

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.Ломоносова

*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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Москва — 2023

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель **Чернобровкина Алла Валерьевна**

*Кандидат химических наук*

Официальные оппоненты **Нестеренко Павел Николаевич**

*Доктор химических наук, профессор*

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», химический факультет, ведущий научный сотрудник*

**Дейнека Виктор Иванович**

*Доктор химических наук, профессор*

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Институт фармации, химии и биологии, профессор*

**Бессонова Елена Андреевна**

*кандидат химических наук*

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Институт химии, кафедра органической химии, доцент*

Защита диссертации состоится 6 декабря 2023 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

E-mail: [dissovet02.00.02@mail.ru](mailto:dissovet02.00.02@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.5/2716>

Автореферат разослан « » 2023 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук

И.А. Ананьева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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, удерживаемым 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. Результаты также были представлены на докладах и научных семинарах лаборатории хроматографии кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

**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-Eге с иммобилизованным эремомицином 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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель исследования и поставлены задачи для достижения цели, продемонстрирована научная новизна работы и ее практическая значимость, публикации по теме исследования, степень апробации работы, ее структура и объем.

### Обзор литературы

**Глава 1** посвящена обзору литературы. В нем систематизированы сведения о неподвижных фазах для гидрофильной хроматографии, способы их получения и характеристики. В первом разделе обзора литературы отражены современные тенденции получения новых гидрофильных сорбентов. Во втором разделе представлена информация о наиболее перспективных матрицах для синтеза неподвижных фаз. В третьем разделе описаны подходы к созданию гидрофильных функциональных слоев: использование клик-химии, в том числе многокомпонентной реакции Уги, применение полимеров и антибиотиков. Четвертый раздел посвящен характеристике неподвижных фаз для ГИХ по коэффициентам селективности, а также по удерживанию тестовых аналитов. Для описания свойств разрабатываемых фаз предложено применять тест Танака и полярные вещества нескольких разных классов в качестве модельных для дополнения сведений в разных хроматографических условиях и одновременной оценки практической значимости новых сорбентов. На основании обзора литературы сделаны выводы, подтверждающие актуальность выбранной темы исследования и способов решения поставленных задач.

## Экспериментальная часть

**Глава 2** включает описание используемых в работе реактивов и оборудования. Использовали хроматограф Dionex 3000, а также Vanquish Flex с флуоресцентным и диодно-матричным детектором (США). Также применяли систему ВЭЖХ, состоящую из изократического насоса, крана-дозатора и рефрактометрического детектора. Использовали хроматограф Shimadzu Prominence и Shimadzu (Япония). Для изучения термостабильности сорбентов в условиях термодесорбции применяли ГХ-МС Agilent GC (8890)-MS (США). Для элементного анализа образцов сорбентов использовали элементный анализатор PerkinElmer 2400 Series II CHNS/O («PerkinElmer», США). 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% азота; (другие партии аминофаз: 1.52%, 1.67%, и 2.10% азота), сополимеры стирола и дивинилбензола со степенью сшивки 50%, средним диаметром частиц 5.5 ± 0.5 мкм, площадью поверхности 650 м<sup>2</sup>/г и средним диаметром пор 4 нм. Фермент рибонуклеозидгидролаза получен в организации ФИЦ Биотехнологии РАН, ген для клонирования был предоставлен институтом молочной промышленности ВНИМИ.

### Синтез сорбентов и условия разделения тестовых аналитов

Условия разделения тестовых аналитов представлены в табл. 1. Первая серия фаз (табл. 2) была получена по реакции Уги с 3-аминопропилсиликагелем (1.70% N), вторая (табл. 3) — путём модифицирования эремомицином силикагеля (С), 3-аминопропилсиликагеля (С<sub>A</sub>) и аминированного полистирол-дивинилбензола (П). Дополнительные обозначения для фаз, полученных по реакции Уги: К — использование катализатора, цифра — количество суток синтеза. Для удаления функционального слоя (Б-У) использовали спейсер 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир (1,4-БДДГЭ).

Таблица 1. Условия разделения тестовых аналитов

Класс веществ	Доля водной части в подвижной фазе*, об. %	Состав водной части	Скорость потока, мл/мин	Детектирование
Углеводы	15	Деион. вода	1.0	Рефрактометрическое
Пестициды и фосфоновые кислоты	90	100 мМ АФБ* рН 4.0	1.0	Рефрактометрическое
Слабоудерживаемые витамины	10	100 мМ ААБ* рН 5.4	1.0	УФ (Спектрофотометрическое детектирование), 270 нм
Сильноудерживаемые витамины	20		1.0	
Аминокислоты	20	1 мМ ФБ* рН 6.5	1.0	УФ, 210 нм
Карбоновые кислоты	20	10 мМ ФБ* рН 7.0	1.0	УФ, 200 нм
Азотистые основания, нуклеозиды	10	20 мМ ААБ* рН 4.7	1.0	УФ, 254 нм
Тест Танака			0.5	
Алкилбензолы	85	Деион. вода	1.0	УФ, 254 нм

\* — *Перечень сокращений:*

АФБ — Аммонийно-формиатный буферный раствор

ААБ — Аммонийно-ацетатный буферный раствор

ФБ — Фосфатный буферный раствор

Таблица 2. Сорбенты, полученные по реакции Уги

Сорбент (№)	КС*	Изоцианид	Кислота	масс. %С
Матрица С <sub>А</sub>	—	—	—	6.42
<b>I. Пространственное удаление функционального слоя (1,4-БДДГЭ)</b>				
У, Б-У (1,2)	Ацетон	2-морфолиноэтил изоцианид	Уксусная	7.73 Б-У
<b>II. Изоцианид</b>				
Б (3,4)	Ацетон	<i>трет</i> -бутилизоцианид	Гликолевая	—
Т (5,6,7)		<i>п</i> -толуолсульфонилметил		6.71
Э (8,9,10)		этилизоцианацетат		3.44
Ф (11)		диэтилизоциано- метилфосфонат		2.57
М (АЦ) (12-18)		2-морфолиноэтилизоцианид		6.96
<b>III. Карбонильное соединение (КС)*</b>				
АП (19)	2-Ацетилпиррол	2-морфолиноэтил	Гликолевая	5.89
АА (20)	Ацетальдегид			7.93
АФ (21)	2-Ацетилфуран			3.61
<b>IV. Кислота</b>				
<i>1. Аминокислота</i>				
СЕР (22)	Ацетон	2-морфолиноэтил- изоцианид	Серин	3.68
АСП (23)			Аспарагин	4.62
<i>2. Полимерная кислота</i>				
ПМ 1:0,01*(24)	Ацетальдегид	2-морфо- линоэтил- изоцианид	Полимолочная	10.33
ПА 1:0,1 (25)			Полиакриловая	13.53
ПА-с 1:0,1 (26)			Сополимер акриловой кислоты и акрилата натрия	—
ПАМ 1:0.1 (27)			Сополимер акриловой и малеиновой кислот (ММ** 2000)	11.11
ПАМ 1:1 (28)			Сополимер акриловой и малеиновой кислот (ММ 70000)	13.27
ПАММ 1:0,1 (29)			Сополимер акриловой кислоты и акриламида (ММ 150000-520000)	7.82
ПАА 1:0,1 (30)			Сополимер акриловой кислоты и акриламида (ММ 150000-520000)	8.83
ПАА 1:0,3 (31)			Сополимер акриловой кислоты и акриламида (ММ 150000-520000)	9.32

\* — соотношение матрица:полимер по массе, \*\* — Молекулярная масса, г/моль

Таблица 3. Сорбенты, полученные модифицированием эремомицином

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

## Результаты и их обсуждение

Результаты и их обсуждение представлены в главах 3-9.

В главе 3 проводили сравнение свойств 4 партий 3-аминопропилсиликагеля с различным содержанием азота согласно данным элементного анализа, рассматриваемого в качестве матрицы для получения новых сорбентов. По результатам теста Танака (табл. 4) для всех аминофаз М1-М4 показано отсутствие катионообменной селективности  $\alpha$  (СХ), что в сравнении с большой величиной этого параметра для силикагеля ( $\alpha$  (СХ) = 45) свидетельствует об успешном модифицировании силанольных групп и экранировании поверхности частиц аминогруппами аминопилтриэтоксисилана. Для всех аминофаз отмечено проявление анионообменной селективности  $\alpha$  (АХ).

Таблица 4. Величины коэффициентов селективности теста Танака. Факторы удерживания полярных веществ, полученные в условиях, указанных в табл. 1

Матрица С <sub>А</sub>		М1	М2	М3	М4
<b>Результаты элементного анализа</b>					
%	Углерод (С)	5.74	6.32	6.42	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
	$\alpha$ (СХ)	0	0	0	0
	$\alpha$ (АХ)	22.2	19.0	14.3	16.6
<b>Вещество</b>		<b>Факторы удерживания</b>			
Витамины	В <sub>3</sub> амид	0.6	0.7	0.7	0.7
	В <sub>6</sub>	1.8	1.9	2.2	2.1
	В <sub>1</sub>	3.2	3.2	5.1	4.7
	В <sub>2</sub>	4.8	4.8	5.2	5.5
	В <sub>3</sub> кислота	10.8	13.1	12.3	10.5
	В <sub>12</sub>	11.4	11.9	13.7	14.5
	С	44.3	54.8	55.2	46.1
Амино- кислоты, кислоты	Серин	28.8	31.3	34.3	65.0
	Аланин	33.4	33.6	39.9	56.0
	Глутаровая	12.6	12.6	12.3	11.3
	Винная	17.8	19.1	21.7	18.2
	Щавелевая	24.0	26.4	27.4	25.3

М1-М4 — 3-Аминопилтриэтоксисиликагель партий № 1-4 соответственно.

Согласно фактору удерживания уридина kU в тесте Танака, показано, что в целом, существует тенденция увеличения гидрофильности фаз с увеличением доли азота, и, следовательно, количества привитых функциональных групп в партиях аминофаз. При этом, для матриц М2 и М3 с близким содержанием азота получены существенные различия в гидрофильности, и партия М3, с промежуточным содержанием азота (1.70%) продемонстрировала самый большой фактор удерживания уридина (kU = 4.0).

Показана зависимость между гидрофильностью аминофазы, оцененной по тесту Танака, и удерживанием полярных нейтральных сахаров на ней: при увеличении гидрофильности фазы происходило значительное увеличение факторов удерживания сахаров в соответствии с возрастанием адсорбции приповерхностного водного слоя неподвижной фазы. Хроматограммы смеси сахаров на разных партиях аминопропилсиликагеля представлены на рис. 1.

Показано, что в данных условиях элюирования

удерживание органических кислот определяется в большей степени гидрофильностью фаз, что может быть связано с понижением анионообменной селективности сорбентов при переходе к условиям разделения кислот (рН 7.0) и уменьшением электростатических взаимодействий отрицательно заряженных кислот и аминофаз.

На первом этапе работы установлено, что содержание азота 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 фазы. В отношении аналитов, в удерживание которых в гидрофильном режиме распределение вносит большой вклад (углеводы), именно оценка гидрофильности способствует предсказанию свойств аминофаз. Таким образом, важно не только контролировать содержание азота в партиях 3-аминопропилсиликагеля, но также информативной является оценка гидрофильности сорбента по тесту Танака. Для создания новых неподвижных фаз была выбрана наиболее гидрофильная матрица М3 — С<sub>А</sub> (kU = 4.0) с 1.70% азота согласно результатам элементного анализа.

В главе 4 реакция Уги была выбрана для создания функционального слоя новых фаз путем модифицирования 3-аминопропилсиликагеля. 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, в том числе полимерную, чтобы оценить влияние каждого формируемого структурного фрагмента, а также его пространственное удаление от поверхности матрицы на свойства получаемых неподвижных фаз.

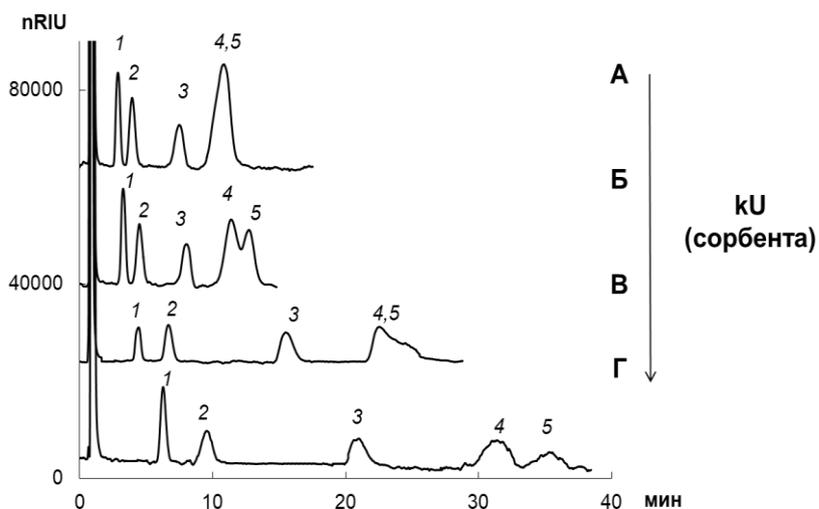


Рис. 1. Хроматограммы модельных смесей сахаров в условиях, указанных в табл. 1. Сорбенты: аминофазы М1 (А), М2 (Б), М4 (В), М3 (Г); 1 — фруктоза, 2 — глюкоза, 3 — сахароза, 4 — мальтоза, 5 — лактоза.

Таблица 5. Выбор условий модифицирования по реакции Уги. Хроматографические условия указаны в табл. 1

Сорбент	Изоцианид	Log P	kU	$\alpha$ (CX)	$\alpha$ (AX)
Матрица С <sub>A</sub>	—	0.55	4.0	0	14.3
Тм4	Т	1.82	3.3	0.	16.8
Тэ4	Т		2.9	0.2	14.1
Тэ4Кат	Т		2.8	1.4	13.2
МэКат	М	0.04	4.1	0.6	6.5
Мэ4	М		3.5	0.1	15.6
Мэ4Кат	М		4.0	0.9	6.1

Сначала *варьировали условия реакции Уги*: время, растворитель, катализатор. В случае использования п-толуолсульфонилметилизоцианида (Т) ожидали уменьшения гидрофильных и анионообменных свойств по сравнению с матрицей. В случае использования 2-морфолиноэтилизоцианида (М) прогнозировали увеличение гидрофильности. Показано, что проведение реакции в среде этанола приводит к увеличению степени модифицирования матрицы. Изменение продолжительности реакции не привело к значительным изменениям параметров селективности (табл. 5). При добавлении катализатора для серии фаз Т наблюдали близкие параметры теста Танака, что может быть связано с достаточной степенью модифицирования аминогрупп в отсутствие катализатора для данного изоцианида. Добавление хлорида аммония в реакции с 2-морфолиноэтилизоцианидом привело к увеличению гидрофильности и уменьшению анионообменной селективности. Пространственное удаление слоя, сформированного по реакции Уги с помощью 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира в качестве линкера, нецелесообразно для тестируемых веществ, поскольку оно приводило к существенному уменьшению гидрофильности.

Таблица 6. Величины коэффициентов селективности теста Танака. Факторы удерживания полярных веществ в условиях, указанных в табл. 1

Параметр	Матрица С <sub>A</sub>	Б	Т	Э	Ф	М (АЦ)
log P (Уги)	0.55	1.67	1.82	0.79	0.68	0.04
kU	4.0	3.2	2.8	2.8	3.3	4.0
$\alpha$ (AX)	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
В <sub>3</sub> кислота	12.3	8.5	7.9	7.8	9.0	5.8
Мальтоза	36.3	32.7	14.6	21.0	20.5	17.7

Далее в рамках одной серии сравнивали 5 неподвижных фаз, полученных по реакции Уги при использовании следующих *изоцианидов*: трет-бутил-, п-толуолсульфонилметил- (Т), 2-морфолиноэтилизоцианида (М), а также этилизоцианацетата (Э) и диэтилизо-цианометилфосфоната (Ф). По фактору удерживания уридина (табл. 6) сорбенты расположены в ряду: Т (2.8) = Э (2.8) < Б (3.2) = Ф (3.3) < матрица С<sub>A</sub> (4.0) = М (АЦ) (4.0). По фактору удерживания гуанозина сорбент М

характеризовался большей гидрофильностью по сравнению с матрицей (табл. 6, рис. 2). Удерживание органических кислот также коррелировало с гидрофильностью. Равенство факторов удерживания уридина для пар Т, Э и Б, Ф возможно, связано с различной степенью модифицирования матрицы, обусловленной разной реакционной способностью изоцианидов. Существенное снижение анионообменной селективности, а также удерживания ксантина, аскорбиновой и никотиновой кислот наблюдали на сорбенте М (АЦ). Связь удерживания углеводов с гидрофильностью оказывалась комплексной: с одной стороны, увеличение степени модифицирования аминогрупп приводило к уменьшению факторов удерживания сахаров; с другой стороны, гидрофилизация поверхности для сорбентов серии М может приводить к их увеличению. Таким образом, появление 2-морфолиноэтила в структуре фрагмента Уги, закреплённого на поверхности матрицы, существенно увеличило гидрофильность неподвижных фаз серии М по сравнению с другими фазами, полученными по реакции Уги, и позволило сохранить гидрофильность 3-аминопропилсиликагеля.

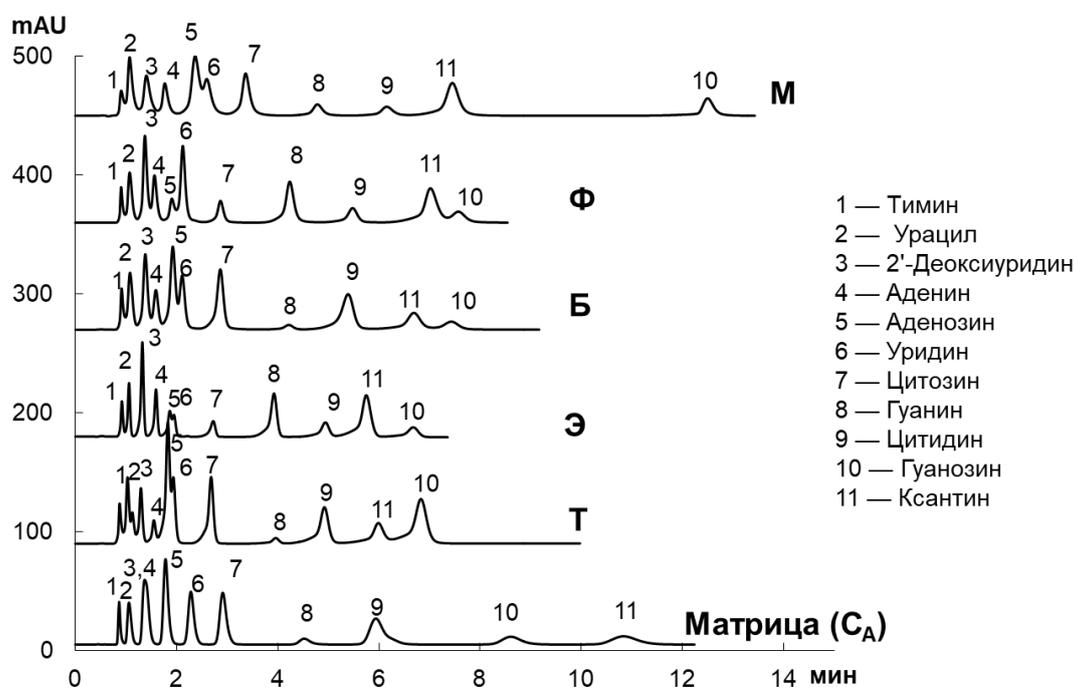


Рис. 2. Хроматограммы модельной смеси азотистых оснований и нуклеозидов в условиях, указанных в табл. 1.

В рамках следующей серии синтезировали 4 сорбента по реакции Уги при использовании самого гидрофильного 2-морфолиноэтилизотиоцианида, а также гликолевой кислоты в качестве кислотного компонента, и 4 различных *карбонильных соединений*: ацетона (АЦ), 2-ацетилфурана (АФ), 2-ацетилпиррола (АП) и ацетальдегида (АА). Сорбенты АП, АА и М (АЦ) демонстрировали значительную гидрофильность, что коррелировало с низкими параметрами гидрофобности формируемых структурных фрагментов. Факторы удерживания нуклеозидов и азотистых оснований согласовались с гидрофильностью фаз (табл. 7, рис. 3).

Таблица 7. Величины коэффициентов селективности теста Танака. Факторы удерживания полярных веществ в условиях, указанных в табл. 1

Параметр	(М) АЦ	АФ	АП	АА
log P (Уги)	-0.71	0.35	-0.14	-0.69
k(U)	4.0	2.7	3.8	3.1
$\alpha$ (АХ)	6.1	12.8	19.8	24.7
Гуанозин	23.0	10.0	17.3	14.9
Витамин С	23.9	14.8	45.1	34.9
Мальтоза	17.7	15.0	14.2	11.8

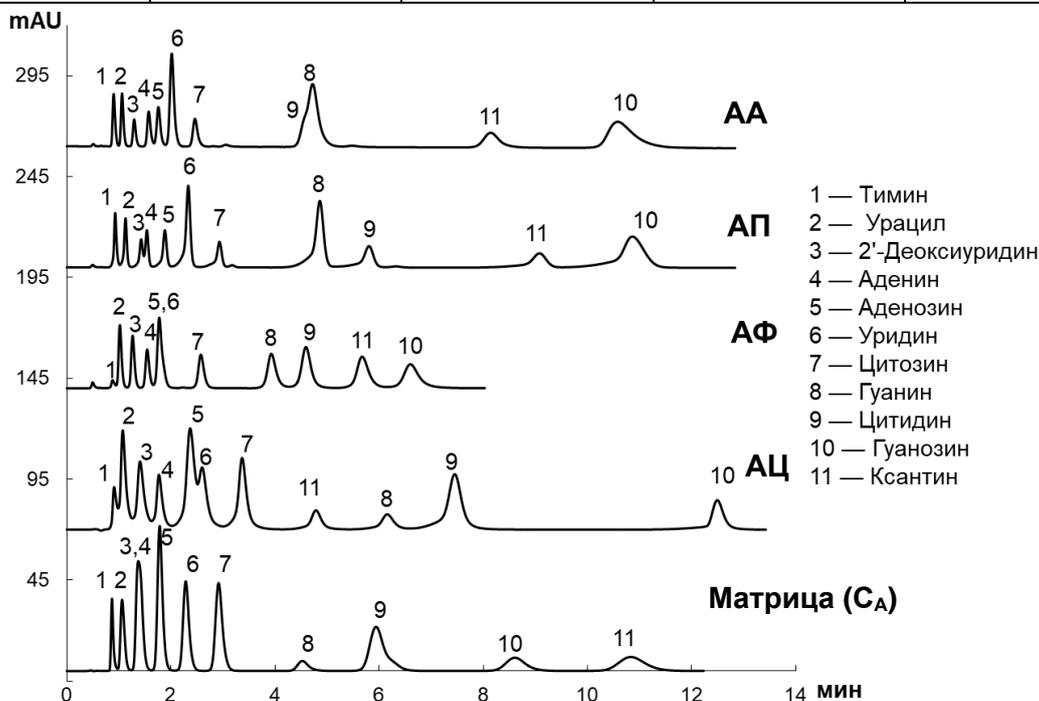


Рис. 3. Хроматограммы смеси азотистых оснований и нуклеозидов, полученные на матрице и сорбентах АЦ, АФ, АП и АА в условиях, указанных в табл. 1.

Важно подчеркнуть, что эффективность по модельным анализам по сравнению с

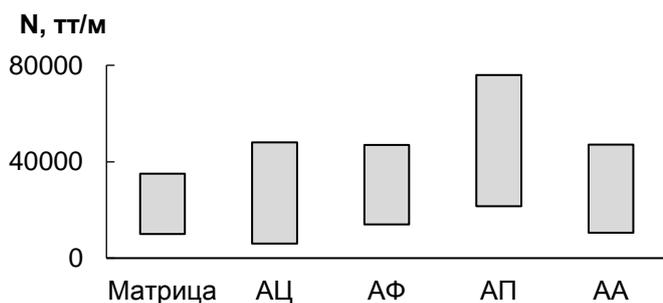


Рис. 4. Эффективность колонок в условиях, указанных в табл. 1.

матрицей значительно возростала для всех сорбентов данной серии (рис. 4). Показано, что наиболее перспективным является использование 2-ацетилпиррола. Такой выбор приводит к значительному увеличению эффективности по всем классам аналитов.

Наблюдали высокую анионообменную селективность для сорбентов с 2-ацетилпирролом АП и ацетальдегидом АА, и, как следствие, увеличение факторов удерживания на данных фазах аскорбиновой и никотиновой кислот, в удерживание которых значительный вклад вносят электростатические взаимодействия. На этих сорбентах за счет высокой анионообменной селективности происходило отталкивание положительно заряженного витамина В<sub>1</sub>, вследствие чего время его удерживания

снижалось, а селективность относительно рибофлавина — увеличивалась. Произошло улучшение разрешения пары  $V_1/V_2$  на всех модифицированных сорбентах по сравнению с матрицей и с серией, полученной с использованием ацетона (рис. 5).

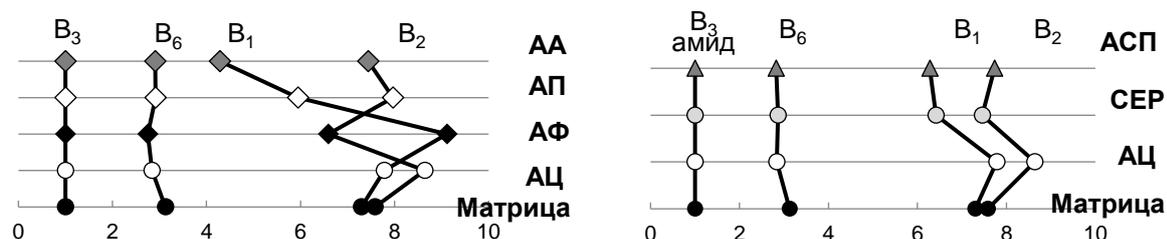


Рис. 5. Шкалы селективности для слабоудерживаемых витаминов относительно  $V_3$  амида для серии сорбентов с карбонильным соединением (слева) и для серии с аминокислотой (справа). Получены для матрицы и сорбентов М(АЦ), АФ, АП и АА в условиях, указанных в табл. 1.

В следующей серии было синтезировано 2 сорбента по реакции Уги при использовании *аминокислот* — серина и аспарагина — в качестве кислотного компонента реакции. В качестве карбонильного компонента использовали ацетон.

Несмотря на отрицательные параметры гидрофобности структурных фрагментов с аминокислотами, увеличения гидрофильности не наблюдали (табл. 8).

Таблица 8. Величины коэффициентов селективности теста Танака. Факторы удерживания полярных веществ в условиях, указанных в табл. 7

Сорбент	Матрица $S_A$	М (АЦ)	СЕР	АСП
$\log P$ (Уги)	0.34	-0.71	-1.27	-2.80
$k(U)$	4.0	4.0	3.0	3.2
$\alpha(AX)$	14.3	6.1	15.9	15.5

Доказательством успешного введения структурных фрагментов аминокислот в функциональный слой служило увеличение анионообменной селективности по сравнению с матрицей и сорбентом АЦ, что может быть вызвано дополнительными аминогруппами, входящими в состав аминокислот. Увеличение  $\alpha$  (АХ) на СЕР и АСП также привело к улучшению селективности по паре слабоудерживаемых  $V_1/V_2$  (рис. 5).

В следующей серии фаз оценивали влияние *полимерного слоя* на характеристики разделения модельных веществ. Несмотря на достаточную гидрофильность ( $kU = 2.2$ ) фазы с полимолочной кислотой ПМ 1:0.01, происходило значительное уменьшение факторов удерживания углеводов по сравнению с матрицей и фазами с мономерными фрагментами, что свидетельствует о лучшем экранировании 3-аминопропилсиликагеля полимерным слоем. Далее требовалась гидрофилизация при создании такого рода слоев.

Следующим шагом было изменение способа закрепления слоя за счет замены полимолочной кислоты на полиакриловую, содержащую реакционноспособную карбоксильную группу в каждом звене. В таком случае полимер может закрепляться не в виде длинных цепей, а в виде обволакивающей частицу структуры. Однако такой подход приводил к уменьшению гидрофильности и  $\alpha(AX)$  (табл. 9). Последнее может быть объяснено тем, что для фазы ПМ 1:0.01 с большим значением  $\alpha(AX) = 51.8$  ввиду

стерических затруднений может быть затруднено протекание заключительной трансформации вторичного амина в амид.

Таблица 9. Данные теста Танака матрицы и сорбентов с полимерными слоями в условиях, указанных в табл. 1

Сорбент	log P (Уги)	k(U)	$\alpha$ (АХ)	$\alpha$ (СХ)	k'(мальтозы)
Матрица С <sub>A</sub>	0.34	4.0	14.3	0	36.3
АА	-0.69	3.1	24.7	0	4.5
ПМ 1:0.01	-1.36	2.2	51.8	0	3.0
ПА 1:0.1	0.17	2.0	16.8	0	3.0
ПА-с 1:0.1	-1.20	2.6	25.8	0	4.5
ПАМ 1:0.1	-2.20	3.1	10.2	0.2	3.6
ПАММ 1:0.1	-2.20	2.4	26.9	0	4.1
ПАМ 1:1	-2.20	3.6	0.7	3.1	2.9
ПАА 1:0.1	-3.04	3.0	28.7	0	4.5
ПАА 1:0.3	-3.04	2.7	34.8	0	3.8

На следующем этапе работы оценивали количество привитого слоя в случае использования акриловой кислоты и ее сополимера с натриевой солью (ПА-с 1:0.1). Существенное увеличение гидрофильности, а также факторов удерживания углеводов на данном сорбенте по сравнению с ПА 1:0.1 может свидетельствовать о меньшем выходе реакции при использовании сополимера.

Дальнейшим этапом гидрофилизации слоя стало увеличение числа карбоксильных групп в его структуре. Для этого использовали сополимер акриловой и малеиновой кислот, обеспечивающий образование более полярного фрагмента, что действительно привело к получению сорбента с большей гидрофильностью ( $kU = 3.1$ ). Ожидаемо, для сорбента ПАМ 1:0.1 наблюдали уменьшение анионообменной селективности, вероятно, вызванной не задействованными в реакции карбоксильными группами. 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.

Для введения гидрофильных амидных групп использовали сополимер неполной натриевой соли акриловой кислоты и ее амида (фаза ПАА 1:0.1) также с большой молекулярной массой. Показано улучшение разделяющей способности сорбентов при такой гидрофилизации благодаря увеличению селективности по полярным веществам и эффективности при использовании полимера с большой молекулярной массой.

Влияние соотношения матрица : полимер по массе рассмотрено на двух парах фаз (серии ПАМ и ПАА). При 10-кратном увеличении количества полимера в серии ПАМ показано увеличение  $kU$  (табл. 9), что согласуется с результатами элементного анализа по возрастанию доли углерода от 11.11 % до 13.27 % при увеличении количества привитого полимера. Также наблюдали уменьшение анионообменной и появление катионообменной селективности, связанное с увеличением количества карбоксильных групп. Однако для

фаз серии ПАА увеличение массы полимера в 3 раза не привело к возрастанию kU и доли углерода. Показано, что дополнительная гидрофилизация при увеличении массового соотношения реагентов зависит от природы и растворимости полимерного соединения.

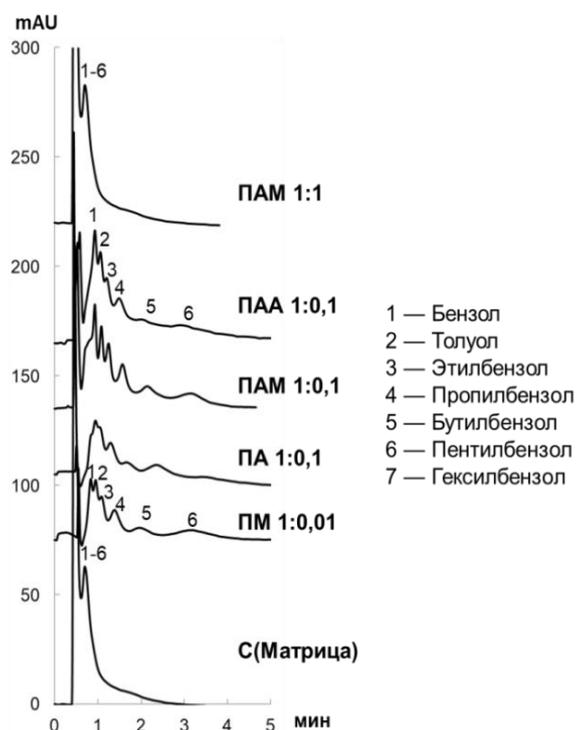


Рис. 6. Хроматограммы алкилбензолов

При введении полимерной кислоты фазы показали предпосылки к разделению алкилбензолов, чего не наблюдали на матрице и сорбентах с мономерным слоем (рис. 6). Порядок их удерживания соответствовал обращенно-фазовому режиму. Однако, при увеличении массы полимера на сорбенте ПАМ 1:1 отсутствовала возможность их разделения, что вероятно, вызвано уменьшением доступности гидрофобных фрагментов в структуре слоя для взаимодействий с аналитами. Также на фазах с полимерным слоем изменялся порядок элюирования гуанина и цитидина на противоположный величинам их параметров Ханша (рис. 7), что характерно для фаз на основе полистирол-дивинилбензола и также может быть маркером наличия гидрофобных взаимодействий.

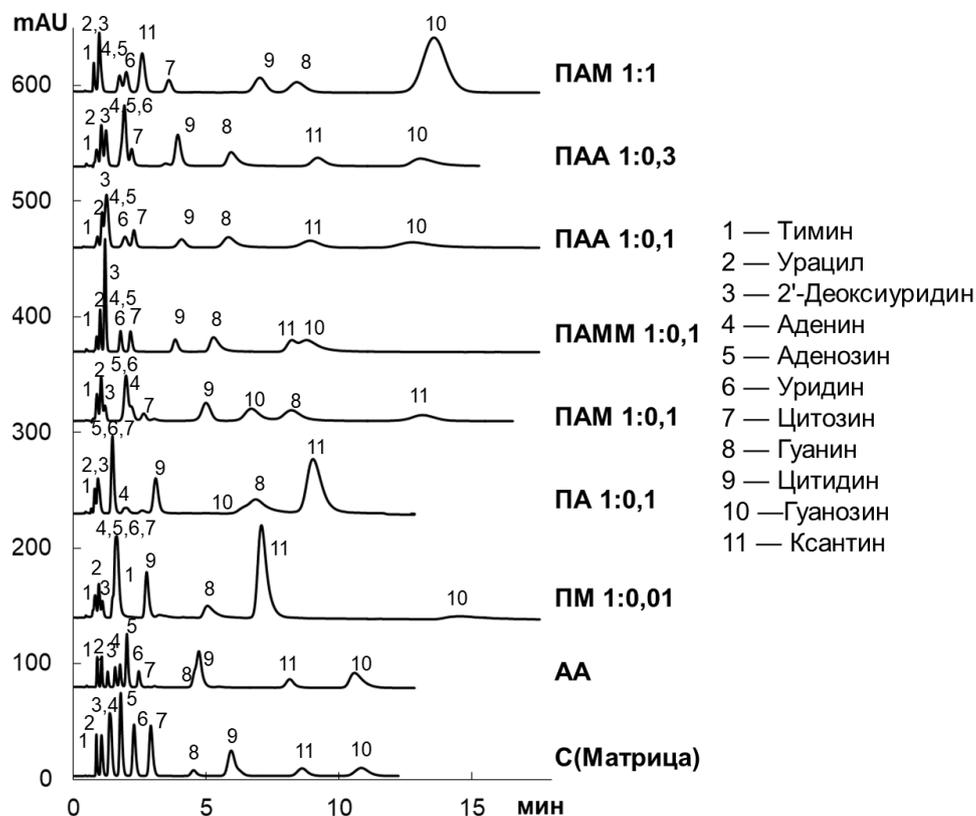


Рис. 7. Хроматограммы смеси азотистых оснований и нуклеозидов, полученные на матрице, сорбенте АА и сорбентах с полимерами в функциональном слое в условиях, указанных в табл. 1.

Несмотря на достаточную гидрофильность при создании полимерного функционального слоя, на всех сорбентах происходило заметное уменьшение факторов удерживания сахаров по сравнению и с матрицей, и с фазами, содержащими мономерные фрагменты, что может свидетельствовать о лучшем экранировании 3-аминопропилсиликагеля (рис. 8). Такие функциональные слои могут стать перспективными для экранирования альтернативных матриц.

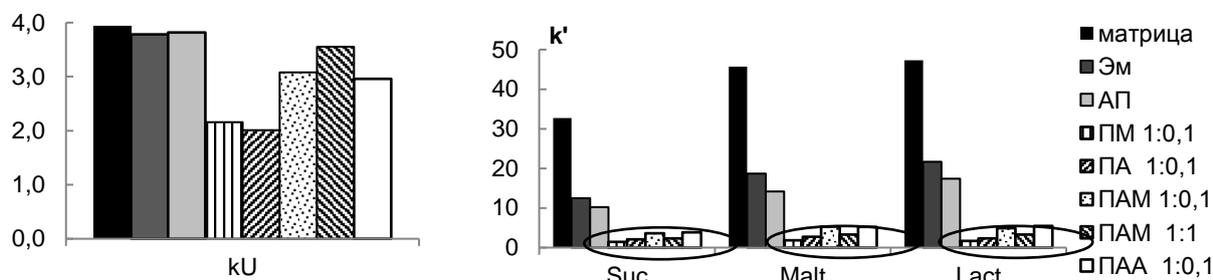


Рис. 8. Гидрофильность сорбентов (слева) и факторы удерживания сахаров (справа) на матрице и на сорбентах с мономерным (темный цвет) и полимерным слоем (светлый цвет, отмечено овалом). Условия указаны в табл. 1.

Однако существенное уменьшение факторов удерживания сахаров приводило к значительному ухудшению их разделения на фазах с полимерным слоем. Напротив, сорбенты с мономерным слоем демонстрируют перспективу разделения многокомпонентной смеси сахаров благодаря повышенной эффективности и селективности по сравнению с матрицей.

Так, на сорбенте Эм благодаря использованию испарительного детектора светорассеяния и градиентного элюирования за 20 мин было достигнуто разделение смеси 10 сахаров, включая трисахарид раффинозу (рис. 9).

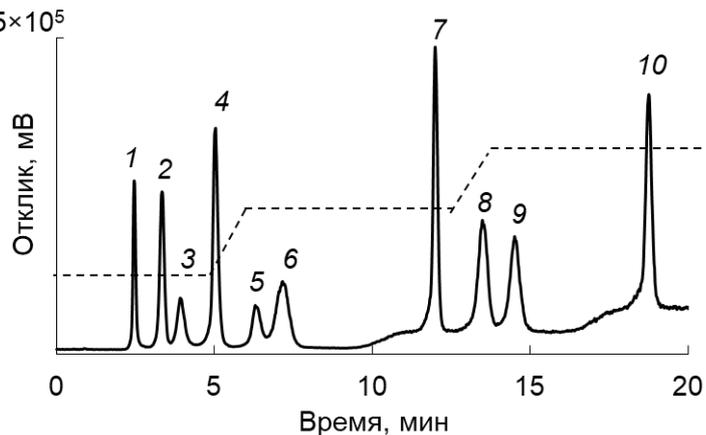


Рис. 9. Хроматограмма модельной смеси сахаров на сорбенте Эм. Условия разделения: подвижная фаза: H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN; градиентное элюирование (а) 0–5.5 мин, 14% H<sub>2</sub>O; 6.5–12.5 мин, 22% H<sub>2</sub>O; 13.5–26.5 мин, 27% H<sub>2</sub>O; 28.5–32.5 мин, 14% H<sub>2</sub>O; Детектирование по светорассеянию; температура колонки 30°C; 1 — рибоза, 2 — ксилоза, 3 — фруктоза, 4 — глюкоза, 5 — сахароза, 6 — мальтоза, 7 — лактоза.

В главе 5 применяли другой способ гидрофиллизации — ковалентное модифицирование эремомицином 3 матриц на основе силикагеля, 3-аминопропилсиликагеля и сополимеров стирола и дивинилбензола. Согласно результатам теста Танака, представленным в табл. 10, показано увеличение фактора удерживания уридина на сорбентах, модифицированных эремомицином ( $\log P = -3.21$ ), по сравнению с соответствующими матрицами и сорбентами-прототипами, что свидетельствует об успешном введении гидрофильных фрагментов в структуру функциональных слоев. При рассмотрении удерживания сахаров, аминокислот, азотистых

оснований и нуклеозидов также показано, что при модифицировании всех трех типов матриц факторы удерживания значительно увеличивались (табл. 10), что согласуется с увеличением гидрофильности. 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.

Установлено существенное уменьшение катионообменной селективности для сорбента на основе силикагеля С-Э по сравнению с матрицей С (табл. 10), что указывает на экранирование отрицательного заряда силикагеля при закреплении антибиотика. Сорбенты С<sub>А</sub>-Б и П-2Б характеризовались ярко выраженной анионообменной селективностью вследствие протонирования аминогрупп в условиях хроматографирования. Существенное уменьшение величин  $\alpha$ (АХ) 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 макромолекулой.

Таблица 10. Величины коэффициентов селективности теста Танака. Факторы удерживания полярных веществ в условиях, указанных в табл. 1

Сорбент		С	С-Э	С <sub>А</sub> -Б	С <sub>А</sub> -Б-Э	П-2Б	П-2Б-Э
<b>Результаты элементного анализа</b>							
%	Углерод (С)	—	12.17	9.04	9.90	—	—
	Азот (N)	—	1.25	1.32	1.51	—	—
<b>Селективность</b>							
Тест Танака	k(U)	0.8	2.5	1.6	2.0	0.4	1.2
	$\alpha$ (СХ)	45.1	1.6	0	0	0	0
	$\alpha$ (АХ)	0.1	1.7	26.9	19.4	271.3	34.1
<b>Вещество</b>		<b>Факторы удерживания</b>					
Лактоза		2.0	4.9	1.9	3.2	1.2	1.6
Серин		3.9	8.5	8.8	10.6	3.1	4.7
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
Тиамин (В <sub>1</sub> )		69.4	12.9	0.6	1.2	0	0.7
Никотиновая кислота		1.7	5.2	10.8	10.8	3.1	4.9
Витамин С		1.9	5.5	18.7	17.5	2.7	4.0
Фумаровая		4.4	7.4	7.2	9.1	23.2	26.9
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

Необходимо отметить уменьшение эффективности практически по всем классам рассматриваемых веществ для фаз с объемным эремомицином – на основе силикагеля и полимерной матрицы (рис. 10). В свою очередь, эффективность фаз на основе аминопропилсиликагеля сопоставима. Таким образом, способ закрепления эремомицина с пространственным удалением групп и повышенная степень экранирования

гидрофильной матрицы благодаря наличию спейсера 1,4- БДДГЭ позволили сохранить эффективность при введении в слой молекул большого размера. Хроматограммы смесей азотистых оснований и нуклеозидов представлены на рис. 10. Благодаря повышенной селективности сорбента С<sub>А</sub>-Б-Э на данном сорбенте возможно разделение 11 веществ данных классов с эффективностью до 40000 тт/м.

Наличие гидрофобной матрицы ПС-ДВБ позволило реализовать дополнительный тип взаимодействий аналитов с такой архитектурой новых неподвижных фаз на ее основе, благодаря чему стало возможным разделение гидрофобных соединений в режиме ОФ ВЭЖХ (рис. 11). Факторы удерживания алкилбензолов на сорбенте П-2Б-Э несколько меньше по сравнению с прототипом П-2Б, что согласуется с большей гидрофильностью сорбента, модифицированного эремочином. Закрепление хирального селектора в слое сорбента обеспечило его энантиоселективность, продемонстрированную по отношению к аминокислотам, порядок удерживания которых характерен для гидрофильной хроматографии. Достигнуто разделение энантиомеров (рис. 11) ряда аминокислот и их производных (валин  $\alpha = 2.2$ ,  $R_s = 1.1$ , лейцин  $\alpha = 2.5$ ,  $R_s = 1.3$ , бензилоксикарбонил-аспарагин  $\alpha = 1.7$ ,  $R_s = 1.3$ ). На рис. 11 продемонстрировано полное разрешение энантиомеров 4-хлорфенилаланина ( $R_s = 1.8$ ,  $\alpha = 3.5$ ).

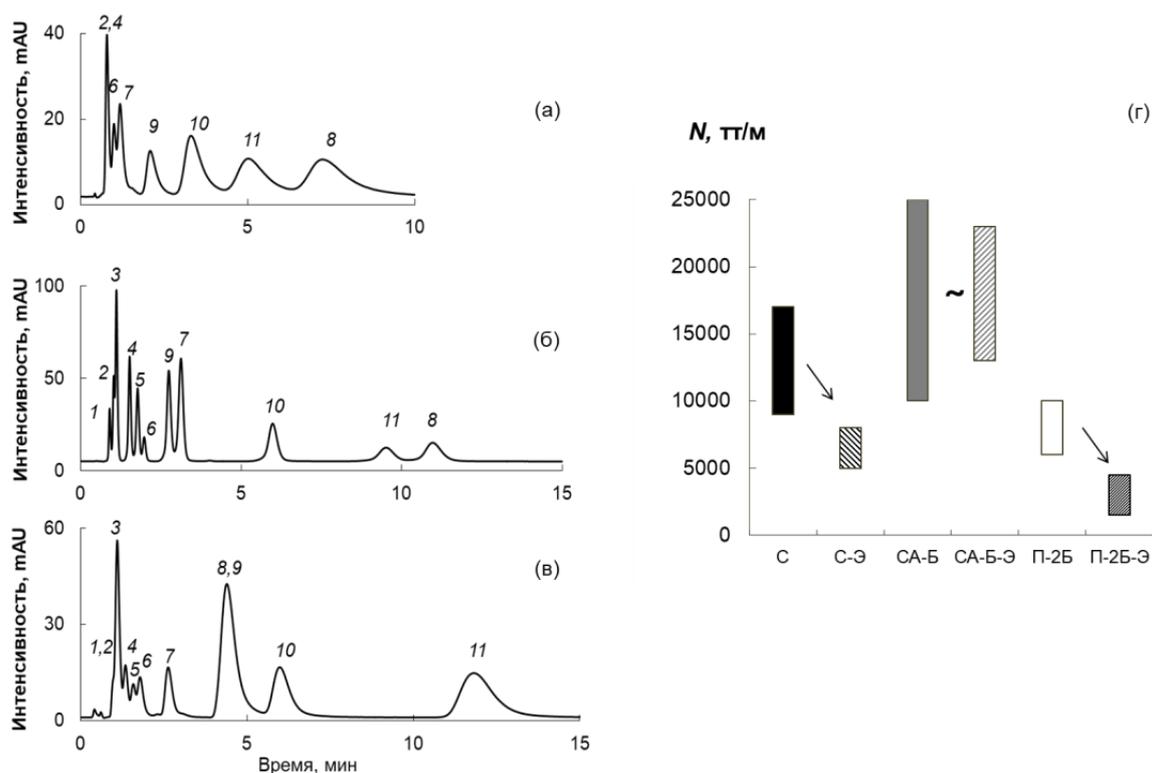


Рис. 10. Хроматограммы (а-в) модельных смесей азотистых оснований и нуклеозидов и диаграммы эффективности в условиях, указанных в табл. 1. (г). Сорбенты: П-2Б-Э (а), С<sub>А</sub>-Б-Э (б), С-Э (в); УФ-детектирование при 254 нм. 1 — тимин, 2 — урацил, 3 — 2'-дезоксуридин, 4 — уридин, 5 — аденозин, 6 — аденин, 7 — цитидин, 8 — ксантин, 9 — цитозин, 10 — гуанин, 11 — гуанозин.

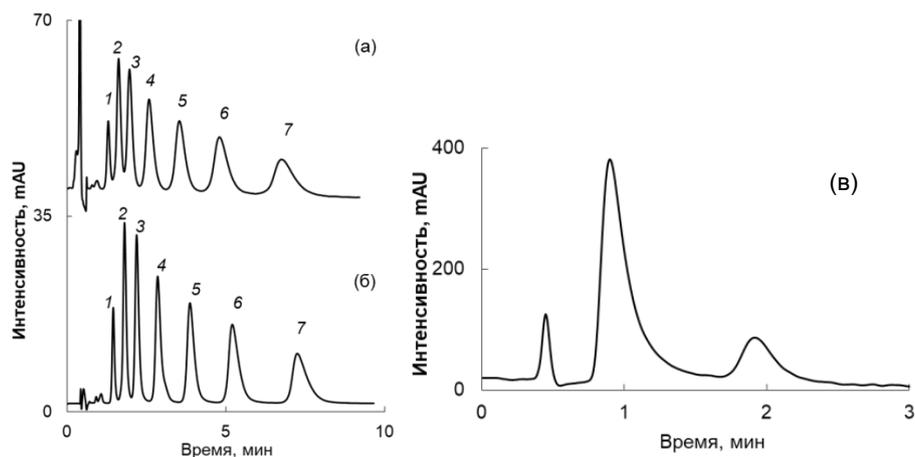


Рис. 11. Хроматограммы алкилбензолов в условиях, указанных в табл.1 (а,б). Сорбенты: П-2Б-Э (а), П-2Б (б). 1 — бензол, 2 — толуол, 3 — этилбензол, 4 — пропилбензол, 5 — бутилбензол, 6 — пентилбензол, 7 — гексилбензол. Хроматограмма смеси энантимеров 4-хлорфенилаланина (в). ПФ: 10 mM ААБ с pH 5.2—CH<sub>3</sub>CN (60:40%). Скорость потока — 1 мл/мин.

Показано, что использование антибиотика приводит к увеличению гидрофильности поверхности разных типов матриц и позволяет экранировать их заряд. Полученные сорбенты на основе ПС-ДВБ являются многофункциональными и позволяют реализовывать режимы ГИХ, ОФ ВЭЖХ и хиральной хроматографии.

**В главе 6** проведено сравнение способов конструирования слоев сорбентов.

*Гидрофильность.* Сравнение гидрофильности фаз, полученных разными способами, и соответствующих матриц согласно тесту Танака приведено на рис. 12. Показано, что модифицирование матрицы по реакции Уги приводит к уменьшению или сохранению гидрофильности. В свою очередь, использование эремомицина для создания новых функциональных слоев приводит к увеличению гидрофильности поверхности разных типов матриц: гидрофильность возрастает в 3 раза на сорбентах на основе силикагеля и ПС-ДВБ.

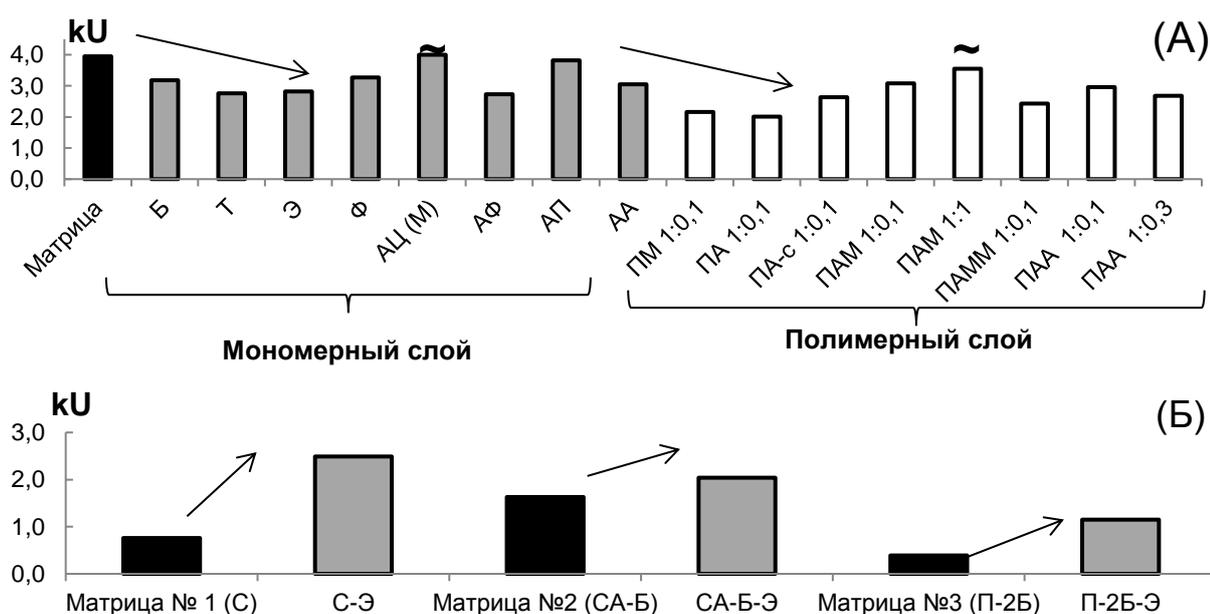


Рис. 12. Сравнение гидрофильности сорбентов, полученных в работе разными способами: по реакции Уги (А) и модифицированием эремомицином (Б), и соответствующих матриц.

**Эффективность.** Значительное увеличение эффективности – до 50% по сравнению с матрицей (до 60000 тт/м) – для фаз, полученных по реакции Уги с мономерным слоем, подтвердило перспективность формирования слоев с помощью данного подхода. Показано, что повысить эффективность в случае полимерного слоя можно за счет увеличения молекулярной массы используемого на стадии синтеза полимера. В то же время для сорбентов на основе силикагеля и полимерной матрицы, модифицированных объемным эремоницином, отмечено значительное уменьшение эффективности практически по всем классам рассматриваемых соединений (рис. 13). При этом показано, что способ закрепления эремоницина с пространственным удалением слоя с помощью разветвленного спейсера позволяет сохранить эффективность (до 40000 тт/м) при введении в слой молекул большого размера.

**Стабильность фаз.** Сорбенты с эремоницином показали лучшую стабильность в ходе эксплуатации: после пропускания 10 л элюента не отмечено изменений времен удерживания и эффективности для всех фаз. На сорбенте, полученном по реакции Уги с мономерным слоем, после пропускания 5 л элюента наблюдали уменьшение эффективности в 2 раза, что может быть связано с недостаточной стабильностью во времени непосредственно аминопропилсиликагеля. Показано, что введение полимерного соединения или молекулы большого размера увеличивает стабильность слоя и уменьшает потерю привитых групп.

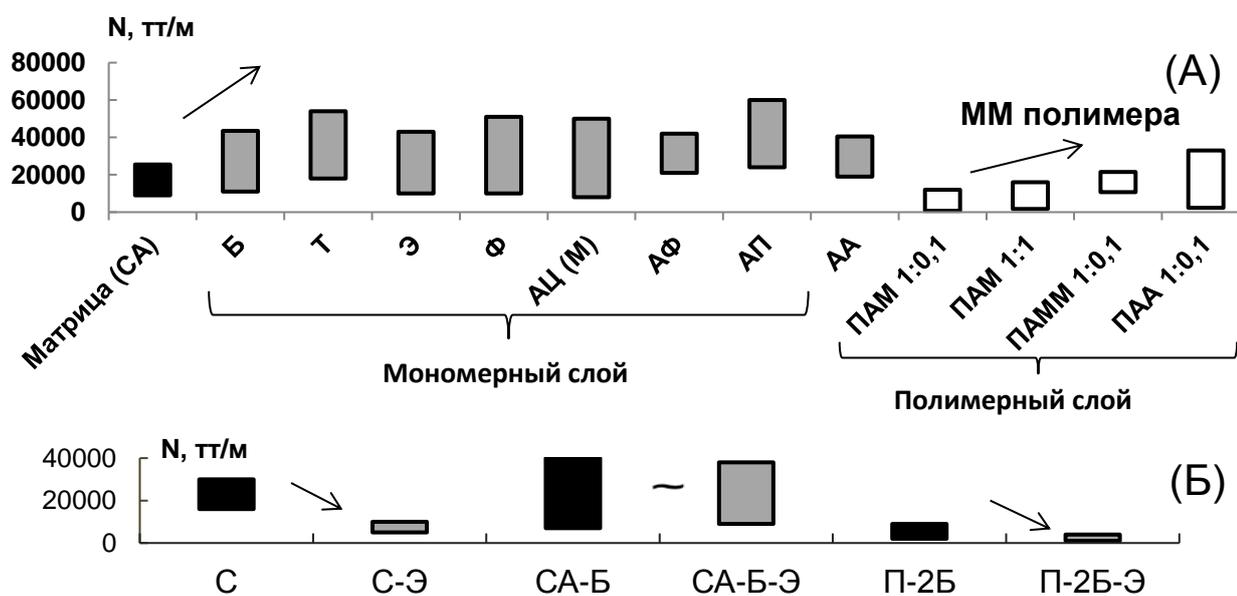


Рис. 13. Сравнение эффективности по витаминам для сорбентов, полученных в работе разными способами: по реакции Уги (А) и модифицированием эремоницином (Б), и для соответствующих матриц.

**В главе 7** показана классификация разработанных фаз. Получены зависимости коэффициентов селективности витаминов кислотной природы относительно нейтрального  $V_2$  от  $\alpha(AX)$  для 32 сорбентов, характеризующиеся коэффициентами корреляции  $r = 0.888$  для аскорбиновой и  $r = 0.922$  для никотиновой кислоты (рис. 14). С помощью такого рода зависимостей можно ориентировочно предсказывать удерживание подобных отрицательно заряженных веществ, а также по найденным параметрам

оценивать анионообменную селективность фаз. Глава также посвящена сравнению характеристик полученных гидрофильных неподвижных фаз с коммерчески доступными сорбентами. Продемонстрировано, что разработанные фазы не уступают по хроматографическим свойствам коммерчески доступным колонкам и в ряде случаев превосходят их по селективности и эффективности.

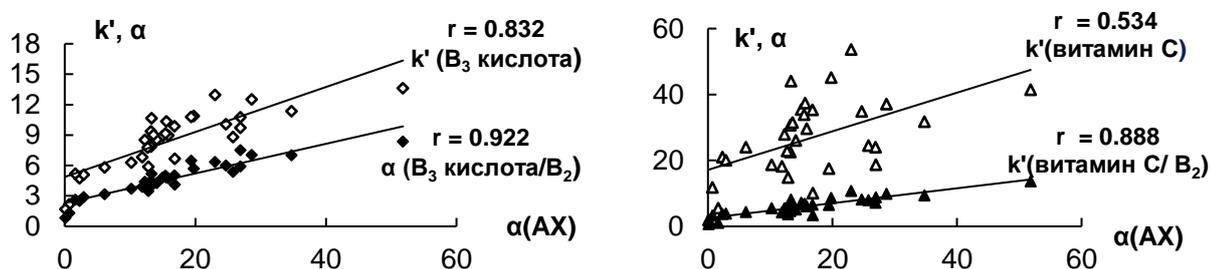


Рис. 14. Зависимость фактора удерживания никотиновой (слева) и аскорбиновой кислот (справа) или коэффициента селективности пар витамин/  $B_2$  от  $\alpha(AH)$  для 32 фаз на основе силикагеля, модифицированных по реакции Уги и эремомицином.

В главе 8 изучены механизмы удерживания различных модельных соединений. Продемонстрирован значимый вклад электростатических взаимодействий в удерживание ксантина, фосфоновых и галогенуксусных кислот.

В главе 9 показана применимость разработанных фаз к анализу реальных объектов на примере определения углеводов, аминокислот и витаминов, азотистых оснований и нуклеозидов в препаратах и напитках (кофе, вино, тонизирующий напиток, кисель), а также аминокислот в почве. Достоверность результатов устанавливали методом «введено-найдено». Сорбент, полученный по реакции Уги, также использовали для определения ферментативной активности рибонуклеозидгидролазы. Примеры анализа объектов представлены на рис. 15, метрологические характеристики определения компонентов и результаты анализа — в табл. 11 и 12.

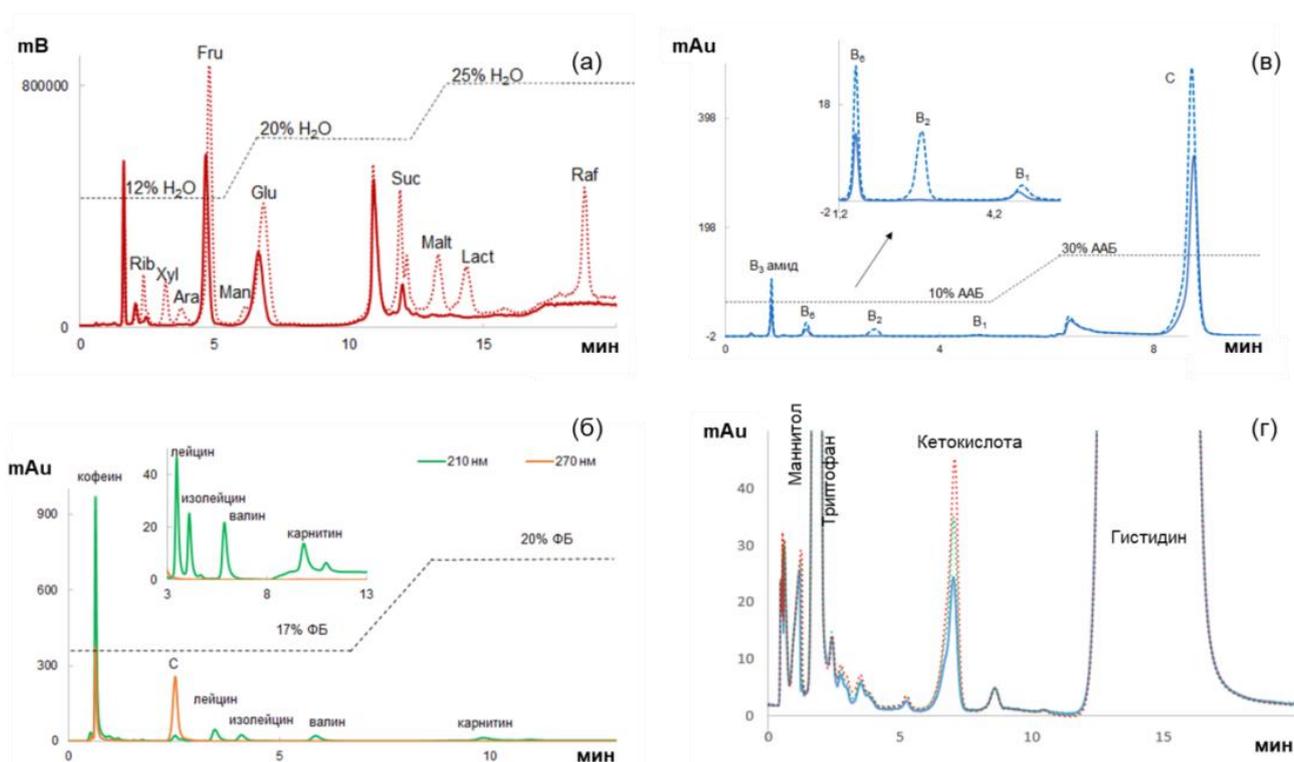


Рис. 15. Хроматограммы вина (а), напитков (б, в); питательного раствора (г).

Таблица 11. Метрологические характеристики определения веществ разных классов (P = 0.95; n = 3) \*Вид градуировочной зависимости y=ас

Сорбент	Вещество	Диапазон линейности, мг/л	$S_r^{**}$	$C_{мин}$ , мг/л	$a^*$	$r$
Эм	Рибоза	50 — 800	0.03	7	$6 \times 10^3$	0.996
	Фруктоза	50 — 1000	0.05	5	$13 \times 10^3$	0.995
	Манноза	50 — 800	0.21	35	$5 \times 10^3$	0.991
	Глюкоза	50 — 1000	0.22	20	$11 \times 10^3$	0.989
	Сахароза	50 — 800	0.06	20	$14 \times 10^3$	0.998
	Мальтоза	50 — 800	0.25	26	$11 \times 10^3$	0.995
	Лактоза	50 — 800	0.30	25	$9 \times 10^3$	0.994
	Раффиноза	50 — 800	0.04	30	$14 \times 10^3$	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> кислота	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	Кетокислота	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

\*\* рассчитано для концентраций: кофеин, В<sub>1</sub> – 2 мг/л, В<sub>3</sub> амид – 5 мг/л, С, В<sub>6</sub> – 7.5 мг/л, В<sub>2</sub> – 0.5 мг/л, В<sub>3</sub> к-та – 1.5 мг/л; 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, кетокислота – 110 мг/л.

Таблица 12. Результаты анализа объектов (n = 3, P = 0.95)

Объект	Вещество	Найденное содержание, мг/л	Концентрация вводимой добавки, мг/л	Найденное содержание с добавкой, мг/л
Вино	Фруктоза	630±60	294	880±60
	Глюкоза	600±50	294	800±100
Кисель	Кофеин	4.9 ± 0.3	10	15 ± 1
	В <sub>3</sub> амид	2.0 ± 0.1	2	4.1 ± 0.2
	В <sub>6</sub>	0.19 ± 0.05	1.5	1.7 ± 0.1
	В <sub>2</sub>	0.10 ± 0.02	0.25	0.30 ± 0.06
	С	22 ± 1	17.5	40 ± 2
Напиток ВСАА ENERGY	Кофеин	24 ± 1	12	34 ± 1
	С	23 ± 1	37.5	61 ± 2
	Лейцин	410 ± 40	450	900 ± 50
	Изолейцин	220 ± 10	255	420 ± 50
	Валин	250 ± 10	222	450 ± 20
	Карнитин	270 ± 10	200	460 ± 20
Раствор	Кетокислота	110 ± 10	50	160 ± 10

## 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. Установлены закономерности удерживания веществ различной природы на полученных сорбентах.

Варьирование реагентов в 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 линейных 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: отмечено увеличение гидрофильности и факторов удерживания полярных веществ на сорбентах, модифицированных эремомицином, по сравнению с соответствующими матрицами. Гидрофилизация матрицы на основе полистирол-дивинилбензола с помощью эремомицина приводит к получению сорбента, подходящего и для обращенно-фазового и гидрофильного режима и сохраняющего возможность разделения энантиомеров благодаря наличию хирального селектора.

Полученные сорбенты подходят для решения разных задач: показана возможность разделения смесей водорастворимых витаминов, азотистых оснований и нуклеозидов, углеводов, органических и аминокислот, галогенуксусных и фосфоновых кислот, алкилбензолов. Также показана применимость сорбентов к анализу реальных объектов: напитков, различных фармацевтических препаратов.

## 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 аминофаз 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 линейных 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-бутандиолдиглицидилового эфира, 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, биологически активных добавках, почве и напитках (вино, кофе, тонизирующий напиток, детоксикационный кисель).

**Основные результаты работы изложены в следующих публикациях: Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2. – «Аналитическая химия»:**

1. **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 // Журнал аналитической химии. 2021. Т.76. № 9. С. 832–843. ИФ (Web of Science) – 1.1. 40 %. 0.75 п.л.
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 // Journal of Chromatography A. 2022. V. 1666. P. 462804. ИФ (Web of Science) – 4.601. 50%. 0.5625 п.л.
3. **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 эремоницином // Журнал аналитической химии. 2023. Т.78. № 5. С.438–450. ИФ (Web of Science) – 1.1. 60%. 0.75 п.л.
4. **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 // Журнал аналитической химии. 2023. Т.78. № 7. С. 637–647. ИФ (Web of Science) – 1.1. 30%. 0.625 п.л.
5. **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 // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2023. Т.64. № 3. С. 245–255. ИФ (РИНЦ) – 0.778. 60%. 0.625 п.л.

#### **Иные публикации:**

1. **Чикурова Н.Ю.** Новые сорбенты для гидрофильной хроматографии с гликопептидными антибиотиками в функциональном слое // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2020». Москва, Россия. 2020.
2. **Чикурова Н.Ю.**, Шемякина А.О., Нуриев В.Н., Чернобровкина А.В., Шпигун О.А. Новые гидрофильные сорбенты и способы управления их селективностью с использованием многокомпонентной реакции Уги // Материалы IV Всероссийской Конференции с международным участием «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Туапсе, Россия. 2020. С. 169.
3. Шапошников Л.А., **Чикурова Н.Ю.**, Пометун А.А., Тишков В.И. Получение рекомбинантного фермента RihC из бактерий *Lactobacillus reuteri* и изучение его свойств // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021». Москва, Россия. 2021. С. 1211.
4. **Чикурова Н.Ю.**, Смоленков А.Д., Староверов С.М., Чернобровкина А.В. Использование гликопептидных антибиотиков для формирования функциональных слоев новых сорбентов для гидрофильной хроматографии // Материалы VI Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием». Туапсе, Россия. 2021. С.73.

5. **Чикурова Н.Ю.**, Беляева А.А., Чернобровкина А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А. Синтез, изучение и практическое применение сорбентов для гидрофильной хроматографии с новыми типами функциональных слоев // Материалы Всероссийского симпозиума «Физико-химические методы в междисциплинарных экологических исследованиях». Севастополь. 2021. С. 229-230.
6. **Chikurova N.**, Shemiakina A., Belyaeva A., Chernobrovkina A., Shpigun O. Novel Adsorbents for HILIC Obtained via the Ugi Multicomponent Reaction Varying Isocyanide and Carbonyl Compound // 33rd International Symposium on Chromatography – ISC 2022. 2022. Hungary, Budapest. P. 131.
7. **Чикурова Н.Ю.**, Шемякина А.О., Беляева А.А., Чернобровкина А.В. Новые подходы к формированию функционального слоя сорбентов для определения полярных веществ // Тезисы докладов, представленных на IV Съезде аналитиков России. Москва, Россия. 2022. С.144.
8. **Чикурова Н.Ю.**, Горбовская А.В., Ставрианиди А.Н., Чернобровкина А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А. Использование новых неподвижных фаз на основе различных матриц для разделения полярных веществ с помощью гидрофильной хроматомасс-спектрометрии // Материалы Девятого всероссийского симпозиума и школы-конференции молодых ученых «Кинетика и динамика сорбционных процессов», приуроченные к 150-летию со дня рождения М.С. Цвета. Сочи, Россия. 2022. С. 97-98.

*Автор выражает искреннюю признательность и благодарность научному руководителю к.х.н., доц. Чернобровкиной А.В. за помощь в постановке задач и обсуждении результатов исследования; д.х.н., проф., чл.-корр. РАН Шпигуну О.А. и д.х.н., проф. Пирогову А.В. за помощь и консультацию по тематике работы, д.х.н. Староверову С.М. за любезно предоставленные сорбенты и соединения для синтеза, к.х.н., доц. Нуриеву В.Н. за помощь в синтезе веществ, к.х.н., н.с. Соболеву Н.А. за проведение элементного анализа, д.х.н., в.н.с. Статкусу М.А. и д.х.н., доц. Ставрианиди А.Н. за помощь в получении и обработке данных, а также благодарность всем членам лаборатории хроматографии за помощь и поддержку. Автор выражает благодарность за финансовую поддержку выполненных исследований в рамках грантов РФФ «Новые сепарационные материалы для ионной и гидрофильной хроматомасс-спектрометрии» (20-13-00140, Номер ЦИТИС: АААА-А20-120121190066-3), РФФ «Получение ключевых белков лактобактерий, синтезирующихся в ответ на действие *Klebsiella pneumoniae* и исследование их влияния на рост патогенных организмов» (23-64-10029, Номер ЦИТИС 123053000084-4), РФФИ «Разработка новых многофункциональных сорбентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии и их применение для решения проблем экологической, продовольственной и токсикологической безопасности» (20-03-00909, Номер ЦИТИС: АААА-А20-120013190032-6). Исследование проводили с использованием оборудования ЦКП МГУ «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование», приобретенного МГУ по программе обновления приборной базы в рамках национального проекта «Наука» и в рамках Программы развития МГУ.*