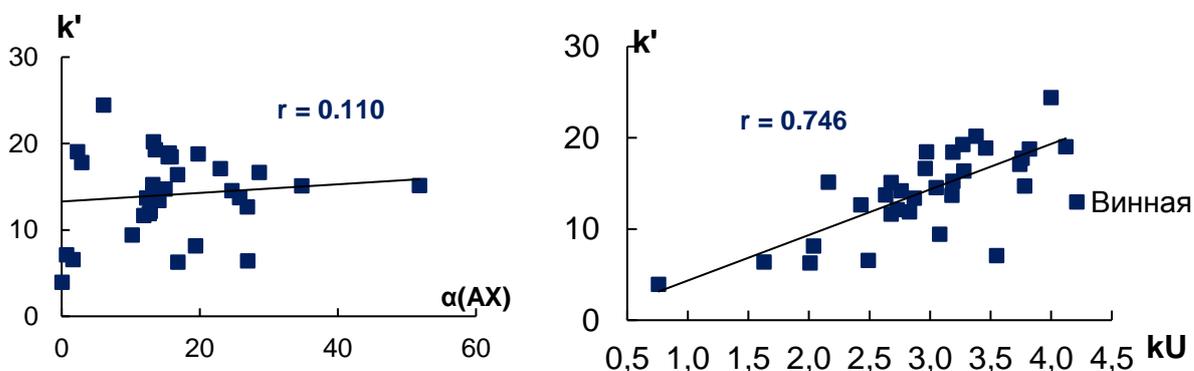


Рис. 79. Зависимость фактора удерживания винной кислоты от анионообменной селективности (слева) и от гидрофильности (справа) 32 полученных сорбентов на основе силикагеля, модифицированных по реакции Уги и эремомицином.

## 7.2. Сравнение с коммерчески доступными колонками

Для сравнения синтезированных сорбентов с коммерчески доступными фазами использовали полученные данные теста Танака для собственных и коммерчески доступных колонок, взятые из работ [116, 124], где предложено разделить сорбенты на три группы: силикагель, модифицированный полимерами, силикагель, модифицированный малыми полярными фрагментами и сорбенты на основе полимерных матриц. Чтобы сравнить хроматографические характеристики представленных в работе колонок с имеющимися коммерческими, значения ( $T_b/T_r$ ) для всех колонок были построены в зависимости от соответствующих значений  $\alpha(\text{OH})$  (рис. 80), также построены зависимости  $\alpha(\text{OH}) - k(U)$  (рис. 81). Параметр  $\alpha(\text{OH})$  согласно [116] характеризует способность фаз адсорбировать слой воды на поверхности, а также его можно использовать для оценки гидрофильности.

Синтезированные в работе сорбенты имеют бóльшие значения  $\alpha(\text{OH})$  по сравнению с различными коммерчески доступными сорбентами. Разработанные фазы демонстрируют основные свойства ( $\alpha(\text{Tb/Tr}) < 1$ ). Можно выделить область, в которой находятся фазы, полученные с использованием полимерных кислот. При этом значения  $\alpha(\text{OH})$  сопоставимы с таковыми для коммерческих сорбентов, модифицированных полимерными соединениями, однако, полученные сорбенты ожидаемо демонстрируют меньшие значения  $\alpha(\text{Tb/Tr})$  и дополняют собой малочисленный круг основных неподвижных фаз.

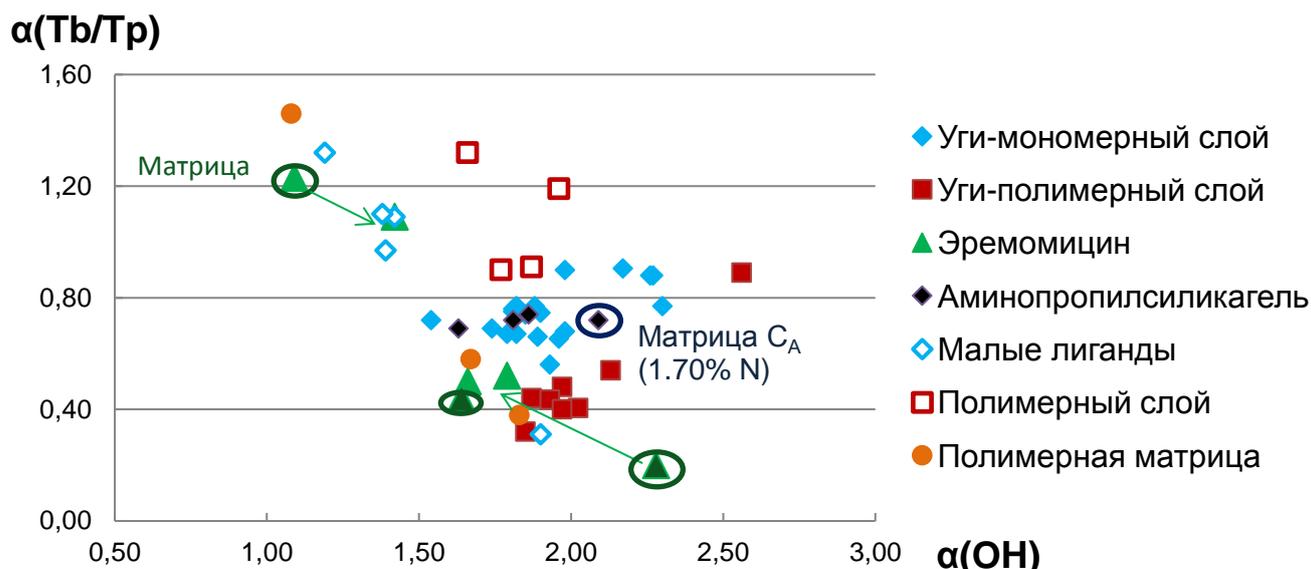


Рис. 80. График зависимости  $\alpha(\text{Tb/Tr})$  —  $\alpha(\text{OH})$  для гидрофильных неподвижных фаз.

При сравнении синтезированных амидных фаз, полученных по реакции Уги с мономерными слоями, с коммерческими амидными фазами можно сделать вывод о том, что  $\alpha(\text{OH})$ -селективность для сорбентов, полученных в данной работе, больше. Важно отметить, что и гидрофильность данных фаз значительно выше таковых величин среди коммерческих фаз. Все сорбенты, синтезированные в рамках данной работы с использованием полимерных соединений, расположены практически в одной области с коммерчески доступными фазами с полимерным слоем, значения  $\alpha(\text{OH})$  и  $k(\text{U})$  сопоставимы. Сорбенты, полученные модифицированием эремомицином, несмотря на существенное изменение свойств соответствующих матриц, демонстрируют меньшие значения  $\alpha(\text{OH})$  и  $k(\text{U})$  по сравнению с таковыми, полученными по реакции Уги, и располагаются в области

коммерческих сорбентов с «малыми лигандами». В целом, все синтезированные фазы конкурентоспособны по данным показателям  $\alpha(\text{OH})$  и  $k(\text{U})$ .

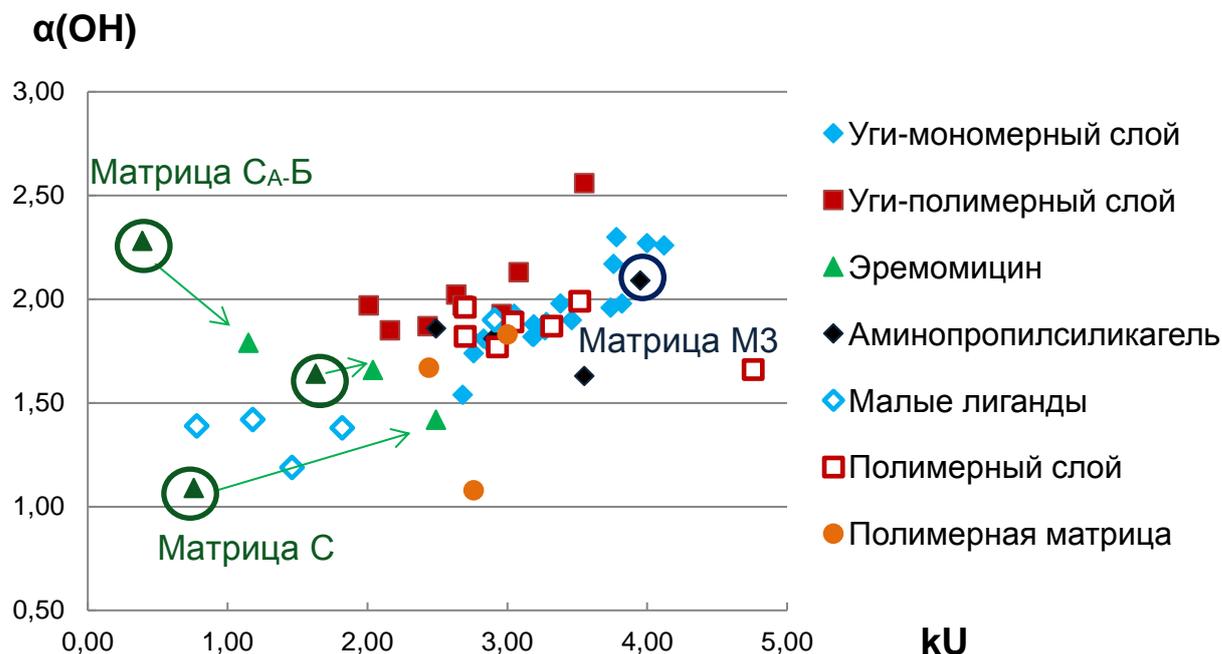


Рис. 81. График зависимости  $\alpha(\text{OH})$  —  $k(\text{U})$  для гидрофильных неподвижных фаз.

Важно отметить, что синтезированные фазы по сравнению с коммерчески доступными обладают значительной анионообменной селективностью, и могут дополнить круг основных неподвижных фаз, представляющих собой в основном катионообменники. Это продемонстрировано с помощью графика зависимости анионообменной селективности от кислотно-основной природы гидрофильных фаз (рис. 82). Полученные фазы демонстрируют значительно бóльшие значения  $\alpha(\text{AX})$  по сравнению с доступными сорбентами: немодифицированным силикагелем (Hypersil GOLD Silica), диольными (LiChrospher Diol), амидными (SunShell HILIC-Amide, Amide-80, Acquity™ UPLC BEH Amide), цвиттер-ионными (ZIC-HILIC) и даже аминофазами (Sugar-D, NH<sub>2</sub>-MS, COSMOSIL HILIC), которые обладают самой большой анионообменной селективностью среди коммерческих фаз. Кроме того, значения анионообменной селективности синтезированных фаз лежат в большом диапазоне от 0.70 до 51.8: как было показано ранее, с помощью предложенных способов конструирования функциональных слоев можно управлять ионообменными свойствами неподвижных фаз.

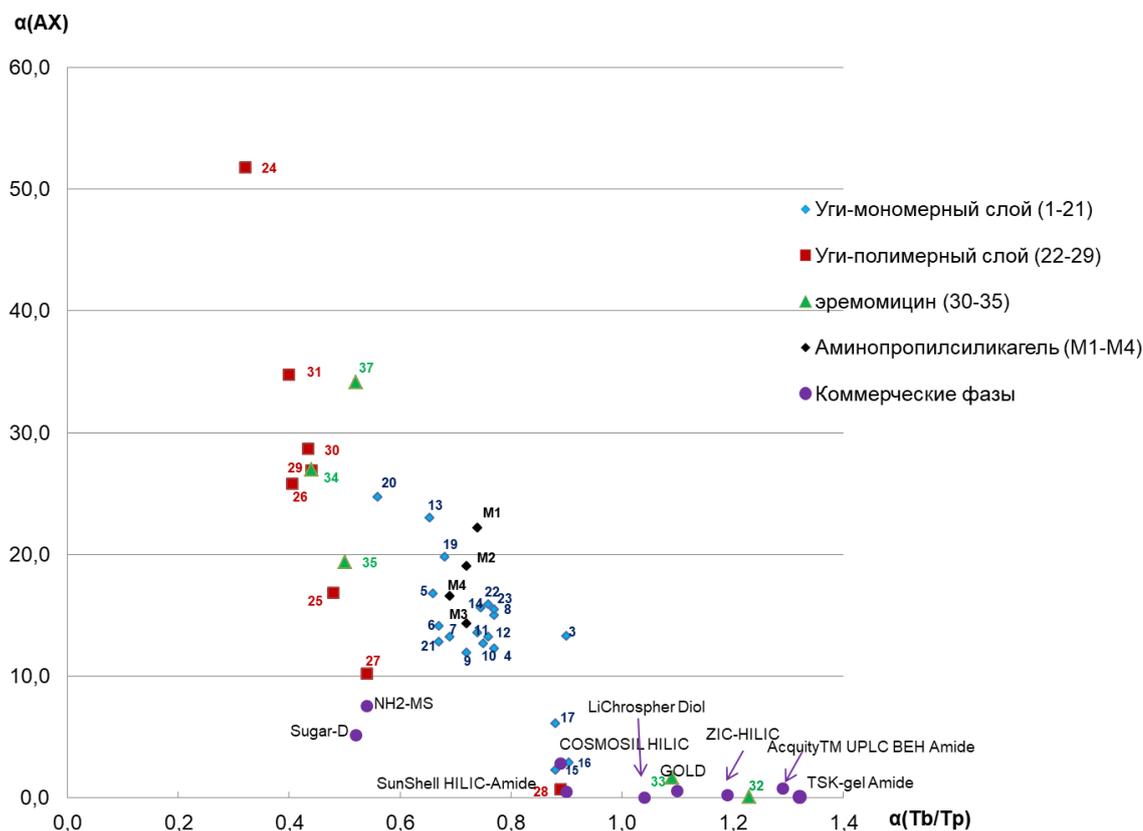


Рис. 82. График зависимости  $\alpha(Ax)$  —  $\alpha(Tb/Tr)$  для гидрофильных неподвижных фаз. Нумерация сорбентов указана в табл. 7, 8.

Общее описание свойств сорбентов позволило продемонстрировать корреляцию удерживания индивидуальных аналитов с гидрофильными и анионообменными свойствами неподвижных фаз. Значимый вклад электростатических взаимодействий для аскорбиновой и никотиновой кислот приводил к существенному увеличению их факторов удерживания при возрастании анионообменной селективности сорбента.

*Сравнение разделяющей способности с коммерческими колонками.* Для оценки преимуществ разработанных гидрофильных сорбентов провели сравнение с коммерчески доступными аналогами, обладающими на сегодняшний день лучшей разделяющей способностью в отношении полярных веществ. На рис. 83 и рис. 84 представлены хроматограммы смесей полярных соединений с наибольшим количеством разделенных аналитов в рамках одного класса из открытых источников по практическому применению коммерческих колонок с размером частиц сорбентов 5 мкм и хроматограммы, полученные в работе. Аминофазы традиционно используют для разделения сахаров. Так, на коммерчески доступной колонке Luna NH<sub>2</sub> (25 см) возможно разделение 7 углеводов за 10 минут с эффективностью до 5000 тт/м (рассчитано с помощью программы Webplotdigitizer),

разделение пары мальтоза/лактоза не продемонстрировано. На разработанных фазах со слоями, сформированными по реакции Уги, возможно разделение до 10 углеводов за 10-20 минут с разделением критической пары мальтоза/лактоза и эффективностью до 20000 тт/м. На сорбенте YMC-Triart Diol-HILIC с диольными группами показано разделение 6 азотистых оснований и нуклеозидов за 11 минут с эффективностью до 25000 тт/м. На синтезированных фазах эффективность в ряде случаев значительно выше (до 50000 тт/м по анализам данных классов) и продемонстрировано разделение их большего количества: например, на фазе АП возможно разделение 10 анализов, на фазе с эремомицином С<sub>А</sub>-Б-Э — 9 веществ за 12 минут. Вышеупомянутая фаза YMC-Triart Diol-HILIC обеспечивает разделение 11 витаминов и родственных веществ за 16 минут, по витаминам эффективность выше, чем по азотистым основаниям и нуклеозидам и составляет до 65000 тт/м. Однако, полученные по реакции Уги фазы, например, АП, АЦ не уступают по эффективности данной колонке. В работе продемонстрировано разделение 7 водорастворимых витаминов за 8-20 минут с эффективностью до 60000 тт/м. В открытых источниках можно найти разделение небольшого числа органических кислот в режиме ГИХ. Так, на цвиттер-ионной колонке Eurospher II 100-5 HILIC приведено разделение 5 кислот за 7 минут с эффективностью до 10000 тт/м. В свою очередь на полученных в работе фазах возможно разделение 10 кислот с эффективностью до 40000 тт/м (рис. 84).

Разделение большого количества анализов с лучшей эффективностью по сравнению с разработанными фазами можно найти для ультра-ВЭЖХ сорбентов с размером частиц меньше 5 мкм (рис. 85). Так, колонка Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z с размером частиц сорбента 2.7 мкм демонстрирует разделение 11 углеводов за 7 минут с эффективностью и 10 органических кислот за 4 минуты с эффективностью до 45000 тт/м. На фазе HILIC-Fusion с размером частиц сорбента 3.5 мкм возможно разделение 14 аминокислот за 20 минут с эффективностью до 70000 тт/м. Тем не менее, по количеству разделяемых веществ внутри одного класса полученные фазы не уступают даже сорбентам для ультра-ВЭЖХ. Например, в данной работе в главе 9 будет показано разделение 16 аминокислот с эффективностью до 25000 тт/м на сорбенте М(АЦ) при использовании масс-спектрометрического детектора. Важно подчеркнуть, что разработанные способы модифицирования можно применить к частицам меньшего диаметра, что может привести к улучшению разделяющей способности фаз.

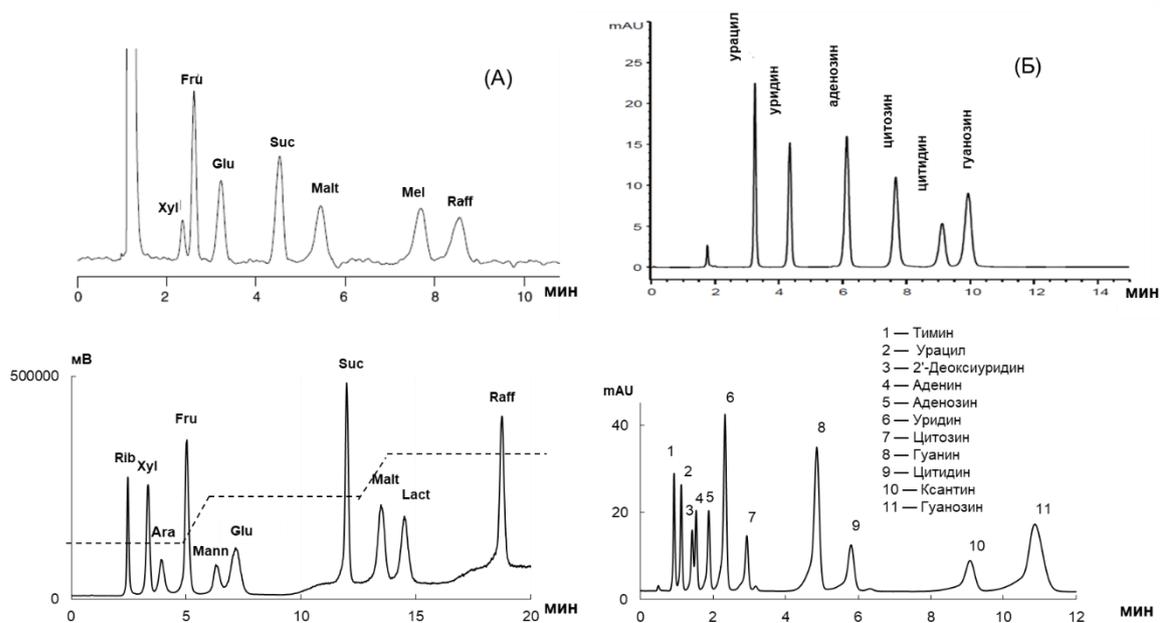


Рис. 83. Хроматограммы сахаров (А) и азотистых оснований и нуклеозидов (Б) на коммерчески доступных (сверху) и разработанных фазах. (А): Luna NH<sub>2</sub> (250×4.6 мм, 5 мкм), ПФ: CH<sub>3</sub>CN – H<sub>2</sub>O (80:20%), 3 мл/мин, рефрактометрическое детектирование. Фаза Эм. Условия разделения указаны в табл. 9. (Б): YMC-Triart Diol-NILIC (сверху) (150×3.0 мм, 5 мкм), ПФ: 100 мМ ААБ - CH<sub>3</sub>CN (10:90%), 0.425 мл/мин, λ<sub>П</sub>= 254 нм. Фаза АП. Условия разделения указаны в табл. 9.

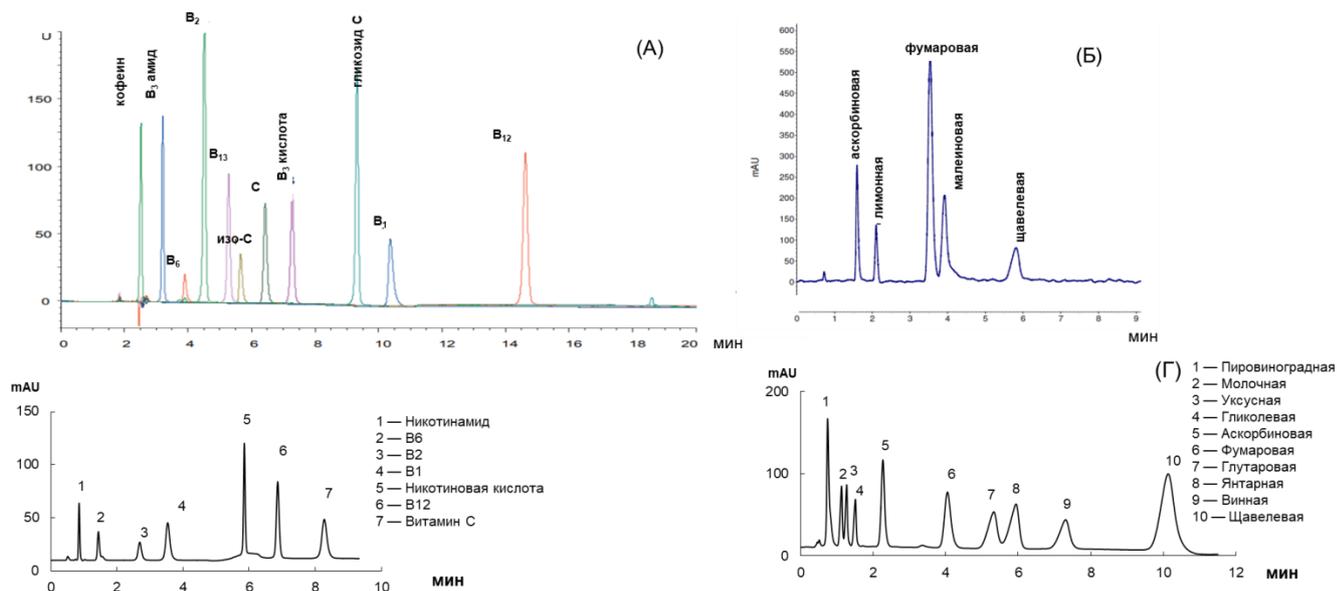


Рис. 84. Хроматограммы витаминов (А) и органических кислот (Б) на коммерчески доступных (сверху) и разработанных фазах (снизу). (А): YMC-Triart Diol-NILIC, (150×3.0 мм, 5 мкм), ПФ: 10 мМ АФБ (рН 3.6) – CH<sub>3</sub>CN, градиентный режим, 0.425 мл/мин, λ<sub>П</sub>= 254 нм. Фаза АФ. Условия разделения указаны в табл. 9. (Б): Eurospher II 100-5 NILIC, ПФ: 200 мМ ААБ (рН 6.8) - CH<sub>3</sub>CN (30:70%), 1 мл/мин, λ<sub>П</sub>= 210 нм. Фаза АА. Условия разделения указаны в табл. 9.

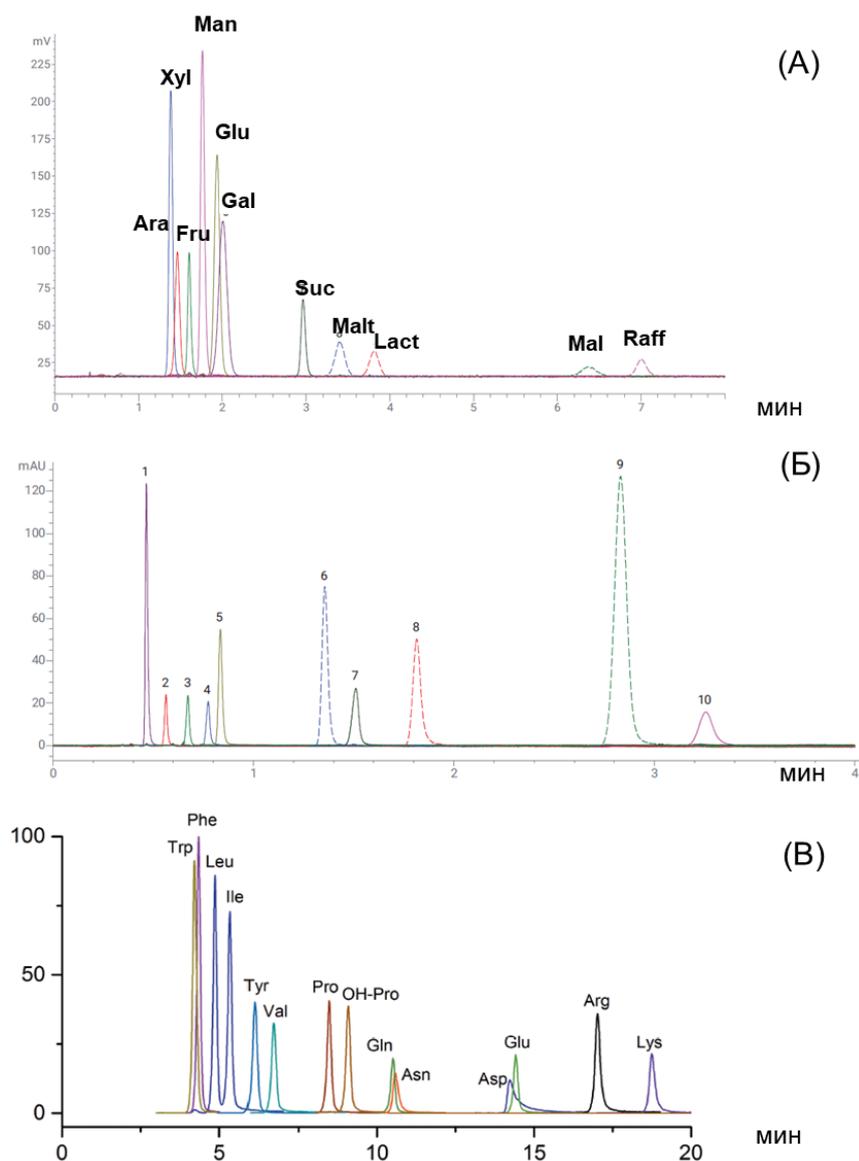


Рис. 85. Хроматограмма смеси сахаров. (А): Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z (2.1×100 мм, 2.7 мкм), ПФ: 0.3% гидроксид аммония - CH<sub>3</sub>CN (20:80%), скорость потока 1 мл/мин, детектирование по светорассеянию. Хроматограмма смеси органических кислот. (Б): Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z (2.1×100 мм, 2.7 мкм), ПФ: 30 мМ фосфат натрия + фосфорная кислота (рН 6.7) - CH<sub>3</sub>CN (30:70%), скорость потока 0.5 мл/мин, УФ-детектирование при 214 нм, 1 – сорбиновая, 2 – масляная, 3 – молочная, 4 – уксусная, 5 – С, 6 – фумаровая, 7 – янтарная, 8 – щавелевая, 9 – аконитовая, 10 – лимонная. Хроматограмма смеси аминокислот. (В): HILIC-Fusion (2.1×150 мм, 3.5 мкм), ПФ: 1 М ААБ (рН 5.75) — CH<sub>3</sub>CN, градиентное элюирование, скорость потока 0.3 мл/мин, МС-детектирование.

Таким образом, можно сделать вывод, что синтезированные гидрофильные сорбенты не уступают по хроматографическим параметрам коммерчески доступным колонкам, также в отдельных случаях превосходят их по селективности и эффективности и могут дополнить собой круг основных неподвижных фаз.

## ГЛАВА 8. Изучение механизмов удерживания

В работе также дополнительно были изучены механизмы удерживания ряда веществ для упрощения выбора условий их разделения на полученных сорбентах, особенно при анализе объектов. Изучение механизма удерживания **аминокислот** на сорбенте Мэ4 показало, что при содержании водной доли в элюенте от 15 до 35 об.% при 0.35 мМ фосфатного буферного раствора (ФБ) вклад в удерживание аминокислот вносит и распределительный, и адсорбционный механизм (табл. 28).

Таблица 28. Уравнения и коэффициенты корреляции зависимостей факторов удерживания аминокислот от доли водной части (0.35 мМ ФБ, рН 6.5), от концентрации ФБ (доля ацетонитрила 80 об.%), сорбент Мэ4

Вещество	$\lg k' = a \cdot w + b$			$\lg k' = a \cdot \lg(w) + b$			$\lg k' = a \cdot \lg C + b$	
	a	b	R	a	b	r	a*	r
Phe	-3.52	1.29	0.991	-1.93	-0.79	0.999	—	—
Met	-3.88	1.55	0.994	-2.13	-0.74	0.999	0.11	0.977
Tyr	-4.28	1.71	0.991	-2.35	-0.82	0.999	0.08	0.957
Pro	-4.35	1.85	0.992	-2.39	-0.72	0.999	0.14	0.982
Asn	-4.92	2.29	0.998	-2.68	-0.61	0.998	0.32	0.979
Ser	-5.39	2.55	0.997	-2.94	-0.62	0.999	0.35	0.982
Ala	-5.71	2.59	0.994	-3.12	-0.78	0.999	0.23	0.981

Для оценки вклада электростатических взаимодействий были изучены зависимости факторов удерживания от концентрации буферного раствора (0.25 — 2.5 мМ). Полученная билогарифмическая зависимость имеет два участка (рис. 86): от 0.25 до 0.75 мМ факторы удерживания аминокислот не зависят от концентрации элюирующего иона, тогда как при увеличении концентрации от 0.75 до 2.5 мМ наблюдается рост факторов удерживания аминокислот. Возрастание, вероятно, связано с увеличением толщины приповерхностного водного слоя, в который предпочтительнее переходят гидратированные фосфат-ионы, являющиеся космотропами, что, как следствие, приводит к увеличению удерживания полярных аналитов.

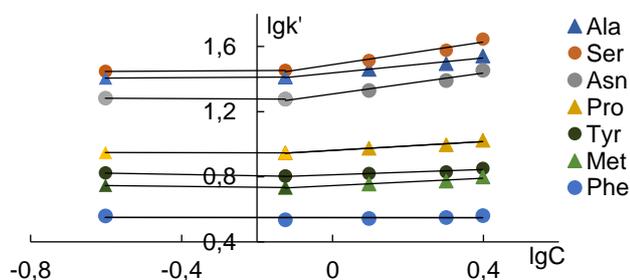


Рис. 86. Влияние концентрации буферного раствора на факторы удерживания аминокислот. Условия: сорбент Мэ4, подвижная фаза ФБ рН 6.5/CH<sub>3</sub>CN 20/80 об.%. Диапазон концентраций буферного раствора в элюенте 0.25-2.5 мМ.

Изучение механизмов удерживания *азотистых оснований и нуклеозидов* на сорбенте М (АЦ) показывает, что для всех соединений реализуется и распределительный и адсорбционный механизм (табл. 29). Уравнение билогарифмической зависимости фактора удерживания ксантина от концентрации ААБ (1-5 мМ) имеет вид  $y = -0.51x + 1.13$ . Угловой коэффициент (-0.51) говорит о значительном вкладе электростатических взаимодействий в удерживании данного анализа.

Таблица 29. Уравнения и коэффициенты корреляции зависимостей факторов удерживания от доли водной части в ПФ (концентрация ААБ 2 мМ, рН 4.7), сорбент М (АЦ)

Вещество	$\lg k' = a \cdot w + b$			$\lg k' = a \cdot \lg w + b$		
	a	B	r	a	b	r
Тимин	-0.02	0.09	0.906	-0.47	-0.54	0.946
Тимидин	-0.03	0.41	0.967	-0.84	-0.72	0.988
Урацил	-0.02	0.25	0.988	-0.52	-0.46	0.999
Уридин	-0.04	0.97	0.995	-1.19	-0.65	0.998
Аденин	-0.04	0.77	0.987	-1.13	-0.76	0.998
Аденозин	-0.04	0.95	0.993	-1.27	-0.77	0.998
Цитозин	-0.05	1.17	0.996	-1.35	-0.66	0.999
Цитидин	-0.06	1.70	0.996	-1.84	-0.80	0.999
Гуанин	-0.06	1.61	0.992	-1.86	-0.91	0.999
Гуанозин	-0.08	2.09	0.993	-2.34	-1.08	0.999
Ксантин	-0.04	1.45	0.996	-1.23	-0.22	0.991

В работе изучали удерживание *гербицидов и фосфоновых кислот*. Сначала проводили разделение на сорбенте Бэ и пробовали использовать 0.5% муравьиную кислоту в качестве водной составляющей, содержание которой варьировали от 20 до 40%. Факторы удерживания ряда веществ оставались большими, а форма пика неудовлетворительной. Поэтому в качестве условий разделения данных анализов выбрали следующий состав подвижной фазы: 100 мМ аммонийно-формиатный буферный раствор — ацетонитрил. Далее варьировали рН буферного раствора и долю водной фазы в элюенте. Необходимо отметить, что гербициды являются двухосновными кислотами (этефон, метилфосфинопропионовая кислота) с  $pK_{a1} < 2.7$  и аминокислотами (аминометилфосфоновая кислота, глюфосинат и глифосат). Уменьшение рН с 5.5 до 4.0 привело к уменьшению их отрицательного заряда и удерживания на фазах с значительной анионообменной селективностью. Так, фактор удерживания аминометилфосфоновой кислоты на сорбенте Бэ при уменьшении рН с 5.5 до 4.0 (100 мМ АФБ/ацетонитрил 60/40 об.%) уменьшился с 15.05 до 3.56. Также при рН 5.5 форма пика многих анализов являлась неудовлетворительной, однако при рН 4.0 для большинства веществ она

существенно улучшилась. Для гидрофильных фосфоновых кислот показана реализация как распределительного, так и адсорбционного механизмов (табл. 30), тогда как для менее гидрофильных этефона, *трет*-бутил- и бутилфосфоновой кислот вклад распределительного механизма отсутствует. Показан значительный вклад электростатических взаимодействий для всех веществ (табл. 30).

Таблица 30. Уравнения и коэффициенты корреляции зависимостей факторов удерживания гербицидов и фосфоновых кислот от доли водной части (120 мМ АФБ, рН 4.0), и от концентрации АФБ (рН 4.0), сорбент Бэ

Вещество	$\lg k' = a \cdot w + b$			$\lg k' = a \cdot \lg(w) + b$			$\lg k' = a \cdot \lg C + b$	
	a	b	R	a	b	r	a*	r
АМРА	-0.03	1.80	0.998	-3.29	5.96	0.997	-1.06	0.988
GLU	-0.02	1.74	0.995	-2.13	4.44	0.999	-0.89	0.999
МРРА	-0.01	1.57	0.997	-1.01	2.87	0.999	-1.57	0.992
ГУРН	-0.02	2.13	0.998	-2.36	5.18	0.998	-1.46	0.999
ЕТН	-0.004	0.68	0.992	-0.47	1.27	0.983	-1.04	0.999
t-BPA	-0.004	0.73	0.996	-0.54	1.41	0.989	-1.15	0.995
BPA	-0.003	0.64	0.988	-0.34	1.07	0.987	-1.25	0.994
МСАА	—	—	—	—	—	—	-0.78	0.999
ДСАА	—	—	—	—	—	—	-0.70	0.994
ТСАА	—	—	—	—	—	—	—	—
МВАА	—	—	—	—	—	—	-0.78	0.999
ДВАА	—	—	—	—	—	—	-0.72	0.998

\* a – для уравнения  $\lg k' = a \cdot \lg C + b$ , при концентрации буферного раствора 40 - 120 мМ в элюенте

Сравнение удерживания данных аналитов на сорбентах, характеризующихся различными параметрами гидрофильности и анионообменной селективности (рис. 87), показывает, что факторы удерживания соединений больше на более гидрофильном сорбенте Фэ4Ка, чем на сорбенте Тэ4 при одинаковой анионообменной селективности  $\alpha(\text{АХ}) = 14$ . При этом факторы удерживания также больше на сорбенте Фэ4Ка с большей  $\alpha(\text{АХ})$  по сравнению с Бэ при близкой гидрофильности.

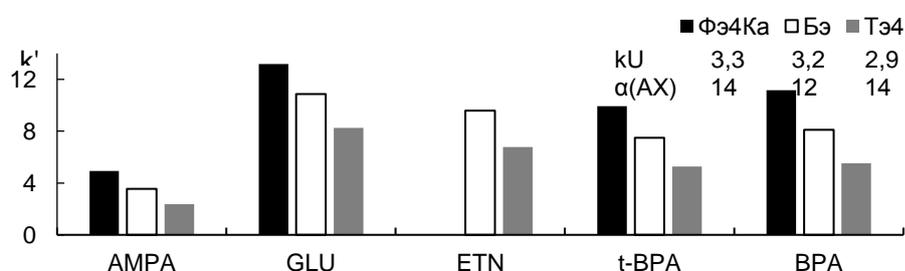


Рис. 87. Сравнение факторов удерживания АМРА, GLU, ЕТН, t-BPA, BPA на сорбентах Фэ4Ка, Бэ, Тэ4. Условия: 100 мМ АФБ рН 4.0 / ацетонитрил 60/40 об.%, скорость потока 1 мл/ мин, рефрактометрическое детектирование.

Таким образом, увеличение удерживания гербицидов и фосфоновых кислот происходит при уменьшении концентрации буферного раствора, увеличении рН, увеличении гидрофильности и анионообменной селективности сорбента. Для разделения всех изучаемых в работе соединений данной группы на полученных фазах требуются высокие концентрации буферного раствора (~100 мМ) при высокой доле водной составляющей (более 30 об.%), что в первую очередь связано с значительными анионообменными свойствами неподвижных фаз.

**Галогенуксусные кислоты** в выбранных условиях диссоциированы полностью, существенный вклад в их удерживание вносят электростатические взаимодействия (табл. 30), что подтверждено угловыми коэффициентами зависимостей. Увеличение содержания водной составляющей в подвижной фазе от 30 до 90 об.% приводит к увеличению факторов удерживания дихлор-, дибромуксусной и трихлоруксусной кислот, тогда как удерживание монохлор- и монобром-производных уксусной кислоты остаётся практически постоянным, при этом происходит уменьшение селективности для кислот, содержащих один и тот же галоген (рис. 88). Такое поведение может быть связано с реализацией гидрофобных взаимодействий для ди- и тригалогенуксусных кислот при низком содержании ацетонитрила. Стоит отметить, что природа галогена практически не влияет на удерживание кислоты на данном сорбенте. Показано существенное увеличение факторов удерживания на более гидрофильном сорбенте ФЭ4Ка ( $k_U = 3.3$ ,  $\alpha(AX) = 14$ ) по сравнению с ТЭ4 ( $k_U = 2.9$ ,  $\alpha(AX) = 14$ ): например, фактор удерживания монохлоруксусной кислоты возрастает с 4.6 на ТЭ4 до 7.1 на ФЭ4Ка.

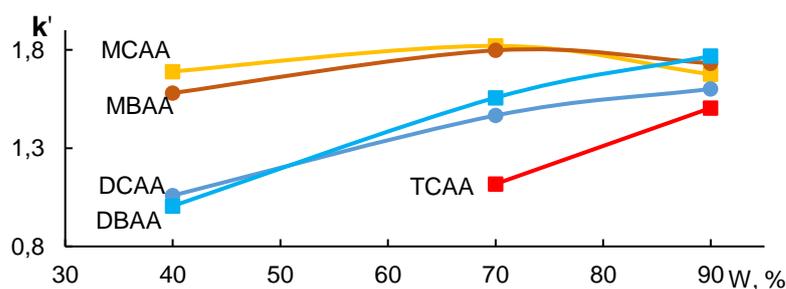


Рис. 88. Зависимость факторов удерживания галогенуксусных кислот от доли водной составляющей в подвижной фазе.

Таким образом, установлено, что на удерживание галогенуксусных кислот влияют анионообменные свойства и гидрофильность неподвижной фазы: удерживание увеличивается при использовании гидрофильного сорбента с высокой анионообменной селективностью, а также при уменьшении концентрации буферного раствора, увеличении доли водной составляющей в элюенте.

## ГЛАВА 9. Анализ реальных объектов

Для анализа реальных объектов были выбраны сорбенты, полученные по реакции Уги с мономерным функциональным слоем, характеризующиеся наибольшей селективностью и эффективностью по сравнению с фазами, модифицированными эремомицином, по рассматриваемым полярным соединениям. Фаза Эм, позволяющая разделить до базовой линии пару мальтоза/лактоза, демонстрирующая хорошее разрешение пары манноза/глюкоза и обладающая эффективностью до 12000 тт/м, была выбрана для определения сахаров в напитках. Фазы Ээ4Ка и АП были выбраны для разделения и определения водорастворимых витаминов в различных объектах, поскольку обладают высокой эффективностью и селективностью по данному классу соединений – до 55000 тт/м и до 60000 тт/м, соответственно. Сорбент Фэ4Ка, благодаря высокой эффективности и по витаминам, и по аминокислотам, достигающей 50000 тт/м, использовали для одновременного определения веществ данных классов. Согласно существующей фармакопейной статье по определению выбранного препарата на основе нуклеозида, фактор симметрии  $A_s$  пика вещества должен быть не менее 0.8 и не более 1.5, поэтому была выбрана фаза АА с лучшей симметрией пиков ( $A_s$  1.2 — 1.5) для данных веществ и эффективностью по азотистым основаниям и нуклеозидам до 40000 тт/м. Для изучения кинетики ферментативной реакции расщепления нуклеозида до соответствующего азотистого основания важным параметром стало время разделения уридина — субстрата — и урацила, представляющего продукт ферментативной реакции. Фаза Мэ была выбрана для данной задачи, поскольку позволяла экспрессно разделить пару урацил/уридин всего за 2 минуты с эффективностью до 20000 тт/м. Для определения большого количества аминокислот в почве без дериватизации применили самую гидрофильную разработанную фазу М (АЦ). Аминокислоты разделяли в режиме гидрофильной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Существенная гидрофильность сорбента позволила достичь наибольших времен удерживания аминокислот при высокой эффективности сорбента и хорошей симметрии пиков ( $A_s$  0.8 — 1.0), что было важно при переходе на подвижную фазу, совместимую с масс-спектрометрическим детектированием, в связи с необходимостью использовать летучие буферные растворы.

Применимость разработанных фаз к анализу реальных объектов была показана на примере определения углеводов, аминокислот и витаминов, азотистых оснований и нуклеозидов в БАД, препаратах и напитках (кофе, вино, тонизирующий напиток, детоксикационный кисель), а также аминокислот в почве. Во всех случаях пределы обнаружения рассчитывали по формуле:  $c_{\text{мин}} = \frac{3h_{\text{фона}}}{H} \cdot c$  (где  $h_{\text{фона}}$  – высота флуктуации аналитического сигнала фона,  $H$  – высота пика при данной концентрации  $c$ ). Вещества в исследуемых образцах идентифицировали сопоставлением их времен удерживания с временами удерживания компонентов в стандартных растворах. Для определяемых сахаров, аминокислот, витаминов, азотистых оснований и нуклеозидов получили градуировочные зависимости, диапазоны концентраций выбрали, исходя из предполагаемого содержания в объектах анализа. Метрологические характеристики определения представлены в единой табл. 31. Применимость разработанных фаз и предложенных способов определения веществ оценивали сравнением заявленных производителем и найденных содержаний, правильность – методом «введено-найдено».

### 9.1. Определение углеводов в кофе и вине

На сорбенте Эм провели определение сахаров в напитках: растворимом кофе Nescafe Gold Cappuccino и красном сухом вине Gran Marques Reserva в режиме градиентного элюирования с использованием испарительного детектора по светорассеянию, что позволило реализовать градиентное элюирование. Для разделения углеводов до базовой линии использовали условия градиентного элюирования, выбранные в главе 4. При анализе вина, содержащего этиловый спирт, долю воды на каждой ступени градиента понизили на 2%.

В результате анализа в вине определили фруктозу и глюкозу, а в растворимом кофе — сахарозу и лактозу, что характерно для сладкого продукта с добавлением молока. В пробу вина вводили добавки 9 сахаров по 294 мг/л, в пробу кофе — добавки 10 сахаров по 100 мг/л. Хроматограммы изучаемых объектов и хроматограммы с добавками приведены на рис. 89. Найденные количества сахаров согласуются с введёнными, что подтверждает применимость способа определения сахаров и разработанного сорбента к анализу реальных объектов (табл. 32).

Таблица 31. Метрологические характеристики определения веществ разных классов ( $P = 0.95$ ;  $n = 3$ )

Сорбент	Вещество	Диапазон линейности, мг/л	$S_r^*$	$C_{мин},$ мг/л	$a^{**}$	$r$
Эм	Рибоза	50 — 800	0.03	7	$6 \cdot 10^3$	0.996
	Ксилоза	50 — 800	0.04	8	$8 \cdot 10^3$	0.995
	Арабиноза	50 — 800	0.16	20	$4 \cdot 10^3$	0.992
	Фруктоза	50 — 1000	0.05	5	$13 \cdot 10^3$	0.995
	Манноза	50 — 800	0.21	35	$5 \cdot 10^3$	0.991
	Глюкоза	50 — 1000	0.22	20	$11 \cdot 10^3$	0.989
	Сахароза	50 — 800	0.06	20	$14 \cdot 10^3$	0.998
	Мальтоза	50 — 800	0.25	26	$11 \cdot 10^3$	0.995
	Лактоза	50 — 800	0.30	25	$9 \cdot 10^3$	0.994
	Раффиноза	50 — 800	0.04	30	$14 \cdot 10^3$	0.998
Ээ4Ка	Кофеин	2 — 38	0.01	0.01	0.89	0.999
	В <sub>3</sub> амид	1 — 20	0.02	0.04	0.31	0.999
	В <sub>6</sub>	0.15 — 15	0.01	0.03	0.25	0.999
	В <sub>2</sub>	0.1 — 5	0.01	0.03	1.65	0.999
	В <sub>1</sub>	1 — 4	0.04	0.2	0.38	0.997
	В <sub>3</sub> к-та	1.5 — 30	0.02	0.2	0.35	0.999
	Витамин С	7.5 — 150	0.02	0.01	1.57	0.999
АП	В <sub>3</sub> амид	90 — 270	0.01	0.4	0.03	0.998
	В <sub>3</sub> к-та	90 — 270	0.03	0.6	0.04	0.995
	В <sub>1</sub>	7 — 21	0.01	0.5	0.09	0.997
	В <sub>6</sub>	10 — 30	0.04	0.5	0.04	0.994
	С	300 — 900	0.01	0.4	0.17	0.996
АА	Основная примесь	0.5 — 5.0	0.01	0.07	1.06	0.999
АП	Кето-кислота	50 — 250	0.01	1	0.10	0.999
Фэ4Ка	Кофеин	5 — 75	0.01	0.6	2.11	0.999
	Витамин С	5 — 75	0.01	0.02	1.50	0.999
	Лейцин	65 — 1000	0.05	2	0.02	0.997
	Изолейцин	50 — 800	0.03	5	0.02	0.999
	Валин	45 — 700	0.04	3	0.03	0.999
	Карнитин	50 — 800	0.07	7	0.01	0.999
Мэ	Урацил	0.03 — 56	0.03	0.004	1.83	0.999
	Цитозин	0.14 — 110	0.01	0.02	0.84	0.999

\* рассчитано для концентраций: кофеин – 2 мг/л, В<sub>3</sub> амид – 5 мг/л, В<sub>6</sub> – 7.5 мг/л, В<sub>2</sub> – 0.5 мг/л, В<sub>1</sub> – 2 мг/л, В<sub>3</sub> к-та – 1.5 мг/л, С – 7.5 мг/л (Сорбент Э); В<sub>3</sub> амид – 189 мг/л, В<sub>3</sub> к-та – 180 мг/л, В<sub>1</sub> – 14 мг/л, В<sub>6</sub> – 20 мг/л, С – 600 мг/л (Сорбент АП); основная примесь – 2.5 мг/л (Сорбент АА); кетокислота – 110 мг/л (Сорбент АП); кофеин – 5 мг/л, витамин С – 5 мг/л, лейцин – 65 мг/л, изолейцин – 50 мг/л, валин – 45 мг/л, карнитин – 100 мг/л (Сорбент Фэ4Ка); урацил – 0.06 мг/л, цитозин – 0.14 мг/л (Сорбент Мэ).

\*\*Вид градуировочной зависимости  $y=ac$ .

Таблица 32. Результаты определения сахаров в вине и кофе (n = 3, P = 0.95)

Вещество	Найде-но, мг/л	Найдено после введения 294 мг/л, мг/л*	Найдено после введения 100 мг/л, мг/л**	Найдено, г/100 мл	Общее содержание, г/100 г		Заявлен-ное содержа-ние, г/100 г
					Кофе	Вино	
Рибоза	—	280±40	104±5	—	Кофе	61 ± 6	70.7
Ксилоза	—	220±70	100±5	—			
Арабиноза	—	250±40	120±20	—			
Фруктоза	630±60*	880±60	100±5	*0.24 ± 0.02			
Манноза	—	—	110±10	—			
Глюкоза	600±50*	800±100	110±10	*0.24 ± 0.03	Вино	0.48 ± 0.05	0.3
Сахароза	340±30**	310±20	420±30	**46 ± 3			
Мальтоза	—	220±60	120±20	—			
Лактоза	120±20**	220±60	210±30	**15 ± 3			
Раффиноза	—	260±30	100±20	—			

\*в вине Gran Marques Reserva; \*\*в кофе Nescafe Gold Cappuccino

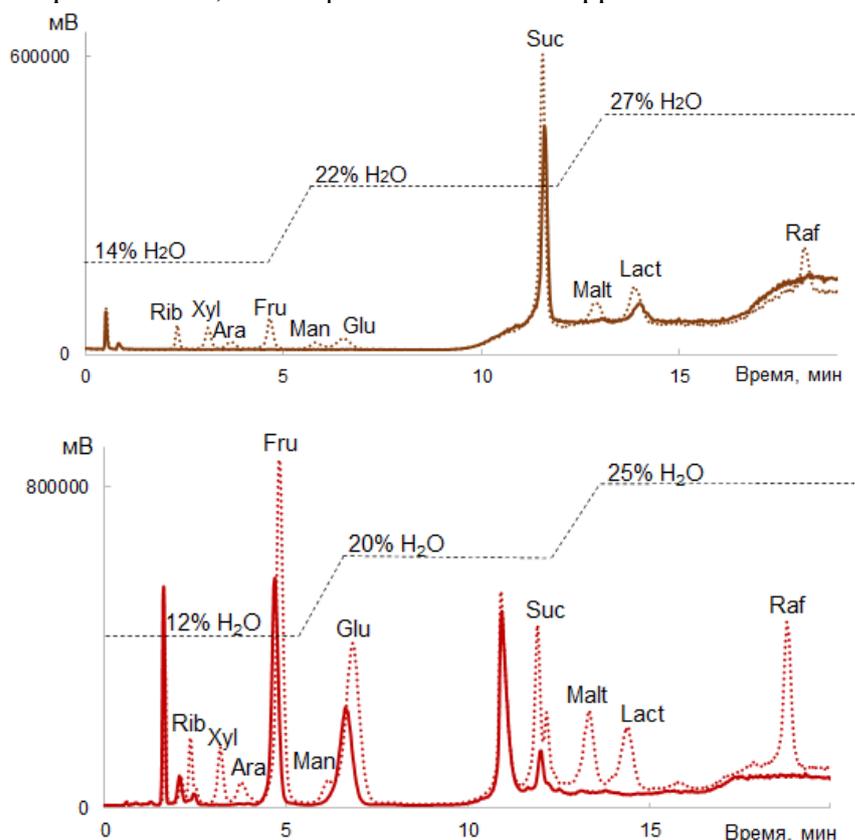


Рис. 89. Хроматограммы кофе (сверху) и вина (снизу), и хроматограммы с добавками (пунктирные линии). Сорбент Эм; ПФ – H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN; градиентное элюирование; скорость потока 1 мл/мин; детектирование по светорассеянию.

## 9.2. Определение витаминов в БАД и детоксикационном киселе

Для проверки применимости сорбента Ээ4Ка для определения водорастворимых витаминов в реальных объектах провели анализ витаминно-минерального комплекса «Компливит» и ягодного детоксикационного киселя «Леовит|ДЕТОХ», а на сорбенте АП — провели анализ биологически активной добавки «Мульти-витамин». Определение выполняли в режиме градиентного элюирования с использованием диодно-матричного детектора в УФ-диапазоне.

В витаминно-минеральном комплексе определили 4 витамина, а в ягодном детоксикационном киселе – кофеин и 4 витамина, в БАД — 5 витаминов. Правильность предложенного подхода проверили методом «введено-найдено». В случае первых двух объектов найденные количества витаминов и кофеина согласуются с введёнными, в случае БАД найденные количества определяемых компонентов сходятся с заявленными производителем (табл. 33). Таким образом, подтверждена применимость синтезированных фаз и способов определения к анализу реальных объектов. Хроматограммы объектов приведены на рис. 90.

Таблица 33. Результаты количественного определения водорастворимых витаминов в витаминно-минеральном комплексе «Компливит», в ягодном детоксикационном киселе и в БАД «Мульти-витамин»

Объект	Вещество	Заявленное содержание, мг/табл (мг/л)	Найденное содержание, мг/табл (мг/л)	Концентрация вводимой добавки, мг/л	Найденное содержание с добавкой, мг/л
Комплекс	В <sub>3</sub> амид	7.50	8.9 ± 0.2	7	16.5 ± 0.5
	В <sub>6</sub>	5.00	5.8 ± 0.4	4.5	11.5 ± 0.8
	В <sub>2</sub>	1.27	—	1.9	2.1 ± 0.1
	В <sub>1</sub>	1.00	1.3 ± 0.2	1	2.2 ± 0.3
	С	50.00	45 ± 5	25	70 ± 10
Кисель	кофеин	125	4.9 ± 0.3	10	15 ± 1
	В <sub>3</sub> амид	30*(вит. РР)	2.0 ± 0.1	2	4.1 ± 0.2
	В <sub>6</sub>	3	0.19 ± 0.05	1.5	1.7 ± 0.1
	В <sub>2</sub>	3	0.10 ± 0.02	0.25	0.30 ± 0.06
	В <sub>3</sub> к-та	—	—	6	6.2 ± 0.4
	С	420	22 ± 1	17.5	40 ± 2
БАД	В <sub>3</sub> амид	18	17 ± 5	—	—
	В <sub>3</sub> к-та		3.2 ± 0.3	—	—
	В <sub>1</sub>	1.4	1.2 ± 0.3	—	—
	В <sub>6</sub>	2.0	1.9 ± 0.2	—	—
	С	60	57 ± 5	—	—

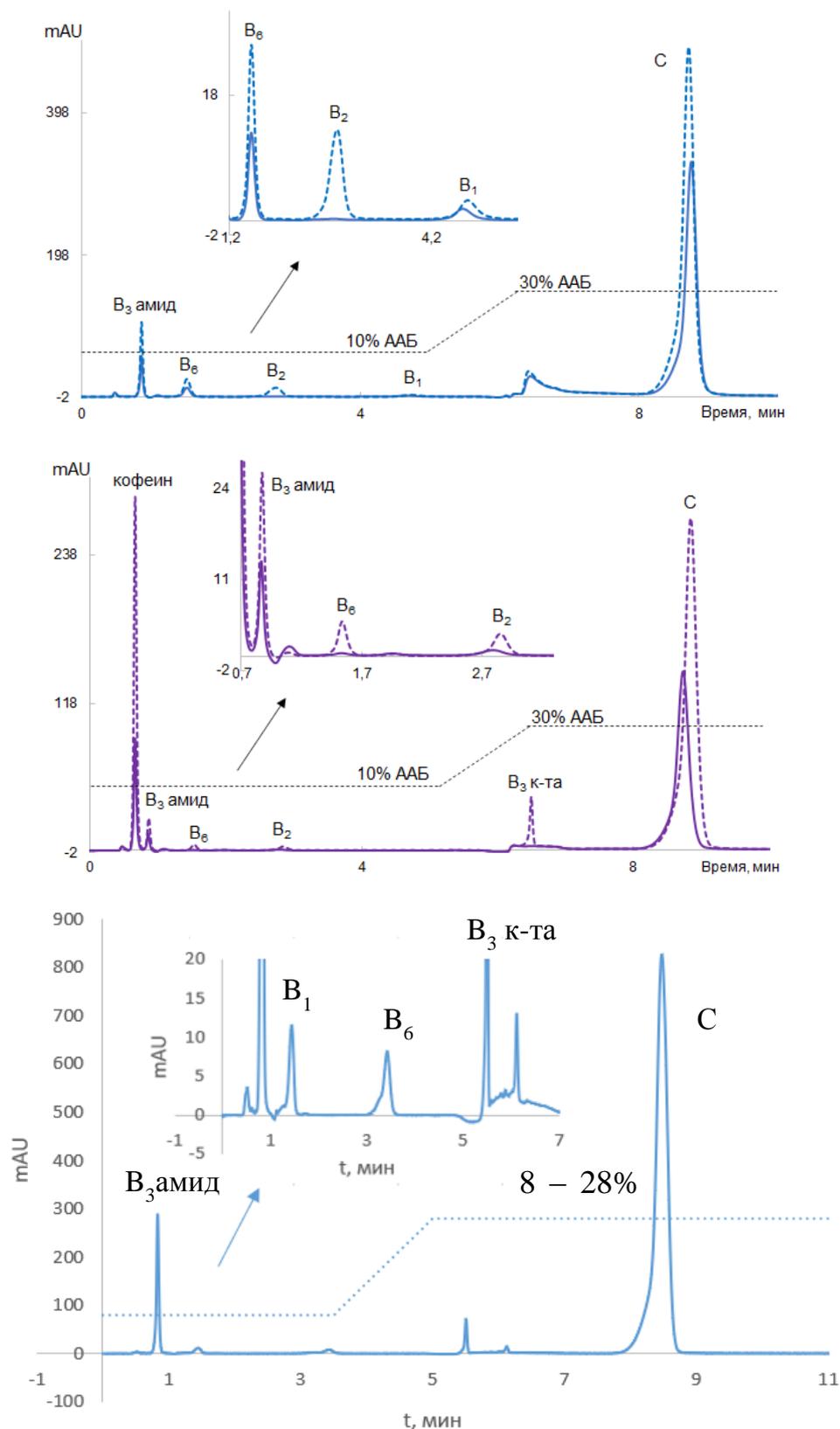


Рис. 90. Хроматограммы витаминно-минерального комплекса (А), детоксикационного киселя (Б), биологически активной добавки «Мульти-витамин» (В). Сорбент Э4Ка (А,Б) сорбент АП (В); подвижная фаза 100 мМ ААБ (Аммонийно-ацетатный буферный раствор) рН 5.4 / CH<sub>3</sub>CN; режим градиентного элюирования, скорость потока 1 мл/мин; УФ детектирование при 270 нм.

### 9.3. Определение примесей противовирусного препарата

Оценку применимости сорбента АА проводили на примере определения примесей противовирусного препарата на основе нуклеозида производства ООО «АМЕДАРТ». Для приготовления всех растворов использовали растворитель, содержащий 90 % ацетонитрила и 10% воды аналогично составу элюента.

Для проверки применимости способа определения использовали стандарты действующего вещества и его основной примеси. Также сравнивали в одинаковых условиях разделения разработанный сорбент АА с коммерчески доступной колонкой для гидрофильной хроматографии Kromasil 60-5-Hilic-D (рис. 91). Показано, что разрешение между пиками действующего вещества препарата и его примесью больше на сорбенте АА ( $R_s = 6.2$ ) по сравнению с Kromasil 60-5-Hilic-D ( $R_s = 4.8$ ), что говорит о лучших способностях сорбента АА к разделению такого класса аналитов, как азотистые основания и нуклеозиды.

Для оценки правильности способа определения готовили модельные растворы основной примеси действующего вещества на уровнях концентрации от 50 до 120% от предельно допустимой концентрации этой примеси в испытуемом растворе препарата. Для учета влияния матричного эффекта в модельные растворы также добавляли смесь вспомогательных веществ исследуемого препарата (табл. 34). Введенную концентрацию действующего вещества рассчитывали на основе навески стандартного вещества и последующего разбавления. Найденные количества примеси согласуются с введенными, что подтверждает применимость полученного сорбента и способа определения примесей в противовирусном препарате на основе нуклеозида.

Таблица 34. Оценка правильности методики определения примесей препарата на основе нуклеозида

Содержание, %	50	80	100	110	120
$C_{\text{введ}}$ , мг/л	1.13	1.80	2.25	2.48	2.70
$C_{\text{найд}}$ , мг/л	$1.12 \pm 0.06$	$1.83 \pm 0.04$	$2.26 \pm 0.01$	$2.46 \pm 0.02$	$2.71 \pm 0.02$

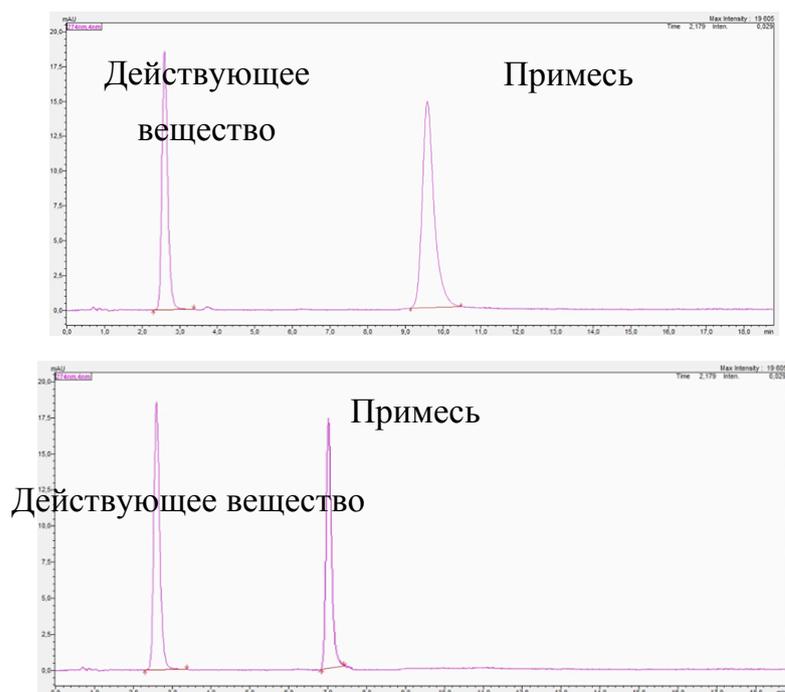


Рис. 91. Хроматограммы смеси действующего вещества препарата и его основной примеси, полученных на сорбенте АА (сверху) и на коммерческой колонке Kromasil 60-5-Nilic-D (снизу). Подвижная фаза:  $\text{CH}_3\text{CN}$  — 20 мМ ААБ, рН 4.7 (90 : 10), градиентное элюирование; скорость потока 1.0 мл/мин; УФ, 274 нм.

#### 9.4. Определение кетокислоты в питательном растворе

Для проверки применимости сорбента АП провели анализ фармацевтического препарата производства ООО «АМЕДАРТ» — раствора, содержащего гистидиновый буферный раствор, триптофан, маннитол и кетокислоту. В рамках данной работы проводили количественное определение кетокислоты в этом растворе. Сорбент АП продемонстрировал разделение определяемой кетокислоты с другими компонентами раствора: (рис. 92), что позволило провести ее количественное определение. В пробу анализируемого объекта вводили две добавки: 50 и 100 мг/л. Результаты представлены в табл. 35, хроматограмма — на рис. 92. Найденные количества кетокислоты согласуются с введенными, что подтверждает применимость полученного сорбента для определения кетокислоты в фармацевтическом растворе.

Таблица 35. Результаты количественного определения кетокислоты с добавками ( $P = 0.95$ ,  $n = 3$ )

Вещество	$C$ , мг/л	$C$ с первой добавкой, мг/л	Найденная $C$ первой добавки, мг/л	$C$ со второй добавкой, мг/л	Найденная $C$ второй добавки, мг/л
Кетоки- лота	$110 \pm 10$	$160 \pm 10$	$50 \pm 10$	$220 \pm 20$	$100 \pm 20$

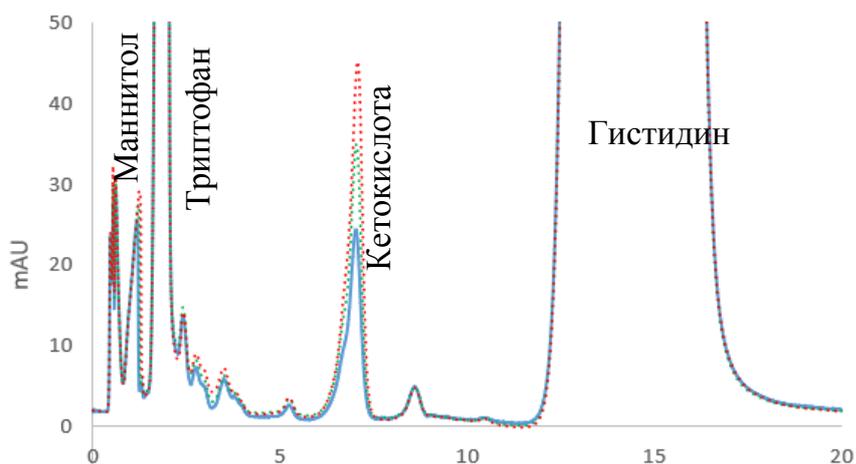


Рис. 92. Хроматограммы фармацевтического раствора в приближении. Пунктирными линиями обозначены хроматограммы испытуемого раствора с добавками. Хроматографические условия: подвижная фаза  $\text{CH}_3\text{CN}$  — 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 6.0 (80 : 20), изократическое элюирование; скорость потока 1.0 мл/мин; УФ, 210 нм.

### 9.5. Определение аминокислот и витаминов в тонизирующем напитке

Использовали фазу ФЭ4Ка для определения аминокислот и витаминов, в тонизирующем напитке «BCAA ENERGY 2:1:1» в режиме градиентного элюирования с использованием диодно-матричного детектора в УФ-диапазоне.

Для разделения основных компонентов образца подбирали долю водной составляющей, концентрацию фосфатного буферного раствора, режим элюирования. Лучшее разрешение всех основных компонентов пробы достигнуто при использовании 5 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6.5/ацетонитрила, 17/83 об.%. Для полного разрешения карнитина и тартрата (коммерчески доступный карнитин – его тартрат) использовали градиентное элюирование.

В образце обнаружили 8 веществ: кофеин, витамин B<sub>6</sub>, пантотеновую и аскорбиновую кислоты, лейцин, изолейцин, валин, карнитин. Количественное определение витамина B<sub>6</sub> и пантотеновой кислоты было затруднено из-за высокого уровня шума при малых временах удерживания, обусловленного матрицей объекта. Для витамина C наибольшую чувствительность ( $C_{\text{мин}}(210 \text{ нм}) = 0.6 \text{ мг/л}$ ,  $C_{\text{мин}}(270 \text{ нм}) = 0.02 \text{ мг/л}$ , коэффициент чувствительности при 210 нм – 0.13, при 270 нм – 1.50) достигли при длине волны детектирования 270 нм, соответствующей максимуму его поглощения, и использовали её для количественного определения данного аналита, для остальных — 210 нм. Найденные количества аналитов согласуются с введёнными (табл. 36). Хроматограммы представлены на рис. 93.

Таблица 36. Результаты количественного определения веществ в напитке

Вещество	Заявленное содержание, мг/330 мл	Найденное содержание, мг/330 мл	Найденное содержание, мг/л	Концентрация добавки, мг/л	Найденное содержание с добавкой, мг/л
кофеин	80	80 ± 3	24 ± 1	12	34 ± 1
С	80	70 ± 3	23 ± 1	37.5	61 ± 2
лейцин	1500	1340 ± 130	410 ± 40	450	900 ± 50
изолейцин	750	720 ± 30	220 ± 10	255	420 ± 50
валин	750	810 ± 30	250 ± 10	222	450 ± 20
карнитин	900	880 ± 30	270 ± 10	200	460 ± 20

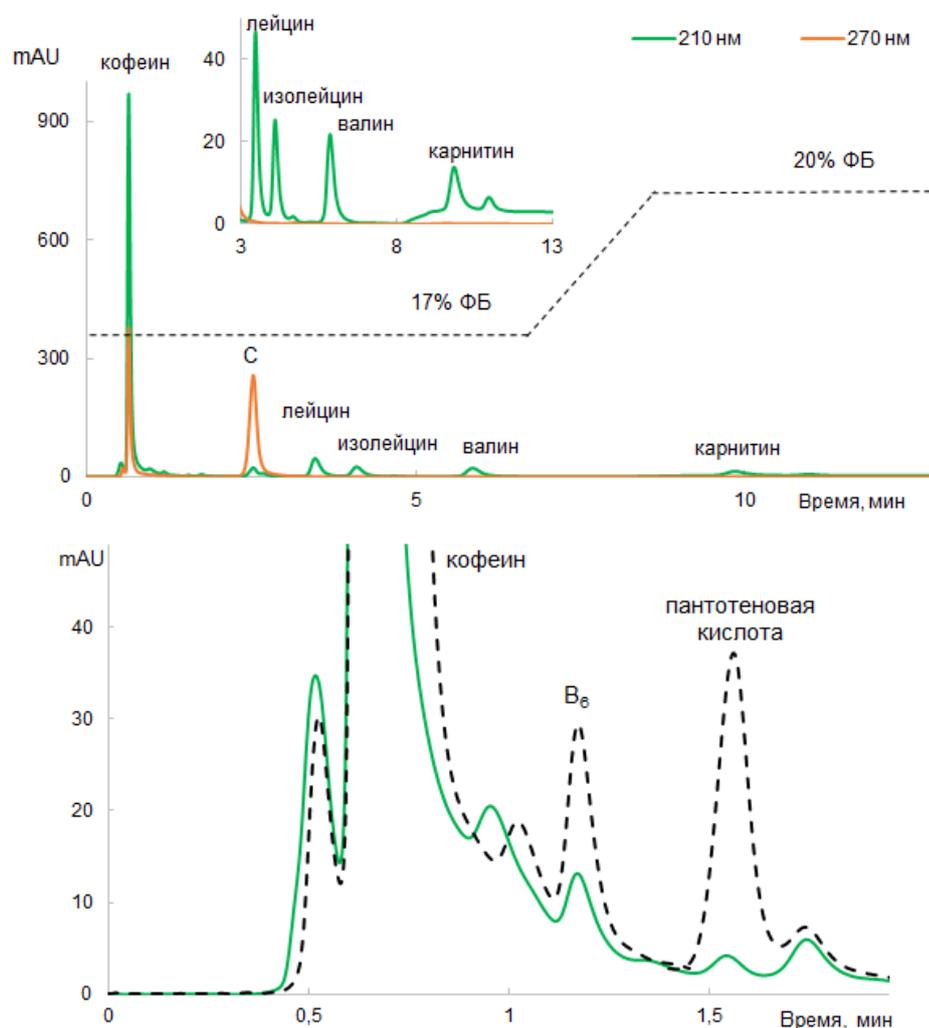


Рис. 93. Хроматограммы тонизирующего напитка (сверху, сплошная линия), напитка с добавками витамина В<sub>6</sub> и пантотеновой кислоты (снизу, пунктирная линия). Сорбент Фэ4Ка; подвижная фаза 5 мМ ФБ (фосфатный буферный раствор) рН 6.5 / СН<sub>3</sub>СN; градиентное элюирование: 0-7 мин 17 об.% ФБ, 7-8 мин до 20 об.% ФБ, 8-15 мин 20 об.% ФБ; скорость потока 1 мл/мин; ДМД.

## 9.6. Определение аминокислот в почве в режиме ГИХ-МС<sup>5</sup>

Проведено разделение аминокислот в режиме ГИХ с МС-детектированием на одной из наиболее гидрофильных и эффективных колонок М (АЦ) на основе силикагеля, полученной по реакции Уги с фрагментами 2-морфолиноэтилизотиоцианида и ацетона в слое. Сначала выбирали состав подвижной фазы, совместимой с МС-детектированием: для этого провели разделение аминокислот с использованием аммонийно-ацетатного (ААБ, 10-20 мМ, рН 5.8), а также аммонийно-формиатного (АФБ, 10-20 мМ, рН 4.7) буферных растворов и рефрактометрического детектирования. При переходе на летучие буферные растворы наблюдали уменьшение факторов удерживания аминокислот, однако, значимого уменьшения селективности по аминокислотам не происходило. Показано снижение эффективности до 25% на сорбенте М, одинаковое для двух буферных систем. Тем не менее, эффективность по аминокислотам достигала 25000 тт/м. Таким образом, был установлен состав подвижной фазы: 14.5% 10 мМ АФБ (рН 4.7) и 85.5% ацетонитрила для разделения аминокислот с точки зрения экспрессности анализа и симметрии пиков для фазы М (АЦ).

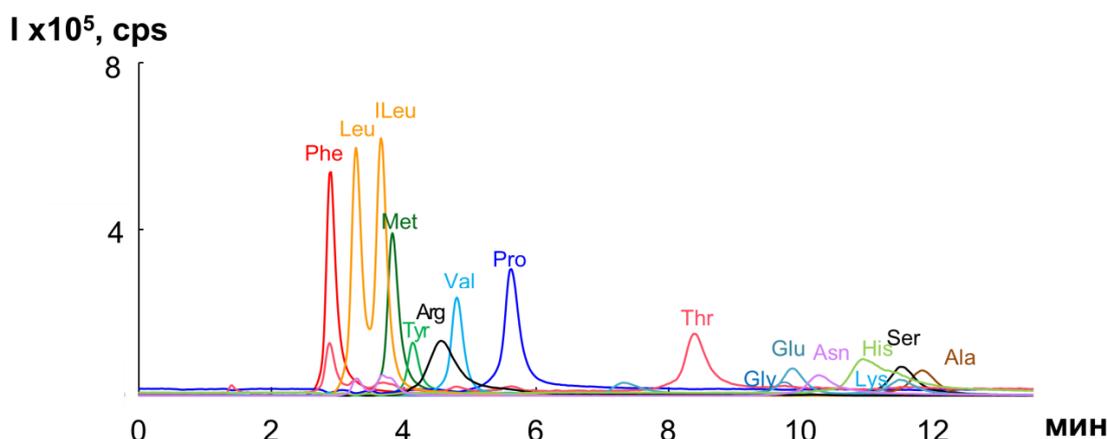


Рис. 94. Хроматограммы модельных (15:85%, по объему) растворов аминокислот на сорбенте М. Phe (10 мг/л), Leu, ILeu (15 мг/л), Met (10 мг/л), Tyr (30 мг/л), Arg, Val, Pro (10 мг/л), Thr, Gly, Glu (15 мг/л), Asn (20 мг/л), His, Lys (10 мг/л), Ser (20 мг/л), Ala (15 мг/л). Условия: сорбент М; подвижная фаза  $\text{CH}_3\text{CN}$  —АФБ, рН 4.7 (85.5:14.5%); скорость потока 0.8 мл/мин; МС-детектирование.

<sup>5</sup> При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

5. **Чикурова Н.Ю.**, Горбовская А.В., Ставрианиди А.Н., Фёдорова Е.С., Шемякина А.О., Буряк А.К., Ужель А.С., Чернобровкина А.В., Шпигун О.А. Новые сорбенты для определения аминокислот в почвенных экстрактах методом гидрофильной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // Журн. аналит. химии. 2023. Т.78. № 7. С. 637. 30%.

В условиях электрораспылительной ионизации эффективность распыления и испарения капель увеличивается на низких скоростях потока подвижной фазы. При этом ухудшается форма и, как следствие, разрешение пиков аминокислот. Для достижения компромисса между чувствительностью МС-детектирования и разделением аминокислот в качестве оптимальной скорости потока выбрали 0.8 мл/мин. Хроматограммы приведены на рис. 94.

Таблица 37. Результаты определения аминокислот в модельном экстракте первого образца почвы, сорбент М (АЦ)

Вещество	$C_{min}$ , мг/л	$C_{lim}$ , мг/л	Диапазон линейности, мг/л	$a^*$	$r$	Процент восстановления, 0.25 мг/л	Процент восстановления 1 мг/л
Phe	0.03	0.1	0.1-10	570	0.999	101±5	95±3
Leu	0.03	0.1	0.1-10	330	0.999	89±13	97±10
Ile	0.03	0.1	0.1-10	400	0.999	87±6	85±2
Met	0.03	0.1	0.1-10	710	0.999	87±5	88±8
Tyr	0.5	1.5	1.5-30	40	0.999	< $C_{lim}$	94±9
Arg	0.03	0.1	0.1-10	530	0.999	< $C_{lim}$	36±4
Val	0.03	0.2	0.2-10	220	0.999	87±9	92±4
Pro	0.03	0.1	0.1-10	450	0.998	95±2	101±10
Thr	0.03	0.2	0.2-10	250	0.999	103±13	92±8
Gly	0.7	2.1	2.1-30	10	0.999	< $C_{lim}$	92±5
Gln	0.25	0.75	0.75-10	83	0.999	< $C_{lim}$	88±8
Asn	0.6	2.0	2.0-30	25	0.999	90±12	86±2
His	0.15	0.5	0.5-10	180	0.998	< $C_{lim}$	88±9
Lys	0.15	0.5	0.5-10	150	0.999	< $C_{lim}$	100±5
Ser	0.7	2.1	2.1-30	15	0.998	< $C_{lim}$	90±7
Ala	0.5	1.5	1.5-30	40	0.999	< $C_{lim}$	87±6

Для оценки применимости сорбента М (АЦ) в реальных условиях анализа были приготовлены модельные растворы вытяжек из почвы с добавками аминокислот на двух уровнях содержаний вблизи нижней границы диапазона линейности. Метрологические характеристики приведены в табл. 31. Найденные количества согласуются с введенными (табл. 37). Значимый матричный эффект (70%) наблюдали только для аргинина. Такого рода матричный эффект можно объяснить как селективным связыванием аминокислот компонентами почвы, так и

подавлением или усилением ионизации в присутствии других компонентов почв, если их пики перекрываются с пиками аналитов на хроматограммах. Других различий в матричных эффектах для разных сорбентов не наблюдали.

### 9.7. Изучение кинетики ферментативной реакции

Разделение различных нуклеозидов и соответствующих азотистых оснований на разработанных фазах позволяет изучать кинетику реакций гидролиза ферментами из класса рибонуклеозидгидролаз, катализирующих реакцию расщепления нуклеозидов до азотистых оснований и рибозы. Изучение ферментативной активности было проведено совместно с кафедрой энзимологии на сорбенте Мэ, полученном по реакции Уги. Применили фермент RihC, проявляющий наибольшую специфичность к уридину. Как видно из рис. 95, за 360 с уридин полностью превращается в урацил, в то время как цитидин за 300 с превращается в цитозин только наполовину. На сегодняшний день для изучения кинетических параметров RihC используют метод ОФ ВЭЖХ [164]. С помощью разработанных фаз в режиме гидрофильной хроматографии можно разделять пары нуклеозид/основание в течение 2-5 минут, что значительно быстрее, чем в обращенно-фазовом режиме [165, 166].

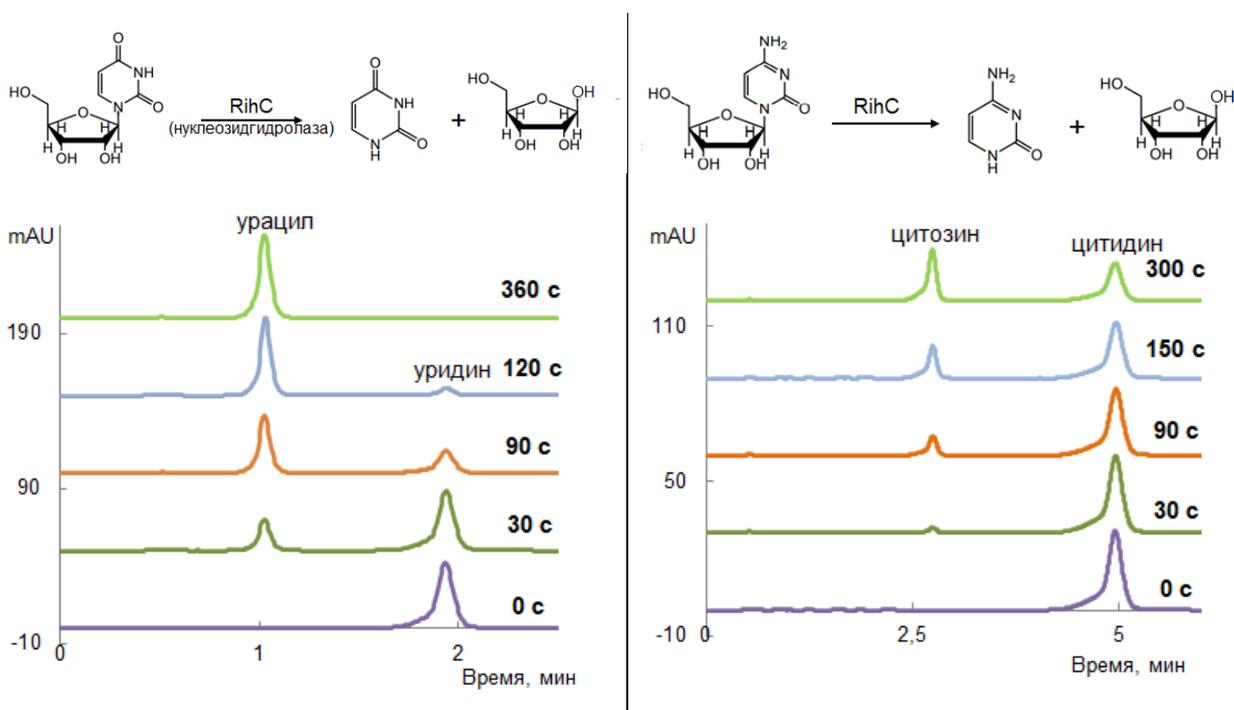


Рис. 95. Гидролиз ферментом RihC 0.5 мМ уридина до урацила (слева), 1 мМ цитидина до цитозина (справа). Сорбент Мэ, подвижная фаза 20 мМ ААБ, рН 4.7 / ацетонитрил 10/90 об.%, скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование при 254 нм.

Для образующихся в результате гидролиза продуктов - урацила и цитозина получили градуировочные зависимости, метрологические характеристики представлены в табл. 31. Для построения одной зависимости скорости реакции от концентрации субстрата и расчёта параметров уравнения Михаэлиса-Ментен необходимо проведение около 225 анализов: получение 15 кинетических кривых (рис. 96), содержащих минимально 5 точек по три параллельных измерения, что доказывает необходимость быстрого разделения данных аналитов. Предложенный подход с использованием новых гидрофильных колонок позволяет сократить время, необходимое для получения кинетических кривых, на несколько часов благодаря экспрессному разделению нуклеозидов и продуктов их ферментативного гидролиза. Более того, данный способ можно применять не только для конкретного фермента RihC, использованного в данной работе, но и для любого фермента RihC, а также ввиду высокой селективности сорбента изучать кинетику реакции гидролиза различных нуклеозидов.

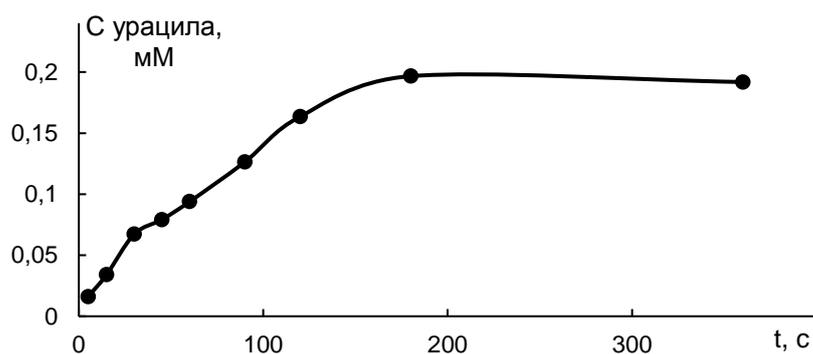


Рис. 96. Кинетическая кривая гидролиза 0.5 мМ уридина до урацила по действию рибонуклеозидгидролазы RihC.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований поставленная цель работы достигнута. Основные результаты, полученные в работе, представлены ниже.

В работе предложены новые подходы к синтезу сорбентов для гидрофильной хроматографии: использование многокомпонентной реакции Уги, создание полимерного функционального слоя с ее помощью, а также модифицирование эремомицином с использованием разветвленного спейсера. Впервые описано применение разработанных сорбентов в гидрофильной хроматографии.

Предложены параметры для прогнозирования факторов удерживания аналитов с разными преобладающими механизмами удерживания.

Варьирование реагентов реакции Уги позволило управлять свойствами получаемых фаз. Установлено, что использование наиболее гидрофильного изоцианида (2-морфолиноэтилизоцианида) и карбонильного соединения (2-ацетилпиррола) в реакции Уги в случае формирования мономерного функционального слоя приводит к получению сорбентов с высокой разделяющей способностью и эффективностью до 60000 тт/м. Создание полимерного слоя по реакции Уги с помощью полимерных кислот позволяет существенно экранировать матрицу. Показано, что использование полимеров большой молекулярной массы с карбоксильными и амидными группами приводит к увеличению гидрофильности и эффективности получаемых фаз.

В работе показано использование коммерчески доступной фазы с эремомицином в слое для разделения полярных веществ в режиме гидрофильной хроматографии. Предложено закрепление эремомицина с пространственным удалением групп с помощью спейсера, что позволило получить фазу на основе силикагеля с высокой эффективностью до 40000 тт/м. Подчеркнута перспективность использования антибиотиков для гидрофилизации поверхности различных матриц. Гидрофилизация матрицы на основе полистирол-дивинилбензола с помощью эремомицина приводит к получению сорбента, подходящего и для обращённо-фазового и гидрофильного режима и сохраняющего возможность разделения энантиомеров благодаря наличию хирального селектора.

Полученные фазы подходят для решения разных задач: показана возможность разделения смесей витаминов, углеводов, amino- и органических кислот, галогенуксусных и фосфоновых кислот, алкилбензолов, а также показана применимость сорбентов к анализу реальных объектов.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые способы формирования функциональных слоев сорбентов для гидрофильной хроматографии: использование клик-реакции Уги, введение полимерных соединений с ее помощью, а также модифицирование эремомицином с использованием разветвленного спейсера.
2. Показано, что содержание азота в разных партиях аминотаз согласно данным элементного анализа коррелирует только с факторами удерживания соединений, для которых адсорбционный механизм удерживания вносит преобладающий вклад. Для прогнозирования факторов удерживания аналитов, сорбирующихся преимущественно по распределительному механизму, необходима дополнительная оценка гидрофильности сорбентов по тесту Танака.
3. Варьирование исходных реагентов многокомпонентной реакции Уги: изоцианида, карбонильного соединения и кислоты – позволило управлять гидрофильностью и ионообменными свойствами получаемых фаз. Использование наиболее гидрофильных 2-морфолиноэтилизоцианида и 2-ацетилпиррола в случае формирования мономерного функционального слоя привело к получению сорбентов с высокой разделяющей способностью и эффективностью до 60000 тт/м.
4. Оценено влияние структуры полимерного функционального слоя, полученного по реакции Уги, а также способа его закрепления, соотношения матрица:полимер по массе на стадии синтеза. Установлено, что к увеличению гидрофильности и эффективности фаз приводит использование полимеров большой молекулярной массы с карбоксильными и амидными группами.
5. Применение эремомицина для создания функционального слоя привело к существенной гидрофилизации разных матриц, а модифицирование полистирол-дивинилбензола антибиотиком позволило получить сорбент, подходящий для нескольких хроматографических режимов. Предложен способ закрепления эремомицина на матрице силикагеля с использованием 1,4-БДДГЭ, обеспечивающий высокую эффективность неподвижной фазы до 40000 тт/м.
6. Получены зависимости факторов удерживания витаминов кислотной природы от анионообменной селективности 32 разработанных фаз, с помощью которых возможно прогнозировать удерживание данных веществ.
7. Показана применимость сорбентов к анализу реальных объектов на примере определения углеводов, аминокислот и витаминов в препаратах, БАД, почве и напитках (вино, кофе, тонизирующий напиток, детоксикационный кисель).

## Приложение

Приложение 1. Результаты теста Танака и факторы удерживания индивидуальных соединений каждого класса, полученные в условиях, указанных в табл. 9

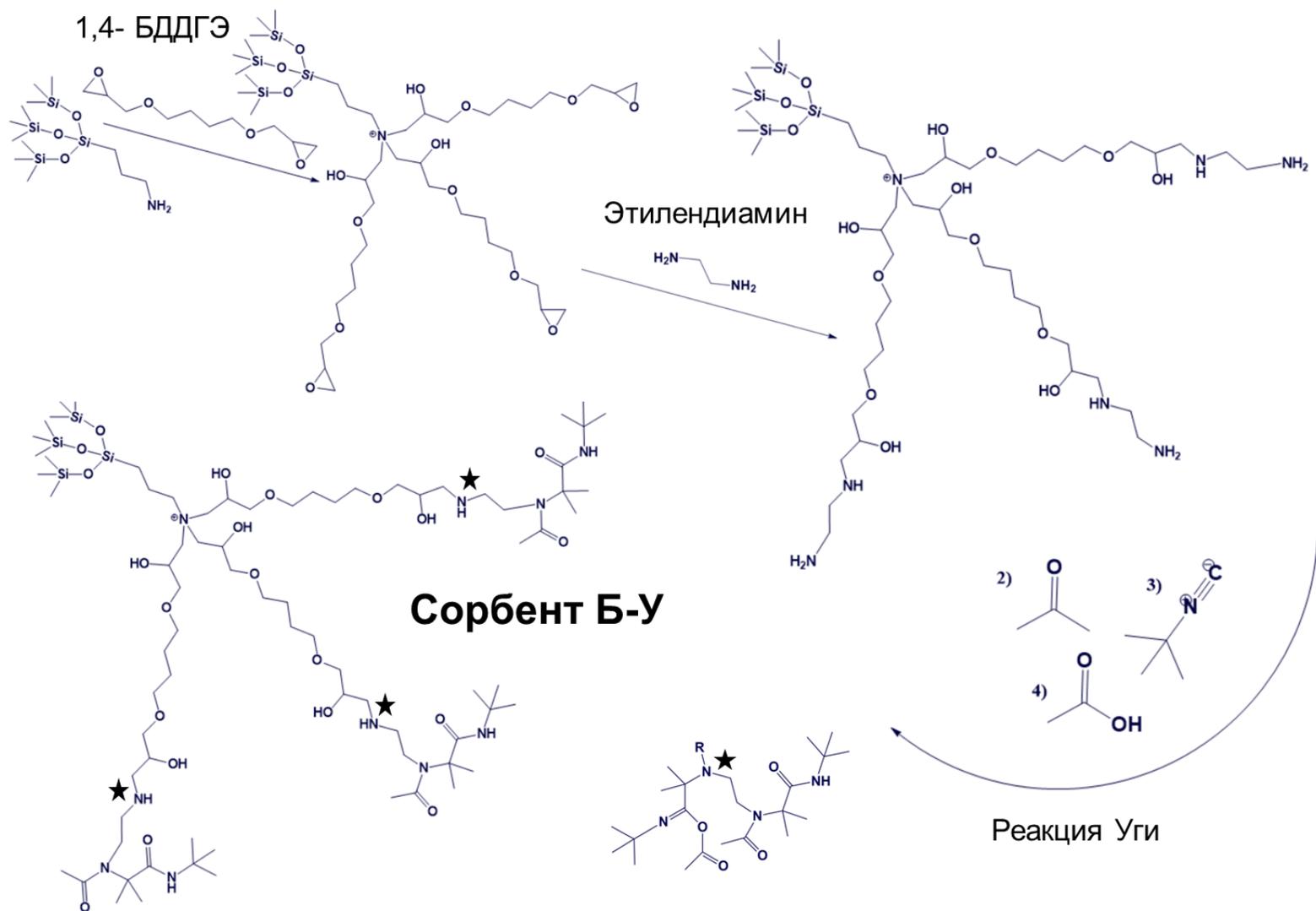
	Параметр	матрица	Бэ	Бм	Тэ4	Тм4	Тэ4Ка	Эм	Ээ	Ээ4Ка	Фэ4Ка	Мэ	Мэ4	Мм4	МэКа	Мэ4Ка	Мм4Ка
Тест Танака	kU	4.0	3.2	3.4	2.9	3.3	2.8	3.8	2.7	2.8	3.3	3.2	3.5	3.7	4.1	4.0	3.8
	$\alpha$ (CH <sub>2</sub> )	1.5	1.3	1.4	1.3	1.3	1.3	1.6	1.1	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3
	$\alpha$ (OH)	2.1	1.8	2.0	1.8	1.9	1.7	2.3	1.5	1.8	1.9	1.8	1.9	2.0	2.3	2.3	2.2
	$\alpha$ (V/A)	1.4	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	1.4	1.4
	$\alpha$ (CX)	0	0.2	0.1	0.2	0	0.2	0	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0	2.0	0.9	2.3
$\alpha$ (AX)	14.3	12.3	13.3	14.1	16.8	13.2	15.0	11.9	12.7	13.6	13.2	15.6	23.0	2.3	6.1	2.9	
Сах.	Сахароза	25.9	23.7	14.3	13.9	16.0	10.3	12.5	12.9	14.5	14.2	14.6	14.7	9.4	14.2	12.2	11.1
	Мальтоза	36.3	32.7	21.1	20.4	23.6	14.6	18.7	18.5	21.0	20.5	21.4	21.4	13.3	20.7	17.7	15.6
	Лактоза	36.3	32.7	24.9	24.3	27.9	17.5	21.7	22.2	25.2	25.1	24.8	24.1	15.0	24.5	21.3	18.0
Азотист.	Гуанин	8.6	7.1	10.3	6.9	7.8	6.4	8.4	—	6.5	7.5	7.6	8.1	10.1	10.9	10.7	10.5
	Цитидин	11.5	9.4	13.6	8.9	9.7	8.4	11.2	—	8.4	10.0	9.6	9.9	10.1	14.4	13.1	13.1
	Гуанозин	17.2	13.3	21.6	12.7	14.8	11.5	16.4	—	11.7	14.2	14.1	15.4	18.4	23.6	23.0	22.3
	Ксантин	21.9	11.9	8.1	11.0	14.8	9.4	18.2	—	9.9	13.0	13.2	15.4	24.5	5.4	8.1	5.5
Вит.	В <sub>1</sub>	5.1	5.0	4.7	6.0	4.4	5.7	4.1	5.6	5.8	6.0	5.2	5.2	3.8	5.8	5.0	4.9
	В <sub>3</sub> к-та	12.3	8.5	10.7	8.5	9.9	7.9	8.9	6.8	7.8	9.0	9.3	10.3	12.9	4.7	5.8	5.0
	С	55.2	27.9	44.1	26.0	35.3	22.6	35.4	18.2	22.8	31.4	30.6	37.3	53.6	21.0	23.9	19.9
АК*	Аспарагин	17.8	29.5	26.4	13.2	16.7	15.6	29.5	26.6	13.0	20.4	14.3	19.0	15.4	19.0	20.2	14.5
	Серин	26.9	42.2	41.4	16.9	22.4	21.1	43.9	39.2	16.8	29.7	19.5	27.8	22.4	28.4	30.8	21.4
	Аланин	24.6	50.7	46.7	19.3	23.2	21.1	43.9	44.4	18.9	26.8	20.8	25.2	20.5	25.2	26.0	19.1
К-ты	Янтарная	13.2	11.2	14.1	11.1	12.8	11.9	11.6	9.6	10.1	13.4	12.2	14.3	14.4	13.8	16.7	14.0
	Винная	19.7	13.7	20.2	13.4	16.4	14.2	14.7	11.6	11.9	19.2	15.2	18.8	17.0	19.0	24.4	17.7
	Щавелевая	25.0	16.8	25.4	16.4	20.4	18.2	19.3	14.9	14.5	24.1	18.7	24.1	22.7	25.0	32.3	23.9

\* Для Бм, Бэ, Эм, Ээ данные получены при использовании подвижной фазы с содержанием ацетонитрила 85 об.%, для Тм4, Тэ4, Мм4, Мэ4, Мм4Ка, Мэ4Ка — с содержанием ацетонитрила 80 об.%

Коэффициенты селективности и эффективность индивидуальных соединений каждого класса (сахара – селективность рассчитана по фруктозе, азотистые – по аденину, В<sub>3</sub> к-та, С – по В<sub>12</sub>, В<sub>1</sub> – по В<sub>3</sub> амиду, аминокислоты – по пролину, орг. кислоты – по гликолевой)

		Параметр	матрица	Бэ	Бм	Тэ4	Тм4	Тэ4Ка	Эм	Ээ	Ээ4Ка	Фэ4Ка	Мэ	Мэ4	Мм4	МэКа	Мэ4Ка	Мм4Ка	
		Сах.	Азотист	Вит.	АК	К-ты	Сах.	Азотист	Вит.	АК	К-ты								
Коэффициенты селективности	Сах.	Сахароза	4.6	3.6	4.4	3.5	3.7	3.3	3.4	3.6	3.5	3.4	3.6	3.8	3.4	3.6	3.3	3.6	
		Мальтоза	6.4	5.3	6.1	5.2	5.4	4.6	5.1	5.2	5.1	4.9	5.3	5.5	4.8	5.2	4.8	5.0	
		Лактоза	6.4	6.3	6.1	6.2	6.4	5.6	5.9	6.2	6.1	6.1	6.2	6.2	5.4	6.2	5.7	5.8	
	Азотист	Гуанин	4.5	3.5	3.6	3.3	3.7	3.1	4.0	—	3.2	3.5	3.5	3.7	4.5	3.9	4.2	3.9	
		Цитидин	6.1	4.5	4.8	4.2	4.6	4.1	5.3	—	4.1	4.7	4.5	4.6	4.5	5.2	5.2	4.8	
		Гуанозин	9.0	6.4	7.6	6.0	7.1	5.6	7.8	—	5.8	6.7	6.5	7.1	8.1	8.5	9.2	8.2	
	Вит.	Ксантин	11.5	5.8	2.8	5.2	7.0	4.5	8.6	—	4.9	6.1	6.1	7.1	10.8	2.0	3.2	2.0	
		В <sub>1</sub>	7.3	7.3	6.8	8.7	6.4	8.4	6.2	9.0	8.8	8.4	7.3	7.2	7.6	9.1	7.8	7.9	
		В <sub>3</sub> к-та	0.9	0.6	0.8	0.6	0.7	0.5	0.7	0.5	0.6	0.6	0.6	0.7	1.0	0.3	0.4	0.4	
	АК	С	4.0	2.0	3.2	1.7	2.4	1.6	2.8	1.3	1.6	2.1	2.1	2.4	4.0	1.5	1.8	1.5	
		Аспарагин	2.1	1.6	1.6	1.6	1.8	1.8	2.1	1.7	1.5	2.1	1.6	2.2	2.0	2.2	2.4	2.1	
		Серин	3.2	2.3	2.6	2.0	2.4	2.4	3.1	2.5	2.0	3.1	2.2	3.2	2.9	3.3	3.6	3.1	
	К-ты	Аланин	2.9	2.7	2.9	2.3	2.5	2.4	3.1	2.9	2.2	2.8	2.4	2.9	2.7	2.9	3.1	2.8	
		Янтарная	4.9	4.9	4.9	5.0	5.1	5.1	5.1	5.2	4.9	4.9	4.8	5.0	5.3	5.2	5.0	5.3	
		Винная	7.3	6.0	7.0	6.1	6.4	6.1	6.4	6.3	5.8	7.1	6.0	6.6	6.3	7.1	7.2	6.8	
		Щавелевая	9.2	7.4	8.8	7.4	8.0	7.8	8.4	8.1	7.0	8.9	7.4	8.5	8.4	9.3	9.6	9.2	
	Эффективность (N×10 <sup>-3</sup> . тт/м)	Сах.	Сахароза	24	12	5	25	30	11	12	19	21	26	28	20	16	24	16	19
			Мальтоза	10	11	10	19	25	9	9	11	10	9	16	11	7	14	5	11
Лактоза			10	24	10	36	30	13	12	12	14	14	34	18	12	22	9	20	
Азотист		Гуанин	22	28	54	40	40	36	32	—	50	35	40	34	40	43	37	47	
		Цитидин	22	26	48	42	42	38	33	—	45	42	47	37	44	52	42	50	
		Гуанозин	25	38	48	44	47	37	31	—	46	34	45	35	44	51	47	52	
Вит.		Ксантин	21	35	40	41	43	38	28	—	48	39	43	36	34	28	31	36	
		В <sub>1</sub>	18	28	30	37	33	31	18	16	43	29	38	32	29	42	28	35	
		В <sub>3</sub> к-та	26	38	38	49	50	44	27	39	40	39	43	40	50	36	30	28	
АК		С	25	44	54	54	54	48	31	43	54	51	56	45	57	56	50	50	
		Аспарагин	30	33	42	40	38	38	24	39	39	43	39	41	46	50	49	42	
		Серин	37	34	43	47	44	39	30	42	42	47	28	48	58	59	56	44	
К-ты		Аланин	42	46	65	62	44	43	43	50	50	43	51	56	64	55	58	45	
		Янтарная	21	20	23	25	24	30	18	18	13	19	20	18	20	27	20	20	
		Винная	27	34	35	26	36	23	16	27	27	32	37	28	30	36	39	31	
		Щавелевая	26	29	38	20	27	24	11	19	26	29	29	22	26	26	35	27	

Приложение 2. Схема синтеза и предполагаемая структура неподвижной фазы Б-У.



Приложение 3. Факторы удерживания индивидуальных соединений каждого класса, полученные в условиях, указанных в табл. 9

	Параметр	Матри-ца	АЦ	АФ	АП	АА	СЕР	АСП	ПМ 1:0,01	ПА 1:0,1	ПА-с 1:0,1	ПАМ 1:0,1	ПАМ 1:1	ПАММ 1:0,1	ПАА 1:0,1	ПАА 1:0,3	
Тест Танака	kU	4.0	4.0	2.7	3.8	3.1	3.0	3.2	2.2	2.0	2.6	3.1	3.6	2.4	3.0	2.7	
	$\alpha$ (CH <sub>2</sub> )	1.5	1.4	1.3	1.4	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.5	1.3	1.4	1.4	
	$\alpha$ (ОН)	2.1	2.3	1.8	2.0	1.9	1.8	1.9	1.9	2.0	2.0	2.1	2.6	1.9	1.9	2.0	
	$\alpha$ (V/A)	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	1.5	1.5	1.5	1.4	1.4	1.4	
	$\alpha$ (СХ)	0	0.9	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	3.1	0	0	
	$\alpha$ (АХ)	14.3	6.1	12.8	19.8	24.7	15.9	15.5	15.5	51.8	16.8	25.8	10.2	0.7	26.9	28.7	34.8
	$\alpha$ (Тб/Тр)	0.7	0.9	0.7	0.7	0.6	0.8	0.8	0.3	0.5	0.4	0.5	0.5	0.9	0.4	0.4	
Углеводы	Рибоза	2.0	1.8	1.2	1.3	1.1	1.4	1.4	0.3	0.5	0.4	0.7	0.6	0.9	1.1	0.6	
	Ксилоза	3.5	2.3	1.8	2.0	1.8	2.1	2.2	0.5	0.8	0.7	1.2	1.3	1.4	1.7	1.0	
	Арабиноза	4.1	2.8	2.2	2.5	2.0	2.5	2.6	0.5	0.8	0.7	1.3	1.2	1.5	1.8	1.0	
	Фруктоза	5.6	3.7	3.0	3.3	2.7	3.3	3.5	0.6	0.9	1.0	1.5	1.1	2.0	2.5	1.4	
	Манноза	7.0	4.5	3.7	4.0	3.4	4.4	4.5	0.8	1.1	1.4	1.9	1.2	2.5	3.3	1.8	
	Глюкоза	9.2	5.6	4.4	4.7	4.0	5.0	5.4	0.9	1.4	1.7	2.5	1.4	3.1	3.8	2.2	
	Сахароза	25.9	12.2	11.3	10.2	8.2	11.6	12.5	1.4	2.1	3.3	3.6	2.4	6.0	7.6	3.9	
	Мальтоза	36.4	17.7	15.0	14.2	11.8	16.5	18.0	1.8	2.7	4.3	5.3	3.3	8.1	11.1	5.2	
	Лактоза	36.4	21.3	16.7	17.4	13.5	19.1	19.9	1.7	2.3	4.1	4.9	3.3	8.7	11.9	5.5	
Азотист. и нукл.	Тимин	0.8	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.6	0.7	0.8	0.7	0.7	0.9	0.7	
	Урацил	1.2	1.0	1.0	1.2	1.1	1.0	1.1	0.9	0.9	1.0	1.1	1.2	0.9	1.2	1.0	
	2'-дезоксинуридин	1.9	1.6	1.5	1.8	1.5	1.6	1.7	1.1	1.0	1.2	1.4	1.4	1.3	1.6	1.4	
	Аденин	1.9	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	1.9	2.3	2.8	3.1	3.4	2.9	2.5	2.8	2.6	
	Аденозин	2.8	3.7	2.5	2.8	2.5	2.4	2.6	1.8	2.0	2.2	3.1	3.0	2.4	2.7	2.5	
	Уридин	3.8	4.1	2.6	3.4	2.9	2.9	3.2	1.9	1.9	2.7	3.0	3.5	2.4	3.0	2.7	
	Цитозин	5.2	5.4	4.1	5.4	3.9	4.4	4.4	2.2	1.9	5.8	4.3	7.1	3.1	3.7	3.2	
	Гуанин	8.6	10.7	6.7	8.3	8.3	7.4	7.6	8.6	12.7	12.6	15.5	17.9	8.9	10.9	10.4	
	Цитидин	11.5	13.1	8.0	10.7	8.0	8.9	9.2	4.2	5.2	5.9	9.0	14.9	6.3	7.3	6.6	
	Ксантин	21.9	8.1	12.1	20.9	19.8	12.5	14.5	24.7	12.0	—	12.4	4.8	15.7	25.1	23.8	

	Параметр	Матри-ца	АЦ	АФ	АП	АА	СЕР	АСП	ПМ 1:0,01	ПА 1:0,1	ПА-с 1:0,1	ПАМ 1:0,1	ПАМ 1:1	ПАММ 1:0,1	ПАА 1:0,1	ПАА 1:0,3
	Гуанозин	17.2	23.0	10.0	17.3	14.9	13.3	14.3	12.4	16.9	12.2	25.5	29.7	14.6	17.2	16.6
Витамины	В <sub>3</sub> амид	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6	0.7	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5
	В <sub>6</sub>	2.2	1.8	1.7	1.9	1.7	1.9	1.8	1.6	1.6	1.6	1.7	1.7	1.6	1.8	1.6
	В <sub>2</sub>	5.3	5.6	4.0	5.2	4.3	4.9	5.0	3.0	2.9	3.1	3.4	3.6	3.3	3.8	3.4
	В <sub>1</sub>	5.1	5.0	5.6	3.9	2.5	4.2	4.1	0.9	1.3	1.1	1.7	4.4	1.5	1.4	1.3
	В <sub>3</sub> к-та	12.3	5.8	5.9	10.9	10.1	9.0	9.1	13.6	6.7	8.8	6.3	2.2	9.7	12.5	11.4
	В <sub>12</sub>	13.7	13.4	12.3	13.0	9.2	13.2	12.9	5.1	3.2	3.3	4.3	5.8	6.1	-	4.9
	С	55.2	24.0	14.8	45.1	34.9	29.6	33.9	41.4	10.0	24.5	18.7	11.8	24.0	37.1	31.8
Аминокислоты	Фенилаланин	3.3	3.6	3.1	3.9	2.7	3.3	3.3	2.8	1.6	2.3	2.2	2.0	2.5	2.8	2.7
	Метионин	5.1	5.6	4.5	6.1	4.0	5.1	5.1	4.0	2.3	3.2	2.9	3.0	3.6	4.2	3.7
	Тирозин	6.2	6.9	5.2	7.1	5.6	6.0	6.0	6.0	4.2	4.9	5.2	4.0	5.3	6.2	5.8
	Пролин	8.5	8.5	7.7	8.7	6.5	7.6	7.5	4.5	3.0	4.2	4.7	4.7	4.4	5.2	4.3
	Аспарагин	17.8	20.2	12.9	22.0	12.8	17.0	17.9	12.4	6.1	9.0	7.9	11.3	10.7	14.2	11.2
	Аланин	24.6	26.0	18.0	26.6	17.2	21.5	22.1	16.2	9.4	11.5	10.0	18.8	13.4	16.7	13.7
	Серин	26.8	30.8	17.5	32.8	18.2	25.2	26.5	22.9	11.6	15.8	14.2	15.7	17.3	22.6	18.6
Органические кислоты	Пировиноградная	0.6	0.9	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.9	0.4	1.0	0.7	0.3	0.7	1.0	1.0
	Молочная	1.6	2.0	1.4	1.6	1.4	1.8	1.6	1.5	0.8	1.6	1.2	0.8	1.3	1.7	1.6
	Уксусная	1.9	2.4	1.7	1.9	1.7	2.2	1.9	1.9	1.2	3.4	1.6	0.8	1.7	2.1	2.0
	Гликолевая	2.7	3.4	2.1	2.6	2.2	2.8	2.7	2.1	1.2	2.4	1.7	1.6	2.0	2.5	2.3
	Аскорбиновая	4.6	5.8	3.2	4.5	3.8	4.6	4.6	4.4	3.0	3.6	2.9	2.2	3.6	4.7	4.3
	Фумаровая	7.5	9.9	5.8	7.9	7.6	8.7	8.1	16.6	6.3	22.5	11.4	3.6	10.6	14.2	17.4
	Глутаровая	11.3	14.4	9.5	11.7	10.3	13.2	11.9	14.4	5.4	16.3	8.9	2.3	11.2	14.1	14.3
	Янтарная	13.3	16.8	10.4	13.6	11.6	14.3	13.4	15.2	5.8	16.9	9.7	3.0	11.9	15.2	15.1
	Винная	19.6	24.4	12.1	18.8	14.5	18.4	18.4	15.1	6.3	13.7	9.4	7.0	12.6	16.6	15.0
Щавелевая	24.7	32.3	15.6	25.6	20.6	25.2	25.3	26.0	12.3	29.6	20.0	7.0	20.2	26.7	26.1	

Приложение 3 (продолжение)

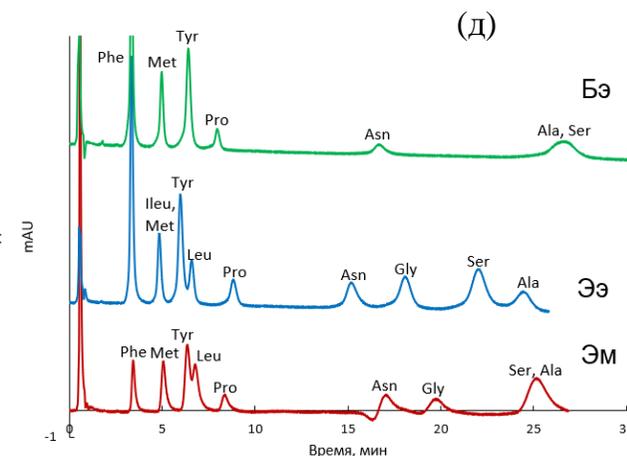
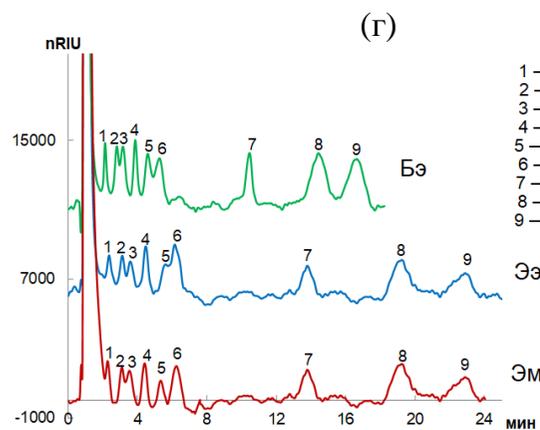
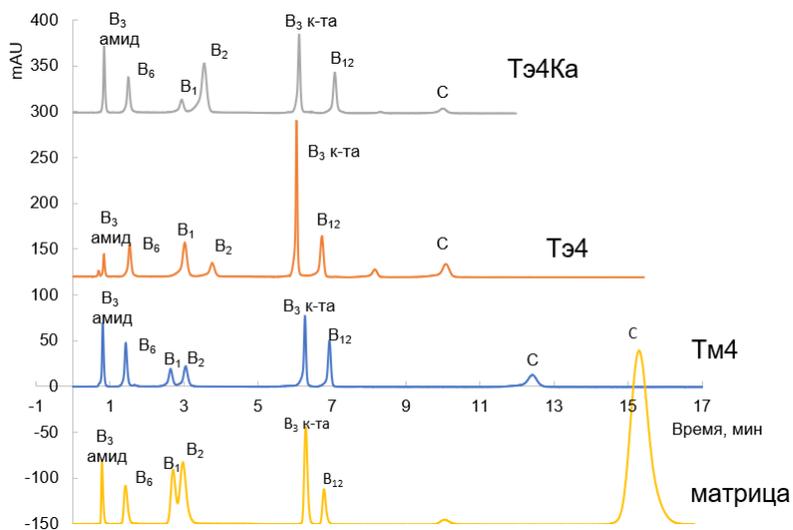
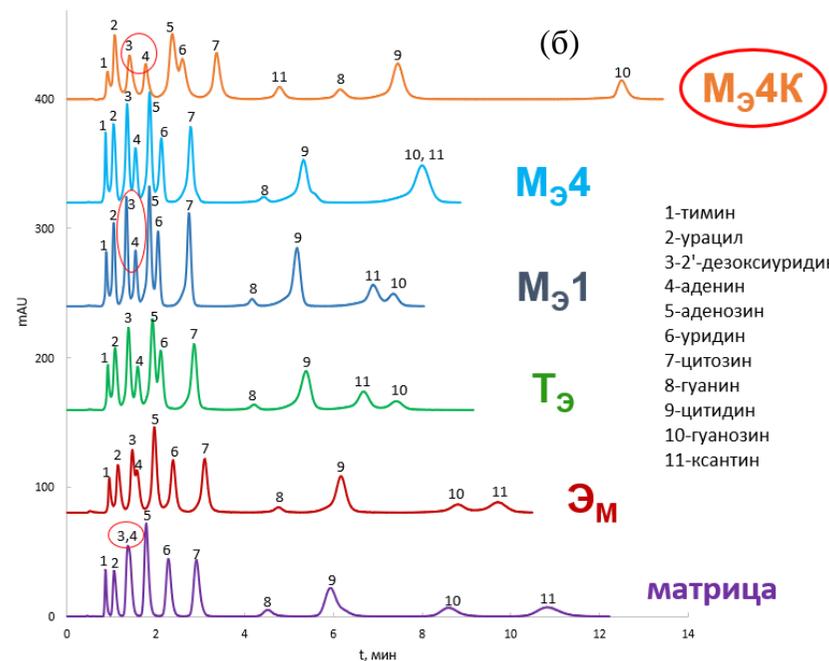
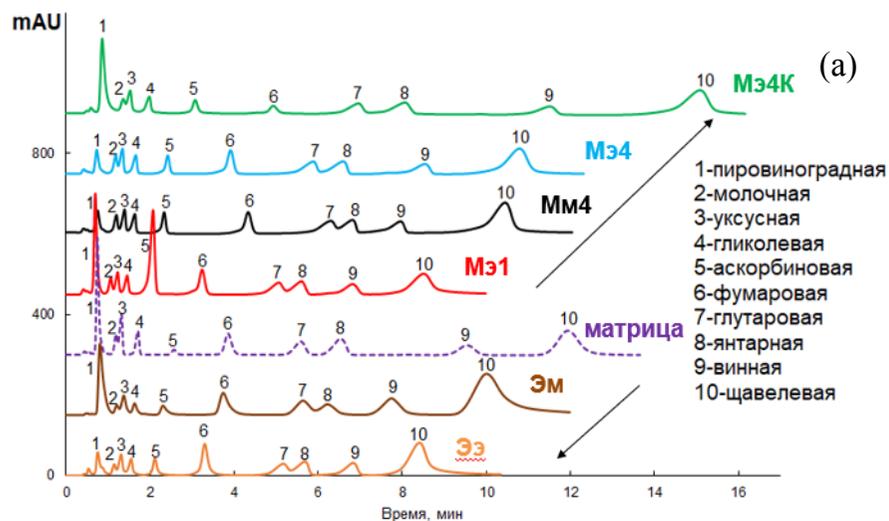
Коэффициенты селективности и эффективность индивидуальных соединений каждого класса (сахара – селективность рассчитана по фруктозе, азотистые – по аденину, В<sub>3</sub> к-та, С – по В<sub>12</sub>, В<sub>1</sub> – по В<sub>3</sub> амид, аминокислоты – по пролину, орг. кислоты – по гликолевой)

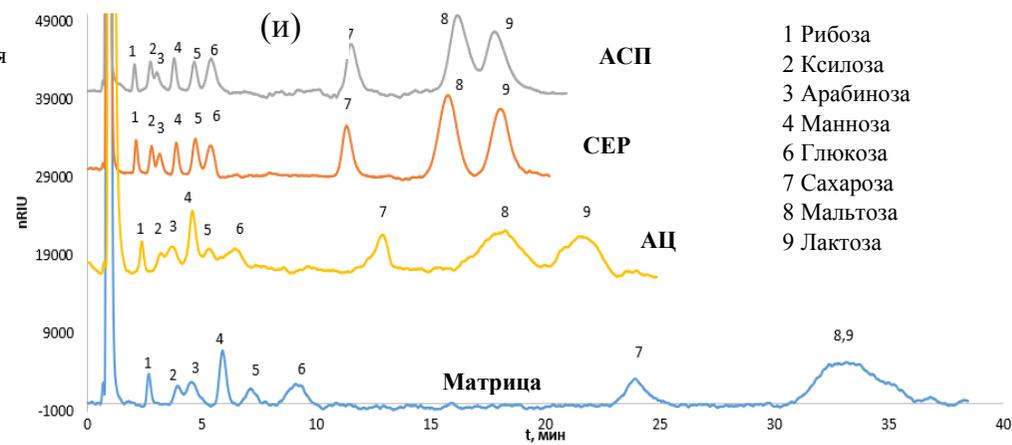
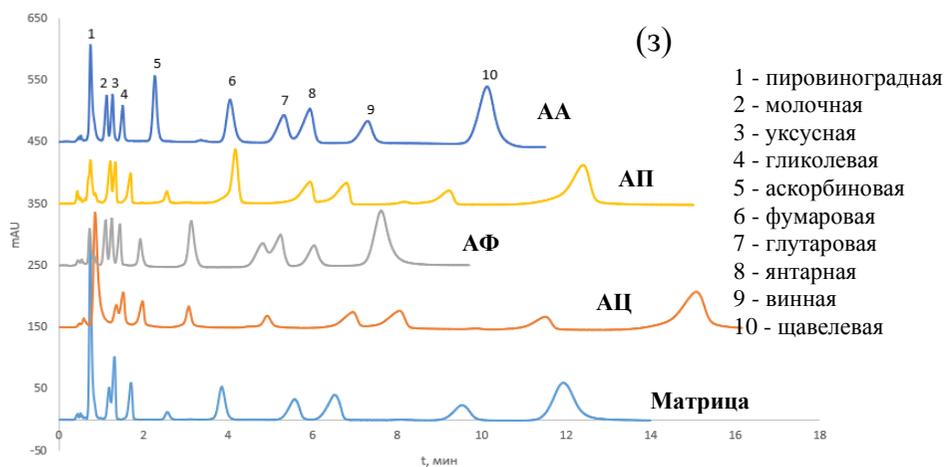
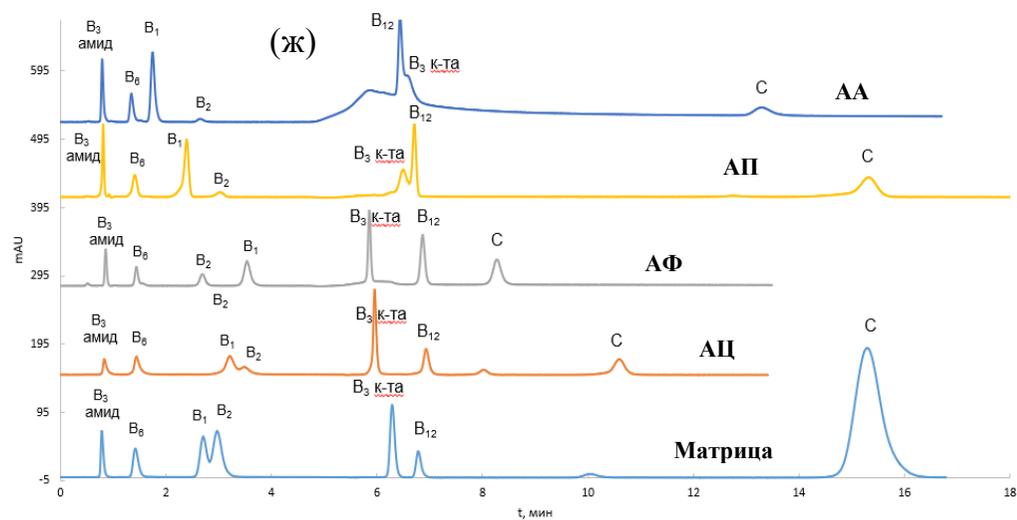
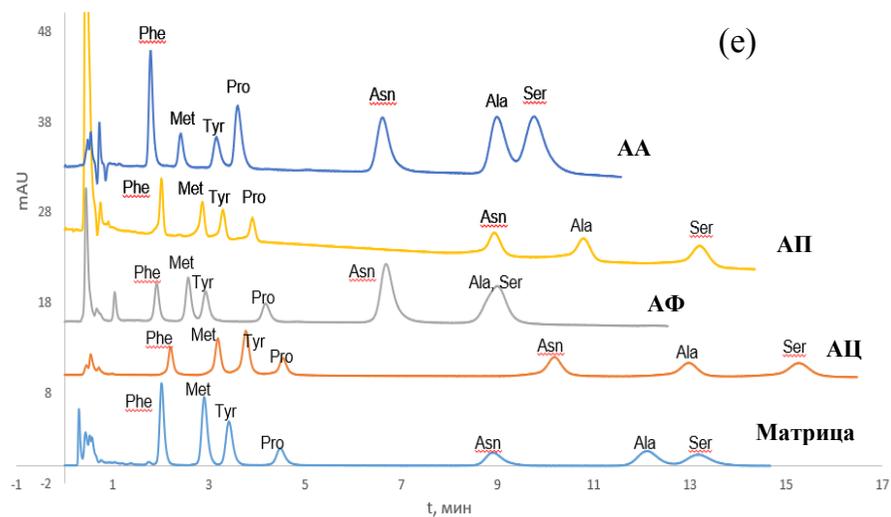
Параметр		Матрица	АЦ	АФ	АП	АА	СЕР	АСП	ПМ 1:0,01	ПА 1:0,1	ПА-с 1:0,1	ПАМ 1:0,1	ПАМ 1:1	ПАММ 1:0,1	ПАА 1:0,1	ПАА 1:0,3	
Коэффициенты селективности	Сах.	Сахароза	4.6	3.3	3.5	3.1	3.1	3.5	3.6	2.4	2.3	3.4	2.4	2.1	3.0	3.1	2.8
		Мальтоза	6.4	4.8	4.7	4.3	4.5	5.0	5.2	3.0	3.0	4.5	3.6	2.9	4.1	4.5	3.8
		Лактоза	6.4	5.7	5.4	5.3	5.1	5.7	5.8	2.8	2.5	4.3	3.3	2.9	4.3	4.8	3.9
	Азотист	Гуанин	4.5	4.3	3.3	4.1	4.1	3.6	4.0	3.8	4.5	4.0	4.5	6.2	3.6	3.9	4.0
		Цитидин	6.1	5.2	4.0	5.3	3.9	4.4	4.8	1.9	1.8	1.9	2.6	5.1	2.6	2.6	2.5
		Гуанозин	9.0	9.2	4.9	8.6	7.3	6.6	7.5	5.5	6.0	0	7.5	10.2	5.9	6.1	6.3
		Ксантин	11.5	3.2	6.0	10.4	9.7	6.2	7.6	10.8	4.3	3.9	3.6	1.7	6.4	8.9	9.0
	Вит.	В <sub>1</sub>	7.3	7.8	9.1	6.0	4.3	6.4	6.3	1.8	2.6	2.1	3.2	8.7	2.8	2.5	2.5
		В <sub>3</sub> к-та	0.9	0.4	0.5	0.8	1.1	0.7	0.7	2.7	2.1	2.6	1.5	0.4	1.6	—	2.3
		С	4.0	1.8	1.2	3.5	3.8	2.2	2.6	8.1	3.2	7.3	4.4	2.0	3.9	—	6.5
	АК	Аспарагин	2.1	2.4	1.7	2.5	2.0	2.3	2.4	2.8	2.1	2.1	1.5	2.4	2.4	2.7	2.6
		Серин	3.2	3.6	2.3	3.8	2.8	3.3	3.5	5.1	3.9	3.7	2.7	3.3	3.9	4.4	4.3
		Аланин	2.9	3.1	2.4	3.0	2.6	2.8	2.9	3.6	3.2	2.7	1.9	4.0	3.1	3.2	3.2
	К-ты	Янтарная	4.9	5.0	4.9	5.1	5.2	5.1	4.9	7.1	4.7	7.1	5.9	2.0	6.1	6.0	6.7
		Винная	7.3	7.2	5.7	7.1	6.6	6.6	6.8	7.1	5.0	5.8	5.7	4.6	6.5	6.6	6.7
Щавелевая		9.2	9.6	7.3	9.7	9.3	9.0	9.3	12.2	9.9	12.4	12.1	4.6	10.4	10.6	11.4	
Эффективность (N×10 <sup>-3</sup> . тт/м)	Углеводы	Рибоза	6	7	4	10	7	9	10	4	4	2	8	5	4	4	3
		Ксилоза	7	5	6	5	9	11	8	8	4	3	6	4	4	7	4
		Арабиноза	8	3	5	4	5	8	6	4	2	4	1	-	4	4	2
		Фруктоза	10	11	10	10	10	17	12	4	4	7	7	1	6	6	2
		Манноза	10	14	8	4	8	13	13	4	3	10	5	2	6	7	3
		Глюкоза	7	6	4	5	5	10	6	4	3	6	3	1	5	4	2
		Сахароза	5	16	22	28	20	24	22	6	3	16	5	3	11	8	3
		Мальтоза	5	5	11	5	8	16	18	4	2	6	3	3	4	5	2
		Лактоза	7	9	15	10	15	22	18	3	2	5	2	2	5	6	2
	Азотист	Тимин	22	7	14	22	14	15	16	15	11	14	9	10	13	6	10
		Урацил	10	8	19	26	11	10	10	15	11	15	9	8	16	11	12
		2'-дезоксуридин	19	6	20	33	26	13	14	17	10	10	9	6	17	4	11
		Аденин	17	14	24	34	28	12	16	11	10	8	9	8	15	6	12
		Аденозин	17	24	25	35	28	14	17	15	11	10	9	7	17	3	12

Параметр		Матри- ца	АЦ	АФ	АП	АА	СЕР	АСП	ПМ 1:0,01	ПА 1:0,1	ПА-с 1:0,1	ПАМ 1:0,1	ПАМ 1:1	ПАММ 1:0,1	ПАА 1:0,1	ПАА 1:0,3	
	Витамины	Уридин	19	34	26	42	31	27	21	19	12	10	9	8	18	5	13
		Цитозин	23	26	30	53	35	33	27	16	13	12	11	14	19	15	18
		Гуанин	22	37	28	52	33	33	26	9	8	10	8	10	10	8	12
		Цитидин	22	42	33	54	36	37	32	22	13	13	10	12	19	9	18
		Ксантин	21	17	29	34	23	34	30	7	4	-	7	8	8	5	10
		Гуанозин	25	31	30	52	37	36	27	22	13	10	11	10	18	7	17
	Витамины	В <sub>3</sub> амид	12	8	21	24	19	13	12	12	12	8	10	6	15	11	10
		В <sub>6</sub>	9	11	28	29	22	17	15	15	12	8	9	6	16	9	12
		В <sub>2</sub>	19	28	40	44	27	27	24	12	12	5	8	4	17	7	7
		В <sub>1</sub>	19	30	31	41	26	31	26	14	11	6	6	8	11	3	11
		В <sub>3</sub> к-та	26	30	42	56	38	41	36	18	14	9	9	10	22	23	22
		В <sub>12</sub>	20	33	31	39	25	30	27	15	8	-	1	2	13	-	1
	Аминокислоты	С	25	50	40	60	41	44	38	21	6	10	12	16	22	33	27
		Фенилаланин	12	25	25	41	22	24	23	10	3	5	5	8	13	14	9
		Метионин	16	37	27	45	26	30	28	19	10	5	8	8	15	19	13
		Тирозин	17	37	27	47	25	29	27	16	7	6	5	7	12	15	10
		Пролин	29	44	36	61	30	34	31	21	15	3	8	8	20	26	19
		Аспарагин	20	49	30	55	29	38	34	19	10	6	7	8	16	27	13
	Органические кислоты	Аланин	38	56	43	60	31	43	38	36	13	8	16	8	19	25	10
		Серин	20	58	35	62	24	40	33	19	10	8	5	5	14	21	20
		Пировиноградная	6	4	7	7	7	5	5	8	5	3	6	5	12	12	6
		Молочная	12	15	14	12	17	15	14	19	9	6	7	8	14	15	15
		Уксусная	15	12	22	21	26	16	13	18	10	3	8	7	18	18	18
		Гликолевая	18	16	22	22	25	21	20	21	10	6	10	9	18	19	19
		Аскорбиновая	18	33	24	42	27	27	26	25	3	5	6	9	25	23	23
		Фумаровая	17	39	24	41	25	25	27	19	5	3	3	3	21	21	17
		Глутаровая	15	21	23	24	23	26	22	19	5	3	3	5	21	21	17
		Янтарная	18	20	25	29	29	29	26	25	5	3	4	7	24	24	16
	Винная	21	39	30	42	32	37	32	10	7	4	5	2	25	26	23	
	Щавелевая	17	35	24	40	33	29	26	18	7	2	5	6	19	24	10	

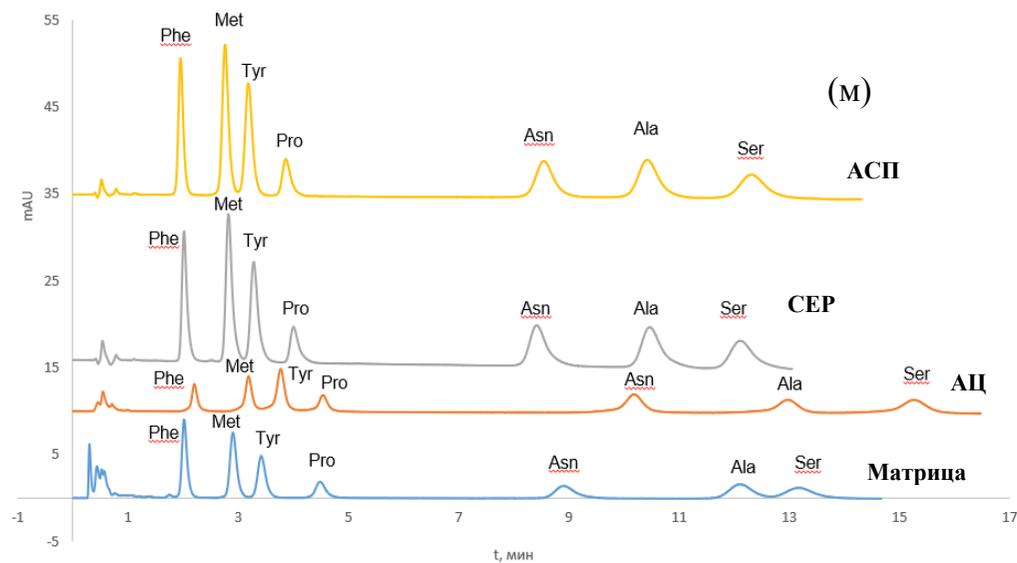
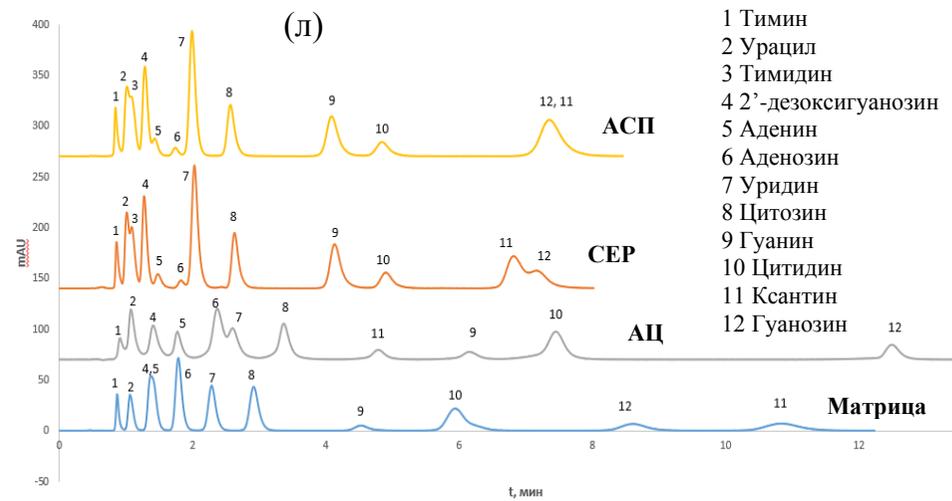
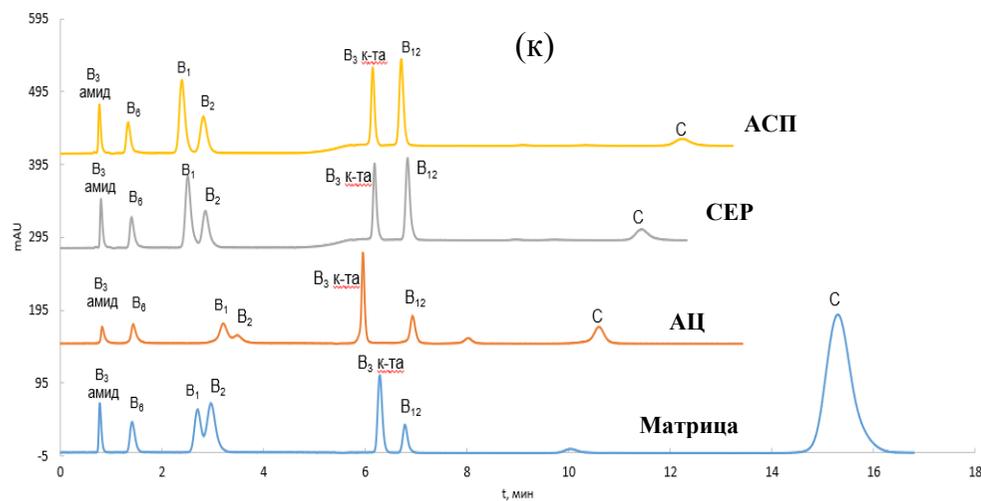
Приложение 3(продолжение)

Примеры хроматограмм модельных смесей аналитов: а, з – органических кислот, б, л – азотистых оснований и нуклеозидов, в, ж, к, н – витаминов, г, и – сахаров, д, е, м, о - аминокислот (условия указаны в табл. 9)

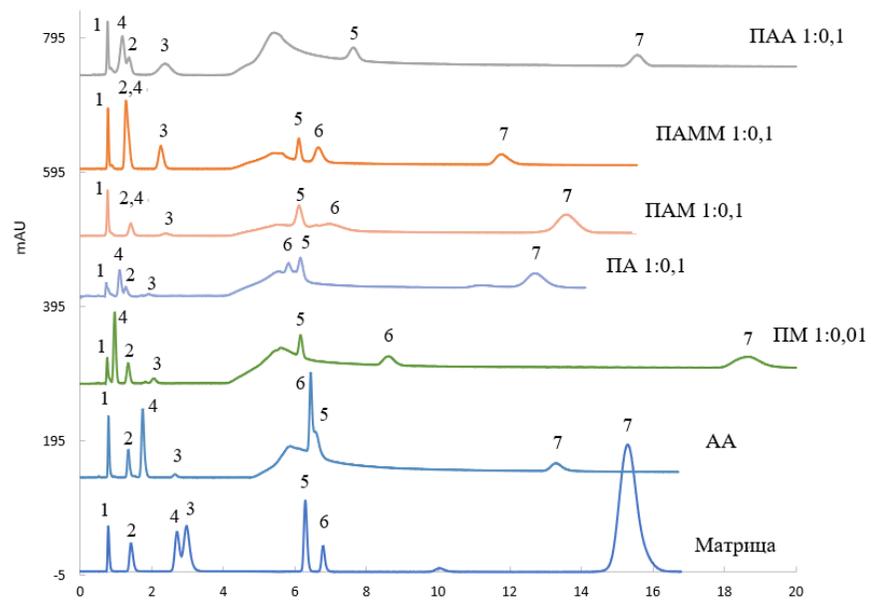




Приложение 4 (продолжение)

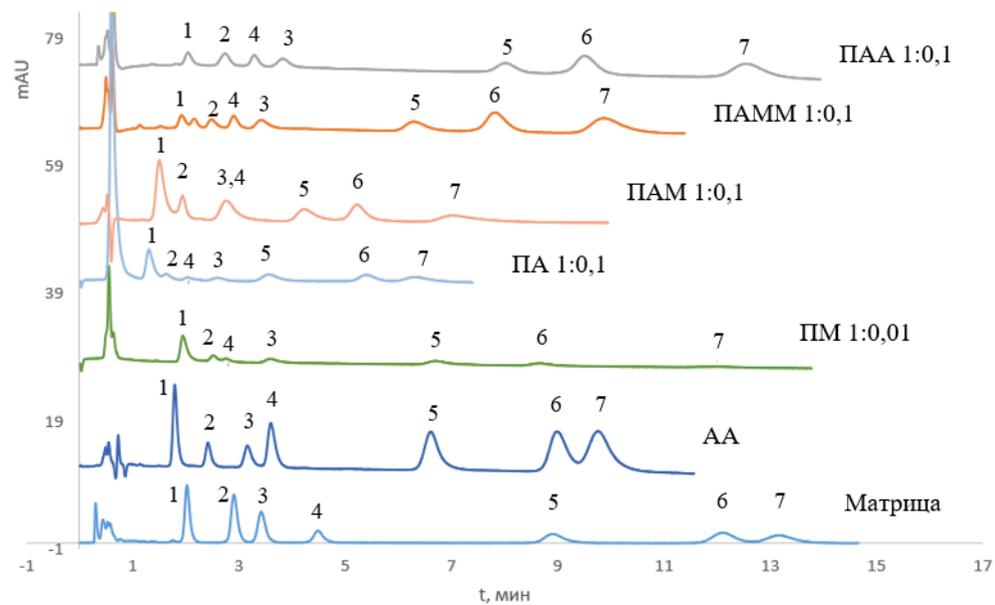


(н)



- |                         |                            |
|-------------------------|----------------------------|
| 1 - В <sub>3</sub> амид | 5 - В <sub>3</sub> кислоты |
| 2 - В <sub>6</sub>      | 6 - В <sub>12</sub>        |
| 3 - В <sub>2</sub>      | 7 - С                      |
| 4 - В <sub>1</sub>      |                            |

(о)



- |                 |               |
|-----------------|---------------|
| 1 - Фенилаланин | 5 - Аспарагин |
| 2 - Метпонин    | 6 - Аланин    |
| 3 - Тирозин     | 7 - Серин     |
| 4 - Пролин      |               |

## Список литературы

1. *Greco G., Letzel T.* Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations // *J. Chromatogr. Sci.* 2013. V. 51. P. 684–693.
2. *Buszewski B., Nova. S.* Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) — a powerful separation technique // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. P. 231–247.
3. *Сапрыкин Л.В., Киселева Н.В., Васильев В.Н.* Хроматографический анализ витамина В6 и полупродуктов его синтеза // *Заводская лаборатория.* 1990. Т. 56 С. 49–54.
4. *Гусаров А.Л., Сапрыкин Л.В., Киселева Н.В.* Методика определения пантотената кальция методом ВЭЖХ с применением нетрадиционного режима хроматографии на силикагеле // *Заводская лаборатория.* 1992. Т. 58. С. 7–9.
5. *Kumar A., Heaton J.C., McCalley D. V.* Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1276. P. 33–46.
6. *Jandera P., Janás P.* Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review // *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 967. P. 12–32.
7. *Чернобровкина А.В., Смоленков А.Д., Шнигун О.А.* Гидрофильная хроматография - перспективный метод определения полярных веществ // *Лаборатория и производство.* 2018. Т. 4. С. 76–92.
8. *Jin G., Guo Z., Zhang F., Xue X., Jin Y., Liang X.* Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography // *Talanta.* 2008. V. 76. P. 522–527.
9. <http://www.obrnutafaza.hr/pdf/tosoh/kolone/TSKgel-HILIC.pdf>
10. *Schlichtherle-Cerny H., Affolter M., Cerny C.* Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography coupled to electrospray Mass Spectrometry of small polar compounds in food analysis // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. P. 2349–2354.
11. *Tanaka H., Zhou X., Masayoshi O.* Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 987. P. 119–125.
12. *Oyler A., Armstrong B., Cha J., Zhou M., Yang Q., Robinson R., Dunphy R., Burinsky D.* Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 724 P. 378–383.
13. *MacMahon S., Begley T., Diachenko G., Stromgren S.* A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of economically motivated adulteration in protein-containing foods // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1220 P. 101–107.
14. *Riordáin C.Ó., Nesterenko P., Paull B.* Zwitterionic ion chromatography with carboxybetaine surfactant-coated particle packed and monolithic type columns // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1070. P. 71–78.

- 
15. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/TG-21003-HILIC-Separations-TG21003-EN.pdf>
  16. *Qiao L., Shi X., Xu G.* Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 81. P. 23–33.
  17. *Qiao X., Zhang L., Zhang N., Wang X., Qin X., Yan H.* Imidazolium embedded C8 based stationary phase for simultaneous reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1400. P. 107–116.
  18. *Fan C., Liu B., Li H., Quan K., Chen J., Qiu H.* N-Vinyl pyrrolidone and undecylenic acid copolymerized on silica surface as mixed-mode stationary phases for reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2021. V. 1655. P. 462534.
  19. *Ray S., Takafuji M., Ihara H.* Chromatographic evaluation of a newly designed peptide-silica stationary phase in reverse phase liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography: Mixed mode behavior // *J. Chromatogr. A.* 2012. V.1266. P.43-52.
  20. *Ohyama K., Takasago S., Kishikawa N., Kuroda N.* Poly(L-lactic acid)-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* 2015. V. 38. P.720.
  21. *Wang X., Peng J., Peng H., Chen J., Xian H., Ni R., Li S., Long D., Zhang Z.* Preparation of two ionic liquid bonded stationary phases and comparative evaluation under mixed-mode of reversed phase/ hydrophilic interaction/ ion exchange chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2019. V. 1605. P. 460372.
  22. *Iverson C.D., Lucy C.A.* Aniline-modified porous graphitic carbon for hydrophilic interaction and attenuated reverse phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1373. P. 17-24.
  23. *Shen A., Guo Z., Cai X., Xue X., Liang X.* Preparation and chromatographic evaluation of a cysteine-bonded zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1228. P. 175–182.
  24. *Shen A., Guo Z., Yu L., Cao L., Liang X.* A novel zwitterionic HILIC stationary phase based on "thiol-ene" click chemistry between cysteine and vinyl silica // *Chem. Commun.* 2011. V.47. P. 4550-4552.
  25. *Shen A., Guo Z., Cai X., Xue X., Liang X.* Preparation and chromatographic evaluation of a cysteine-bonded zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1228. P.175-182.
  26. *Li Y., Zhu N., Chen T., Wei M., Ma Y.* Stationary phase based on  $\beta$ -cyclodextrin and poly(N-isopropylacrylamide) for HILIC and RPLC // *Chromatographia.* 2016. V. 79. P. 29-36.

- 
27. Guo Z., Jin Y., Liang T., Liu Y., Xu Q., Liang X., Lei A. Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a "Click  $\beta$ -cyclodextrin" stationary phase // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. P. 257-263.
28. Zhou H., Chen J., Li H., Quan K., Zhang Y., Qiu H. Imidazolium ionic liquid-enhanced poly(quinine)-modified silica as a new multi-mode chromatographic stationary phase for separation of achiral and chiral compounds // *Talanta*. 2020. V. 211. P. 120743.
29. Luo P., Peng J., Peng H., Zhang Z., Chen J., Fan K., Wang X. Preparation of three regioisomeric ionic liquid stationary phases and investigation of their retention behavior // *J. Chromatogr. A*. 2023. V.1689. P. 463773.
30. Qiao L., Lv W., Chang M., Shi X., Xu G. Surface-bonded amide-functionalized imidazolium ionic liquid as stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1559. P. 141–148.
31. Popov A.S., Spiridonov K.A., Uzhel A.S., Smolenkov A.D., Chernobrovkina A.V., Zatirakha A.V. Prospects of using hyperbranched stationary phase based on poly(styrene-divinylbenzene) in mixed-mode chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2021. V. 1642. P. 462010.
32. Лусичкин Г.В., Фадеев А.А., Сердан А.А., Нестеренко П.Н., Мингалев П.Г., Фурман Д.Б. Химия привитых поверхностных соединений. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. 592. С.
33. Claessens H.A., van Straten M.A., Kirkland J.J. Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 728. P. 259-270.
34. Borges E.M. Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography // *J. Chromatogr. Sci*. 2015. V. 53. P. 580-597.
35. Попов А.С., Царенко Е.А., Чернобровкина А.В. Сорбенты на основе диоксида титана для гидрофильной хроматографии // *Журн. аналит. Химии*. 2021. Т.76. С. 916-926.
36. Wang Q., Li J., Yang X., Xu L., Shi Z.G., Xu L.Y. Investigation on performance of zirconia and magnesia–zirconia stationary phases in hydrophilic interaction chromatography // *Talanta*. 2014. V. 129. P. 438-447.
37. Pereira L. Porous Graphitic Carbon as a Stationary Phase in HPLC: Theory and Applications // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*. 2008. V. 31. P. 1687–1731.
38. Geng H., Wang Z., Zhang F., Li Z., Yang B. A hyperbranched polyglycerol-functionalized polymer polar stationary phase // *J. Chromatogr. A*. 2022. V. 1670. P. 462946.
39. Chicz R.M., Shi Z., Regnier F.E. Preparation and evaluation of inorganic anion-exchange sorbents not based on silica // *J. Chromatogr. A*. 1986. Vol. 359. P. 121-130.

- 
40. *Shchukina O.I., Zatirakha A.V., Uzhel A.S., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Novel polymer-based anion-exchangers with covalently-bonded functional layers of quaternized polyethyleneimine for ion chromatography // *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 964. P.187-194.
41. *Горбовская А.В., Попкова Е.К., Ужель А.С., Шпигун О.А., Затираха А.В.* Сорбенты на основе полистирол–дивинилбензола с привитым гидрофилизованным полиэтиленимином для ионной и гидрофильной хроматографии // *Журн. аналит. Химии.* 2023. Т.78. С. 507-519.
42. *Schmitt M., Egorycheva M., Frerichs D., Fiedler S., Graumann P., Seubert A.* Factors affecting mixed-mode retention properties of cation-exchange stationary phases // *J. Chromatogr. A.* 2023. V. 1695. P. 463934.
43. *Стыскин Е. Л., Ицксон Л. Б., Брауде Е. В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. С. 91.
44. *Ghamat S., Talebpour Z., Mehdi A.* Click reactions: Recent trends in preparation of new sorbents and stationary phases for extraction and chromatographic applications // *Trends in Anal. Chem.* 2019. V. 118. P. 556-573.
45. *Лошин А.А.* Новые ионообменники на основе силикагеля, поверхностно-модифицированного поливинилпиридином и полиэтиленимином, для ионохроматографического определения анионов. Дисс. канд. хим. наук. Москва. 2016.
46. *Schuster G., Lindner W.* Chocolate HILIC phases: Development and characterization of novel saccharide-based stationary phases by applying non-enzymatic browning (Maillard reaction) on amino-modified silica surfaces // *Anal. Bioanal. Chem.* V. 400. P. 2539–2554.
47. *Zhan W., Zhang Y., Zhang G., Bai X., Xia S., Zhao W., Yi D., Zhang S.* Tetraproline-modified calix[4]arene-bonded silica stationary phase for simultaneous reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography // *J. Sep. Sci.* 2019. V. 42. P.1299–1476.
48. *Gezici O., Kara H.* Towards multimodal HPLC separations on humic acid-bonded aminopropyl silica: RPLC and HILIC behavior // *Talanta* 2011 V.85. P. 1472.
49. *Попов А.С., Максимов Г.С., Шпигун О.А., Чернобровкина А.В.* Сорбенты с ковалентно привитым полимерным слоем для гидрофильной хроматографии // *Журн. аналит. химии.* 2022. Т. 77. № 9. С. 849.
50. *Yaroshenko D.V., Grigoriev A.V., Yaroshenko I.S., Sidorova A.A., Kryshen K.L., Chernobrovkin M.G., Zatirakha A.V., Chernobrovkina A.V.* Hydrophilic interaction liquid chromatography method for eremomycin determination in pre-clinical study// *J. Chromatogr. A.* 2021. V. 1637. P. 461750.
51. *Zhou D., Zeng J., Fu Q., Gao D., Zhanga K., Ren X., Zhou K., Xi Z., Wang L.* Preparation and evaluation of a reversed-phase/hydrophilic interaction/ion-exchange

---

mixed-mode chromatographic stationary phase functionalized with dopamine-based dendrimers // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1571. P. 165.

52. *Gargano A. F.G, Leek T., Lindnera W., Lämmerhofer M.* Mixed-mode chromatography with zwitterionic phosphopeptidomimetic selectors from Ugi multicomponent reaction // *J. Chromatogr. A*. 2013. V. 1317. P. 12-21.

53. *Ferreira C. C., Gama M. R., Silva G. S., Pereira A. W., Collins C. H, Jardim I. C. S.* Synthesis and evaluation of a pentafluorobenzamide stationary phase for HPLC separations in the reversed phase and hydrophilic interaction modes // *J. Sep. Sci.* 2018. V. 41. P. 1– 22.

54. *Kotoni D., D'Acquarica I., Ciogli A., Villani C., Capitani D., Gasparrini F.* Design and evaluation of hydrolytically stable bidentate urea-type stationary phases for hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2012. V. 1232. P. 196-211.

55. *Moni L., Ciogli A., Acquarica I., Dondoni A., Gasparrini F., Marra A.* Synthesis of sugar-based silica gels by copper-catalysed azide–alkyne cycloaddition via a single-step azido-activated silica intermediate and the use of the gels in hydrophilic interaction chromatography // *Chem. Eur. J.* 2010. V. 16. P. 5712 – 5722.

56. *Fu Q, Guo Z., Liang T., Zhang X., Xua Q., Liang X.* Chemically bonded maltose via click chemistry as stationary phase for HILIC // *Anal. Methods*. 2010. V. 2. P. 217-224.

57. *Khoury G.E., Rowe L.A., Lowe C.R.* Biomimetic Affinity Ligands for Immunoglobulins Based on the Multicomponent Ugi Reaction // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 800. P.57-74.

58. *Hoppe D., Schöllkopf U.* Synthesen mit  $\alpha$ -metallierten Isocyaniden XIII. Neue Synthese von 2-Imidazolinen // *Liebigs Ann. Chem.* 1972. Bd. 763. S. 1.

59. *Ugi I., Dömling A.* Multicomponent Reactions with Isocyanides // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000. V. 39, P.3168-3210.

60. *Миронов М. А., Бабаев Е. В.* Параллельная реакция Уги в студенческих практикумах Урала и Москвы // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)*. 2009. Т. 53. № 5. С. 139.

61. *Xu S., Cui S.* SuFExable Isocyanides for Ugi Reaction: Synthesis of Sulfonyl Fluoro Peptides // *Org. Lett.* 2021. V. 23. P. 5197–5202.

62. *Иванцова М.И.* Реакция Уги и Пассерини в различных средах и в присутствии катализаторов. Дисс. канд. хим. наук. Екатеринбург. 2006. 160 с.

63. *Ugi I., Lohberger S., Karl R.* The Passerini and Ugi Reactions // *Compr. Org. Synth.*, Elsevier. 1991. P. 1083–1109.

64. *Marcaccini S., Torroba T.* The use of the Ugi four-component condensation // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 632–639.

65. *Strocker A., Keating T., Tempest P., Armstrong R.* Use of a convertible isocyanide for Generation of Ugi Reaction derivatives on solid support: synthesis of  $\alpha$ -acylaminoesters and pyrroles // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 1149–1152.

- 
66. *Ali El-Remaily M.A.E.A.A., Soliman A.M.M., Elhady O.M.* Green Method for the Synthetic Ugi Reaction by Twin Screw Extrusion without a Solvent and Catalyst // *ACS Omega*. 2020. V. 5. P. 6194–6198.
67. *Abdelraheem E.M.M., Khaksar S., Kurpiewska K., Kalinowska-Tuścik J., Shaabani S., Dömling A.* Two-Step Macrocyclic Synthesis by Classical Ugi Reaction // *J. Org. Chem.* 2018. V. 83. P. 1441–1447.
68. *Berłozeki S., Szymanski W., Ostaszewski R.* Application of isocyanides derived from  $\alpha$ -amino acids as substrates for the Ugi reaction // *Synth. Commun.* 2008. V. 38. P. 2714–2721.
69. *Zhdanko A.G., Gulevich A. V., Nenajdenko V.G.* One-step synthesis of N-acetylcysteine and glutathione derivatives using the Ugi reaction // *Tetrahedron*. 2009. V. 65. P. 4692–4702.
70. *Godet T., Bonvin Y., Vincent G., Merle D., Thozet A., Ciufolini M.A.* Titanium catalysis in the Ugi reaction of  $\alpha$ -amino acids with aromatic aldehydes // *Org. Lett.* 2004. V. 6. P. 3281–3284.
71. *Brandão P., Puerta A., Padrón J.M., Kuznetsov M.L., Burke A.J., Pineiro M.* Ugi Adducts of Isatin as Promising Antiproliferative Agents with Druglike Properties // *Asian J. Org. Chem.* 2021. V. 10. P. 3434–3455.
72. *Cristau P., Vors J.P., Zhu J.* A rapid access to biaryl ether containing macrocycles by pairwise use of Ugi 4CR and intramolecular S<sub>N</sub>Ar-based cycloetherification // *Org. Lett.* 2001. V. 3. P. 4079–4082.
73. *Yang B., Zhao Y., Wei Y., Fu C., Tao L.* The Ugi reaction in polymer chemistry: syntheses, applications and perspectives // *Polym. Chem.* 2015. V. 6. P. 8233–8239.
74. *Yang B., Zhao Y., Fu C., Zhu C., Zhang Y., Wang S.* Introducing the Ugi reaction into polymer chemistry as a green click reaction to prepare middle-functional block copolymers // *Polym. Chem.* 2014. V. 5. P. 2704–2708.
75. *Shen H., Ma H., Liu P., Huang W., Han L., Li C.* Facile Synthesis of In-Chain, Multicomponent, Functionalized Polymers via Living Anionic Copolymerization through the Ugi Four-Component Reaction (Ugi-4CR) // *Macromol. Rapid Commun.* 2017. V. 38. P. 1–6.
76. *Icart L. P., Santos E. R. F., Pereira E. D., Ferreira S. R., Saez V., Ramon J. A., Nele M., Pinto J. C. S., Toledo R. D., Silva D. Z., Souza Jr F. G.* PLA-b-PEG/magnetite hyperthermic agent prepared by Ugi four component condensation // *Express Polym. Lett.* 2016. V.10. P. 188–203.
77. *Brahmachary E., Ling F.H., Svec F., Fréchet J.M.J.* Chiral recognition: Design and preparation of chiral stationary phases using selectors derived from Ugi multicomponent condensation reactions and a combinatorial approach // *J. Comb. Chem.* 2003. V. 5. P. 441–450.

- 
78. Qian J., El Khoury G., Issa H., Al-Qaoud K., Shihab P., Lowe C.R. A synthetic Protein G adsorbent based on the multi-component Ugi reaction for the purification of mammalian immunoglobulins // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 898. P. 15–23.
79. Gargano A.F.G., Lindner W., Lämmerhofer M. Phosphopeptidomimetic substance libraries from multicomponent reaction: Enantioseparation on quinidine carbamate stationary phase // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1310. P. 56–65.
80. Sýkora D., Záruba K., Butnariu M., Tatar A., Pham H.M., Studenovský M., Řezanka P., Král V. New multimodal stationary phases prepared by Ugi multicomponent approach // *J. Sep. Sci.* 2020. V. 43. P. 4178–4190.
81. Chu Z., Zhang L., Zhang W. Preparation and Evaluation of Maltose Modified Polymer-silica Composite Based on Cross-linked Poly Glycidyl Methacrylate as High Performance Liquid Chromatography Stationary Phase // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V.1036. P. 179-186.
82. Liu X., Jiang Y., Zhang F., Li Z., Yang B. Preparation and evaluation of a polymer-based sulfobetaine zwitterionic stationary phase // *J. Chromatogr. A.* 2021. V. 1649. P. 462229.
83. Taniguchi A., Tamura S., Ikegami T. The relationship between polymer structures on silica particles and the separation characteristics of the corresponding columns for hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2020. V. 1618. P. 460837.
84. Zhou D., Luo Q., Zeng Q., Zheng Y., Ren X., Gao D., Fu Q., Zhang K., Xia Z., Wang L. Preparation of an aminophenylboronic acid and N-isopropyl acrylamide copolymer functionalized stationary phase for mixed-mode chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2020. V. 1627 P. 461423.
85. Geng H., Jing J., Zhang F., Zhang F., Yang B. A polar stationary phase obtained by surface-initiated polymerization of hyperbranched polyglycerol onto silica // *Talanta.* 2020. V. 209. P.120525.
86. Hu Y., Cai T., Zhang H., Chen J., Li Z., Qiu H. Poly(itaconic acid)-grafted silica stationary phase prepared in deep eutectic solvents and its unique performance chromatography // *Talanta.* 2019. V. 191. P. 265-271.
87. Yang B., Cai T., Li Z., Guan M., Qiu H. Surface radical chain-transfer reaction in deep eutectic solvents for preparation of silica-grafted stationary phases in hydrophilic interaction chromatography // *Talanta.* 2017. V. 175. P. 256-263.
88. Yang D., Yu D.P., Dong X.F., Shen A.J., Jin G.W., Guo Z.M., Yan J.Y., Liu M.Y., Liang X.M. Chemically bonded polyacrylamide via thiol-ene click chemistry as separation materials for hydrophilic interaction liquid chromatography // *Chin. J. Anal. Chem.* 2015. V. 43. P.1439–1444.
89. Попов А.С., Максимов Г.С., Смоленков А.Д., Штигун О.А., Чернобровкина А.В. Новые сорбенты для гидрофильной хроматографии на основе силикагеля,

---

ковалентно модифицированного полиэтиленгликолем // Вест. Моск. Ун-та. Сер 2. Химия. 2021. Т. 62, № 2. С. 164–174.

90. *Hanson M., Unger K.* Polymer coatings as stationary phases in high-performance liquid chromatography // *Trends Anal. Chem.* 1992. V. 71. P. 368-373.

91. *Peng Y., Hou Y., Zhang F. Shen G., Yang B.* A hyperbranched polyethylenimine functionalized stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. P. 3633-3638.

92. *Попов А.С.* Новые неподвижные фазы на основе различных матриц для гидрофильной хроматографии. Дисс. канд. хим. наук. Москва. 2022.

93. *Cavazzini A., Nadalini G., Dondi F., Gasparrini F., Ciogli A., Villani C.* Study of mechanisms of chiral discrimination of amino acids and their derivatives on a teicoplanin-based chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A.* 2004. V.1031. P. 143-158.

94. *Ekborg-Ott K.H., Liu Y., Armstrong D.W.* Highly enantioselective HPLC separations using the covalently bonded macrocyclic antibiotic, ristocetin A, chiral stationary phase // *Chirality.* 1998. V.10. P. 434-83.

95. *Lammerhofer M.* Review: Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. P. 814–856.

96. *Ribeiro A.R., Maia A.S., Cass Q.B., Tiritan M.E.* Enantioseparation of chiral pharmaceuticals in biomedical and environmental analyses by liquid chromatography: An overview // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 968. P. 8–21.

97. *Bosáková Z., Curinová E., Tesařová E.* Comparison of vancomycin-based stationary phases with different chiral selector coverage for enantioselective separation of selected drugs in high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1088. P. 94–103.

98. *Zhang Y. P., Li K., Xiong L.X., Wang B.J., Xie S.M., Zhang J.H., Yuan L.M.* “Click” preparation of a chiral macrocycle-based stationary phase for both normal-phase and reversed-phase high performance liquid chromatography enantioseparation // *J. Chromatogr. A.* 2022. V.1683. P. 463551.

99. *Ismail O.H., Antonelli M., Ciogli A., Villani, C., Cavazzini A., Catani M., Felletti S., Bell D.S., Gasparrini F.* Future Perspectives in High Efficient and Ultrafast Chiral Liquid Chromatography through Zwitterionic Teicoplanin-Based 2-Mm Superficially Porous Particles // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1520. P. 91–102.

100. *Ismail O.H., Antonelli M., Ciogli A., De Martino M., Catani M., Villani C., Cavazzini A., Ye M., Bell D.S., Gasparrini F.* Direct analysis of chiral active pharmaceutical ingredients and their counterions by Ultra High Performance Liquid Chromatography with macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A.* 2018. V. 1576. P. 42–50.

- 
101. *Ismail O.H., Ciogli A., Villani C., De Martino M., Pierini M., Cavazzini A., Bell D.S., Gasparri F.* Ultra-fast high-efficiency enantioseparations by means of a teicoplanin-based chiral stationary phase made on sub-2  $\mu\text{m}$  totally porous silica particles of narrow size distribution // *J. Chromatogr. A.* 2016. V.1427. P. 55-68.
102. *Zhang Z., Xia M., Huang P., Di B., Su M.* Preparation and evaluation of a bacitracin-bonded silica stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography // *Microchem. J.* 2021. V. 170. P. 106661.
103. *Федорова И.А.* Индивидуальные и смешанные сорбенты на основе эремомицина для хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Дисс. канд. хим. наук. Москва. 2017.
104. *Staroverov S.M., Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiyarov G.G., Katrukha G.S., Fedorova G.B.* New chiral stationary phase with macrocyclic glycopeptide antibiotic eremomycin chemically bonded to silica // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1108. P. 263-267.
105. *Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiyarov G.G., Staroverov S.M.* Sorbents with immobilized glycopeptide antibiotics for separating optical isomers by high-performance liquid chromatography // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. V. 42. P. 615-623.
106. *Кузнецов М.А., Нестеренко П.Н., Васияров Г.Г., Староверов С.М.* Высокоэффективная жидкостная хроматография энантиомеров  $\alpha$ -аминокислот на силикагеле с иммобилизованным эремомицином // *Журн. аналит. химии.* 2008. Т. 63. № 1. С. 64-72. (*Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiyarov G.G., Staroverov S.M.* High-performance liquid chromatography of  $\alpha$ -amino acid enantiomers on eremomycinmodified silica // *J. Anal. Chem.* 2008. V. 63. № 1. P. 57-64.)
107. *Шановалова Е.Н., Федорова И.А., Ананьева И.А., Штигун О.А.* Макроциклические антибиотики как хиральные селекторы в высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярном электрофорезе // *Журн. аналит. химии.* 2018. Т. 73. № 11. С. 1-14.
108. *M.A. Guarducci, Fochetti A., Ciogli A., Mazzocanti G.A.* Compendium of the Principal Stationary Phases Used in Hydrophilic Interaction Chromatography: Where Have We Arrived? // *Sep.* 2023. V. 10. P.22-42.
109. *Ji S., Zhang F., Luo X., Yang B., Jin G., Yan J., Liang X.* Synthesis of molecularly imprinted polymer sorbents and application for the determination of aminoglycosides antibiotics in honey // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1313. P. 113–118.
110. *Caia J., Chenga L., Zhaoa J., Fua Q., Jina Y., Kea Y., Liang X.* A novel polyacrylamide-based silica stationary phase for the separation of carbohydrates using alcohols as the weak eluent in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1524. P. 153-159.

- 
111. *Ohyama K., Inoue Y., Kishikawa N., Kuroda N.* Preparation and characterization of surfactin-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1371. P. 257–260.
112. *Sheng Q., Su X., Li X., Ke Y., Liang X.* A dextran-bonded stationary phase for saccharide separation // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1345. P.57–67.
113. *Bicker W., Wu J., Yeman H., Albert K., Lindner W.* Retention and selectivity effects caused by bonding of a polar urea-type ligand to silica: a study on mixed-mode retention mechanisms and the pivotal role of solute-silanol interactions in the hydrophilic interaction chromatography elution mode. // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 882–895.
114. *Zimmermann A., Horak J., Sievers-Engler A., Sanwald C., Lindner W., Kramer M., Lämmerhofer M.* Surface-crosslinked poly(3-mercaptopropyl)-methylsiloxane-coatings on silica as new platform for low-bleed mass spectrometry-compatible functionalized stationary phases synthesized via thiol-ene click reaction // *J. Chromatogr. A.* V. 1436. P.73–83.
115. *Jiang W., Fischer G., Girmay Y., Irgum K.* Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1127. P. 82–91.
116. *Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N.* Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 5903–5919.
117. *Dolci M.* Chromatographic Characterization of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography // *Tech. Note. Thermo Fisher Scientific.* 2013.
118. *Ibrahim M.E.A., Liu Y., Lucy C.A.* A simple graphical representation of selectivity in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1260. P. 126–131.
119. *Dinh N.P., Jonsson T., Irgum K.* Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 5880-5891.
120. *McCalley D.V.* Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1523. P. 49–71.
121. *Navarro-Reig M., Ortiz-Villanueva E., Tauler R., Jaumot J.* Modelling of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases using chemometric approaches // *Metabolites.* 2017. V. 7. P. 6–9.
122. *Lardeux H., Guillaume D., D’Atri V.* Comprehensive evaluation of zwitterionic hydrophilic liquid chromatography stationary phases for oligonucleotide characterization // *J. Chromatogr. A.* 2023. V. 1690. P. 463785.

- 
123. *Buszewski B., Skoczylas M.* Multi-Parametric Characterization of Amino Acid- and Peptide-Silica Stationary Phases // *Chromatographia*. 2019. V. 82. P. 153–166.
124. *Ikegami T., Taniguchi A., Okada T., Horie K., Arase S., Ikegami Y.* Functionalization using polymer or silane? A practical test method to characterize hydrophilic interaction chromatography phases in terms of their functionalization method // *J. Chromatogr. A*. 2021. V. 1638. 1–10.
125. *Fu Q., Liang T., Li Z., Xu X., Ke Y., Jin Y., Liang X.* Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a ‘click’ maltose column // *Carbohydr. Res.* 2013 V. 379. P. 13.
126. *Jenkins K.* HILIC separation of carbohydrates using BEH amide particle technology // *J. Chromatogr. Today*. 2015. V. 8. P. 14.
127. *Karlsson G., Winge S., Sandberg H.* Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1092. P. 246-249.
128. *Clement A., Yong D., Brechet C.* Simultaneous Identification of Sugars by HPLC Using Evaporative Light Scattering Detection (ELSD) and Refractive Index Detection (RI). Application to Plant Tissues // *J. Liq. Chromatogr.* 1992. V.15. P. 805–817.
129. *Yan X.* Chapter: Carbohydrate Analysis by HPLC. In book: *HPLC Principle, Practices and Procedures*. Yuegang Zou. 2014. P. 2-20.
130. *Chen Y., Bicker W., Wu J., Xie M., Lindner W.* Simultaneous Determination of 16 Nucleosides and Nucleobases by Hydrophilic Interaction Chromatography and Its Application to the Quality Evaluation of Ganoderma // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. P. 4243.
131. *Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D.* HILIC separation and quantitation of water-soluble vitamins using diol column // *J. Sep. Sci.* 2009. V. 32. P. 909-917.
132. *Langer S., Lodge J.K.* Determination of selected water-soluble vitamins using hydrophilic chromatography: A comparison of photodiode array, fluorescence, and coulometric detection, and validation in breakfast cereal matrix // *J. Chromatogr. B*. 2014. V. 960. P. 73-81.
133. *Tsochatzis E., Papageorgiou M., Kalogiannis S.* Validation of a HILIC UHPLC-MS/MS Method for Amino Acid Profiling in Triticum Species Wheat Flours // *Foods*. 2019. V 8. P. 514.
134. *Themelis T., Gotti R., Gatti R.* A novel hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of underivatized amino acids in alimentary supplements // *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 2017. V. 145. P. 751-757.
135. *Marrubini G., Pedrali A., Hemström P., Jonsson T., Appelblad P., Massolini G.* Column comparison and method development for the analysis of short-chain carboxylic acids by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography with UV detection: Liquid Chromatography // *J. Sep. Sci.* 2013. V. 36. P. 3493–3502.

- 
136. *Ehling S., Cole S.* Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Enhanced Tool for Authenticity Testing // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 2229–2234.
137. *Huang Y., Tian Y., Zhang Z., Peng C.* A HILIC–MS/MS method for the simultaneous determination of seven organic acids in rat urine as biomarkers of exposure to realgar // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 905. P. 37-42
138. *Kitanovskia Z., Grgic I., Veberb M.* Characterization of carboxylic acids in atmospheric aerosols using hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 4417-4425.
139. *Ikegami T., Horie K., Saad N., Hosoya K., Fiehn O., Tanaka N.* Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. P. 2533–2542.
140. *Zhao H.-Q., Wang X., Li H.-M., Yang B., Yang H.-J., Huang L.* Characterization of Nucleosides and Nucleobases in Natural Cordyceps by HILIC–ESI/TOF/MS and HILIC–ESI/MS // *Molecules.* 2013. V. 18. P. 9755–9769.
141. *Langer S., Lodge J.* Determination of selected water-soluble vitamins using hydrophilic chromatography: A comparison of photodiode array, fluorescence, and coulometric detection, and validation in breakfast cereal matrix // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 960. P. 73-81.
142. *Dell'mour M., Jaitz L., Oburger E., Puschenreiter M., Koellensperger G., Hann S.* Hydrophilic interaction LC combined with electrospray MS for highly sensitive analysis of underivatized amino acids in rhizosphere research // *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33. P. 911–922.
143. *Prinsen H.C.M.T., Schiebergen-Bronkhorst B.G.M., Roeleveld M.W., Jans J.J.M., de Sain-van der Velden M.G.M., Visser G.* Rapid quantification of underivatized amino acids in plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem mass-spectrometry // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2016. V. 39. P. 651–660.
144. *Taniguchi A., Ikegami T.* Comparison of the steric selectivity on hydrophilic interaction chromatography columns modified with poly(acrylamide) possessing different morphology // *J. Chromatogr. A.* 2021. V. 1650. P. 462207.
145. *Douša M.* 1H-Tetrazole-5-amine Immobilized on Substituted Polymer Gel/Silica as a New Stationary Phase for Hydrophilic Interaction Chromatography // *Chromatographia.* 2018. V.81. P. 349–357.
146. *Fan F., Wang L., Li Y., Wang X., Lu X., Guo Y.* A novel process for the preparation of Cys-Si-NIPAM as a stationary phase of hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) // *Talanta.* 2020. V. 218. P. 121154.

- 
147. Guo D., Yang C., Qui R., Huang S. A novel imidazolium bonding stationary phase derived from N-(3-aminopropyl)-imidazole for hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2020. V. 1625. P. 461331.
148. Tang T., Guo D., Huang S. Preparation and chromatographic evaluation of the hydrophilic interaction chromatography stationary phase based on nucleosides or nucleotides // *Anal. Methods*. 2021. V. 13. P. 419–425.
149. Cheng X.D., Peng X.T., Yu Q.W., Yuan B.F., Feng Y.Q. Preparation of a Novel Amino-Phosphate Zwitterionic Stationary Phase for Hydrophilic Interaction Chromatography // *Chromatographia*. 2013. V. 76. P. 1569–1576.
150. Bowden D.J., Clegg S.L., Brimblecombe P. The Henry's law constants of the haloacetic acids // *J. Atmos. Chem*. 1998. V. 29. P. 85–107.
151. Vass A., Robles-Molina J., Pérez-Ortega P., Gilbert-López B., Dernovics M., Molina-Díaz A., García-Reyes J.F. Study of different HILIC, mixed-mode, and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides // *Anal. Bioanal. Chem*. 2016. V. 408. P. 4857–4869.
152. Luo Q., Wang D., Wei Z., Wang Z. Optimized chromatographic conditions for separation of halogenated acetic acids by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. 2013. V. 1277. P. 26–34.
153. Cheng S., Wu Y.P., Young T.R., Dodd M.C., Wu J., Zhang H., Huo Z.L., Qian Y.T., Li Y., Li W.T., Li A.M. Rapid determination of trace haloacetic acids in water and wastewater using non-suppressed ion chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry // *Sci. Total Environ*. 2021. V. 754. P. 142297.
154. Dixon A.M., Delinsky D.C., Bruckner J. V., Fisher J.W., Bartlett M.G. Analysis of dichloroacetic acid in drinking water by ion exchange HILIC-LC/MS/MS // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*. 2004. V. 27. P. 2343–2355.
155. Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Pirogov A.V., Nesterenko P.N., Shpigun O.A. Preparation and characterization of anion exchangers with dihydroxy-containing alkyl substitutes in the quaternary ammonium functional groups // *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1323. P. 104-114.
156. Uzhel A.S., Zatirakha A.V., Shchukina O.I., Smolenkov A.D., Shpigun O.A. Covalently-bonded hyperbranched poly(styrene-divinylbenzene)-based anion exchangers for ion chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2016. V. 1470. P. 97-103.
157. Uzhel A.S., Zatirakha A.V., Smirnov K.N., Smolenkov A.D., Shpigun O.A. Anion exchangers with negatively charged functionalities in hyperbranched ion-exchange layers for ion chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2017. V. 1482. P. 57-64.
158. Uzhel A.S., Gorbovskaya A.V., Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A. Manipulating selectivity of covalently-bonded hyperbranched anion exchangers toward

- 
- organic acids. Part I: Influence of primary amine substitutes in the internal part of the functional layer // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1589. P. 65-72.
159. *Seidl C., Bell D.S., Stoll D.R.* A study of the re-equilibration of hydrophilic interaction columns with a focus on viability for use in two-dimensional liquid chromatography// *J. Chromatogr. A*. 2019. V. 1604. P. 460484.
160. *Bell D.* // HPLC abstracts. Prague. 2017.
161. *Alvarez-Segura T., Subirats X., Rosés M.* Retention-pH profiles of acids and bases in hydrophilic interaction liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta*. 2019. V. 1050. P. 176–184.
162. *Kulikowska E., Kierdaszuk B., Shugar D.* Xanthine, xanthosine and its nucleotides: Solution structures of neutral and ionic forms, and relevance to substrate properties in various enzyme systems and metabolic pathways // *Acta Biochim. Pol.* 2004. V. 51. P. 493–531.
163. *Горбовская А.В., Попкова Е.К., Ужель А.С., Шнигун О.А., Затираха А.В.* Сорбенты на основе полистирол–дивинилбензола с привитым гидрофилизованным полиэтиленмином для ионной и гидрофильной хроматографии // *Журн. аналит. Химии*. 2023. Т. 78. С. 507-519.
164. *Arivett B., Farone M., Masiragani R., Burden A., Judge S., Osinloye A., Minici C., Degano M., Robinson M., Kline P.* Characterization of inosine-uridine nucleoside hydrolase (RihC) from *Escherichia coli* // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2014. V. 1844. P. 656–662.
165. Shodex (Japan), Nucleobases and Nucleosides, <https://www.shodex.com/en/dc/02/02/01.html>. (n.d.).
166. *Gao J.L., Leung K.S.Y., Wang Y.T., Lai C.M., Li S.P., Hu L.F., Lu G.H., Jiang Z.H., Yu Z.L.* Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganoderma* spp. by HPLC–DAD–MS// *J. Pharm. Biomed Anal.* 2007. V. 44. P. 807–811.