

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Хрисанфова Анна Олеговна

**Разработка способов изучения свойств неподвижных фаз
в условиях гидрофильной хроматографии**

Специальность 1.4.2. Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук

Чернобровкина Алла Валерьевна

Москва – 2026

Оглавление

Список основных обозначений и сокращений.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. Особенности удерживания веществ в гидрофильной хроматографии (обзор литературы)	12
1.1. Подвижная фаза в гидрофильной хроматографии	13
1.2. Многообразие неподвижных фаз для гидрофильной хроматографии	15
1.3. Механизм удерживания.....	17
1.3.1. Распределительный механизм удерживания	18
1.3.2. Вторичные взаимодействия	21
1.3.3. Термодинамические параметры удерживания в гидрофильной хроматографии	29
1.4. Способы описания свойств неподвижных фаз.....	30
1.4.1. Определение ёмкости колонки	31
1.4.2. Изучение закономерностей и механизмов удерживания тестовых веществ	34
1.4.3. Сравнение удерживания и селективности разделения аналитов разных классов	40
1.4.4. Специальные тесты, основанные на измерении коэффициентов селективности определенных пар веществ	41
1.4.5. Способы представления и обработки результатов характеристики неподвижных фаз	47
1.5. Существующие рекомендации выбора условий разделения в гидрофильной хроматографии	48
Постановка задачи работы.....	50
ГЛАВА 2. Экспериментальная часть.....	52
2.1. Аппаратура	52
2.2. Реактивы и материалы.....	53
2.3. Характеристики неподвижных фаз.....	54
2.4. Свойства тестовых веществ	58
2.5. Приготовление растворов.....	62
2.5.1. Приготовление буферных растворов и растворов тестовых веществ	62
2.5.2. Пробоподготовка спортивного напитка	64
2.6. Подходы к измерению pK_a	65
2.7. Способы измерения анионообменной ёмкости	65
2.8. Подходы к обработке многомерных данных	66
ГЛАВА 3. Разработка подходов для изучения независимого влияния компонентов подвижной фазы на удерживание тестовых веществ	69
3.1. Выбор тестовых веществ	70
3.2. Варьирование концентрации элюирующего иона	71
3.3. Независимое варьирование pH	71
3.4. Оценка влияния природы буферного раствора	75
3.4.1. Влияние катиона буферного раствора.....	75
3.4.2. Влияние основы буферного раствора.....	77
3.5. Уточнение процедуры варьирования pH	83
Заключение из главы 3	84

ГЛАВА 4. Изучение механизмов и закономерностей удерживания тестовых веществ	85
4.1. Силикагель	85
4.1.1. Закономерности для веществ с постоянным зарядом	86
4.1.1.1. Варьирование концентрации элюирующего иона при разных рН	86
4.1.1.2. Варьирование доли ацетонитрила при разных рН	93
4.1.1.3. Варьирование концентрации элюирующего иона при разных долях ацетонитрила	95
4.1.2. Закономерности для слабых оснований и кислот	98
4.2. Силикагель, модифицированный эремомицином	107
4.2.1. Закономерности удерживания тестовых веществ в присутствии 90 об.% ацетонитрила	108
4.2.2. Влияние доли ацетонитрила на закономерности удерживания тестовых веществ	112
4.3. Влияние типа функциональных групп сорбента на закономерности удерживания тестовых веществ	114
4.4. Установление связи термодинамических параметров и механизма удерживания	122
4.5. Пример выбора условий разделения компонентов реального объекта	126
Заключение из главы 4	130
ГЛАВА 5. Применение хемометрических подходов для сравнения селективности неподвижных фаз	132
5.1. Кластеризация сорбентов по данным теста Танака	134
5.2. Кластеризация сорбентов по данным удерживания биологически активных веществ	137
5.3. Выбор сокращённого набора аналитов для сравнения селективности неподвижных фаз	141
Заключение из главы 5	145
ГЛАВА 6. Параметры для характеристики гидрофильных и анионообменных свойств неподвижных фаз	147
6.1. Сравнение существующих и предложенных параметров гидрофильности сорбентов	147
6.2. Выбор маркера анионообменных свойств	154
6.2.1. Изучение механизмов удерживания веществ-маркеров	155
6.2.2. Анионообменная ёмкость колонок	164
6.2.3. Альтернативный параметр для оценивания анионообменных свойств неподвижных фаз	167
Заключение из главы 6	171
Заключение	172
Выводы	175
Список литературы	177
Приложения	187

Список основных обозначений и сокращений

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ГИХ – гидрофильная хроматография;

ГК – главная компонента;

ИХ – ионная хроматография;

МГК – метод главных компонент;

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;

ПС-ДВБ – полистирол-дивинилбензол;

УФ – спектрофотометрический детектор УФ-диапазона;

${}^w_p\text{pH}$ – pH водного раствора, измеренный pH-метром, калиброванным по водным стандартным растворам;

${}^s_p\text{pH}$ – pH водно-органической смеси, измеренный pH-метром, калиброванным по водным стандартным растворам;

${}^s_p\text{pH}$ – pH водно-органической смеси, измеренный pH-метром, калиброванным по водно-органическим стандартным растворам;

w_pK_a – константа кислотности в воде;

s_pK_a – константа кислотности в водно-органической смеси по шкале ${}^w_p\text{pH}$;

s_pK_a – константа кислотности в водно-органической смеси по шкале ${}^s_p\text{pH}$;

MCAA – монохлоруксусная кислота;

MSA – метансульфоновая кислота;

ESA – этансульфоновая кислота;

PSA – пропансульфоновая кислота;

BSA – бутансульфоновая кислота;

SPTS или p-TSA – п-толуолсульфонат натрия или п-толуолсульфоновая кислота;

SPSS – п-стиролсульфонат натрия;

SBS – бензолсульфонат натрия;

TMPC – триметилфениламмоний хлорид;

VTMAC – 4-винилбензилтриметиламмоний хлорид;

BTMAC – бензилтриметиламмоний хлорид;

BTEAC – бензилтриэтиламмоний хлорид.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Широкий круг актуальных аналитических задач, таких как контроль качества фармацевтических препаратов, продуктов питания, мониторинг объектов окружающей среды, метаболомный анализ, объединяет необходимость одновременного определения полярных нейтральных и заряженных соединений. Селективности хорошо разработанного метода обращённо-фазовой хроматографии (ОФ ВЭЖХ) зачастую бывает недостаточно для разделения интересующих аналитов из-за их слабого удерживания. Хорошей альтернативой является метод гидрофильной хроматографии (ГИХ), в котором селективность разделения веществ на полярных неподвижных фазах обеспечивается за счёт одновременного влияния нескольких типов взаимодействий.

Ключевым параметром хроматографической системы, определяющим селективность разделения, является неподвижная фаза. В настоящее время известно большое многообразие колонок для гидрофильной хроматографии, как промышленно выпускаемых, так и разрабатываемые в лабораториях, отличающихся структурой модификаторов и природой матрицы сорбента. С одной стороны, разнообразие неподвижных фаз расширяет вариативность метода, делая его пригодным для разделения большего круга аналитов. С другой, создаёт проблему правильного выбора фазы для решения конкретной аналитической задачи, вытекающую из недостаточного понимания механизмов удерживания и их относительных вкладов. Дополнительные сложности при выборе условий разделения возникают из-за преобладания органического растворителя в подвижной фазе, что затрудняет предсказание поведения заряженных аналитов в хроматографической системе.

Среди существующих способов описания хроматографических свойств неподвижных фаз наиболее доступными и часто применяемыми являются изучение механизмов удерживания тестовых соединений с использованием известных моделей для распределения, адсорбции и ионного обмена, сравнение удерживания аналитов из нескольких классов, а также специальные тесты для оценки влияния различных взаимодействий, основанные на измерении коэффициентов селективности веществ-маркеров (тест Танака). Однако данные подходы имеют

ограничения и недостатки, связанные в первую очередь с выбором веществ-маркеров и условиями тестирования, которые особенно проявляются для многофункциональных сорбентов на основе полистирол-дивинилбензола (ПС-ДВБ). Таким образом, актуальность работы определяется необходимостью развития фундаментальной базы метода гидрофильной хроматографии, разработки новых подходов количественной оценки свойств неподвижных фаз, а также составления рекомендаций для наиболее эффективного выбора параметров хроматографической системы для компонентов конкретных реальных объектов.

Цель работы заключалась в разработке новых и модификации существующих хроматографических способов описания свойств полярных неподвижных фаз для выбора условий разделения в гидрофильной хроматографии.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

- Выбрать состав подвижной фазы и разработать подходы к его варьированию, позволяющие минимизировать нежелательное влияние одновременно изменяющихся параметров хроматографической системы, поскольку механизм удерживания веществ в гидрофильной хроматографии крайне чувствителен к составу элюента.
- Установить закономерности удерживания катионов, анионов, слабых оснований, кислот и цвиттер-ионных соединений на немодифицированном силикагеле и силикагеле с привитыми основными, нейтральными и многофункциональными слоями при варьировании рН, концентрации элюирующего иона, доли ацетонитрила и температуры колонки при разных комбинациях фиксированных параметров.
- Применить комплекс хемометрических подходов к данным удерживания биологически активных соединений и теста Танака на неподвижных фазах с низкомолекулярными и полимерными функциональными слоями для выявления сходств и различий в их свойствах.
- Оценить правильность описания свойств полярных неподвижных фаз параметрами гидрофильности и анионообменной селективности из теста Танака путём установления их связи с адсорбционной и ионообменной ёмкостью колонок, предложить альтернативные вещества-маркеры для их оценки.

- На основе установленных закономерностей предложить схему выбора условий разделения компонентов безалкогольного негазированного напитка.

Научная новизна

1. Установлены условия, позволяющие изучить влияние рН подвижной фазы на удерживание веществ в гидрофильной хроматографии независимо от концентрации элюирующего иона и природы компонентов буферного раствора, учитывающие изменение констант диссоциации в водно-органической среде по сравнению с водной.
2. Оценены значения констант диссоциации ${}^s_pK_a(\text{HA}, \text{BH}^+)$ в среде, содержащей 85 и 90 об.% ацетонитрила, для муравьиной, уксусной, монохлоруксусной, пропионовой, 4-метилбензойной, 4-метоксибензойной, бензойной кислот, ксантина, аммония и кислот, сопряжённых по отношению к 4-диметиламинопиридину, 4-аминопиридину, бензиламину и цитозину. Их использование позволяет надёжнее интерпретировать закономерности удерживания веществ и прогнозировать их поведение в хроматографической системе по сравнению с константами диссоциации в водной среде.
3. Установлены диапазоны рН (${}^w_p\text{pH}$ и ${}^s_p\text{pH}$) проявления анионообменных, цвиттер-ионных и катионообменных свойств для силикагеля с привитым эремоницином Диасфер-110-Ere (АО «БиоХимМак СТ») при 85 и 90 об.% ацетонитрила в подвижной фазе.
4. Показано, что одновременное применение метода главных компонент, иерархической кластеризации, метода К-средних и индекса Рэнда к данным удерживания биологически активных соединений разных классов позволяет однозначно установить существенные различия в селективности сорбентов с полимерными и низкомолекулярными функциональными слоями и сократить набор тестовых веществ до трёх, позволяющих экспрессно сравнивать свойства неподвижных фаз.
5. Предложен способ оценки гидрофильности и анионообменных свойств неподвижных фаз по факторам удерживания тиомочевины и метансульфоната, соответственно, в условиях теста Танака для гидрофильной хроматографии, демонстрирующим лучшую корреляцию с объёмом воды, адсорбированной на

поверхности фазы, и анионообменной ёмкостью колонок, чем параметры теста Танака.

6. Показано одновременное хроматографическое разделение неорганических катионов и анионов на анионообменниках на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола в элюенте, содержащем аммонийно-ацетатный буферный раствор и более 80 об.% ацетонитрила.

Практическая значимость

1. Установлены закономерности целенаправленного изменения времени удерживания аналита при увеличении рН подвижной фазы, которые можно использовать для повышения селективности и экспрессности разделения в гидрофильной хроматографии. Показано, что закономерности имеют аналогичный вид на силикагеле с немодифицированными силанольными, диольными, амино и цвиттер-ионными функциональными группами.
2. Установлены профили удерживания веществ (катионов, анионов, слабых оснований, кислот и амфолитов) при варьировании концентрации и природы буферного раствора, доли ацетонитрила и температуры колонки на немодифицированном силикагеле и его производных с основными, нейтральными и многофункциональными модификаторами, позволяющие прогнозировать условия элюирования и повышать селективность разделения многокомпонентных смесей.
3. Из групп соединений (азотистые основания, нуклеозиды, углеводы, карбоновые кислоты и водорастворимые витамины – 33 аналита) выбраны три тестовых вещества (цитидин, 2'-дезоксуридин, гуанин) для сравнения селективности неподвижных фаз в условиях гидрофильной хроматографии, что позволяет сократить время тестирования одной колонки с недели до трёх часов.
4. Предложены условия одновременного разделения ионов (K^+ , Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NO_3^-) с эффективностью до 45000 тт/м на аминированных силикагеле и полистирол-дивинилбензоле с использованием смеси аммонийно-ацетатного буферного раствора w_pH 4.7 и ацетонитрила в соотношении 15/85 об.%.

5. На основании полученных закономерностей удерживания предложены условия разделения водорастворимых витаминов, искусственных подсластителей, регуляторов кислотности и консервантов в безалкогольном негазированном напитке.

Положения, выносимые на защиту

1. Использование буферных систем на основе муравьиной, уксусной и пропионовой кислот с ионами натрия в качестве противоионов при поддержании постоянной концентрации сопряженного основания и учёт его сродства к неподвижной фазе позволяет провести независимое варьирование рН элюента в условиях гидрофильной хроматографии и получить корректные закономерности удерживания веществ, интерпретируемые с опорой на константы диссоциации аналитов s_pK_a и являющиеся основой для выбора условий разделения многокомпонентных смесей.
2. Для ионизируемых соединений в гидрофильной хроматографии закономерности удерживания с увеличением рН подвижной фазы не зависят от типа функциональных групп, ковалентно закреплённых на силикагеле, по крайней мере диольных, амино, цвиттер-ионных, что можно использовать на других доступных неподвижных фазах для повышения селективности разделения.
3. Обработка данных удерживания биологически активных соединений разных классов в условиях гидрофильной хроматографии комплексом хемометрических подходов (метод главных компонент, иерархическая кластеризация, метод К-средних и индекс Рэнда) позволяет надёжно дифференцировать по селективности неподвижные фазы с низко- и высокомолекулярными модификаторами на основе силикагеля и выделять тестовые вещества (цитидин, 2'-дезоксисуридин, гуанин) для экспрессного сравнения селективности фаз.
4. В условиях теста Танака для гидрофильной хроматографии фактор удерживания метансульфоната позволяет оценить анионообменную ёмкость аминированных силикагеля и полистирол-дивинилбензола, коэффициент селективности бутан- и пропансульфоната – их гидрофобность, а фактор

удерживания тиомочевины – объём воды, адсорбированный на поверхности модифицированного силикагеля.

Степень достоверности. Достоверность результатов обеспечивалась применением реагентов высокой степени чистоты, контролем стабильности хроматографических колонок, использованием современного хроматографического оборудования и статистической обработкой получаемых данных.

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 11 всероссийских и международных научных конференциях (8 устных и 16 стендовых докладов): XXX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2023» (Москва, Россия, 2023), Fourteenth Winter Symposium on Chemometrics (Цахкадзор, Армения, 2024), XXXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2024» (Москва, Россия, 2024), XIII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2024» (Санкт-Петербург, Россия, 2024), 34th International Symposium on Chromatography (Ливерпуль, Великобритания, 2024), XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Сириус, Россия, 2024), 53rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Далянь, Китай, 2024), XXXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2025» (Москва, Россия, 2025), 54th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Брюгге, Бельгия, 2025), Симпозиум по ионной хроматографии (Москва, Россия, 2025), VII Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, Россия, 2025).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2. Аналитическая химия.

Личный вклад автора. Представленные результаты исследования получены лично автором, под его руководством или в соавторстве. Личный вклад автора состоял в постановке задач исследования, поиске и систематизации литературных данных по теме работы, планировании, постановке и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке материалов по теме диссертации к публикации и представлении полученных результатов на конференциях. Сорбенты Kromasil 100-5-SIL, Диасфер-110-амин и Диасфер-110-Ege были предоставлены АО «БиоХимМак СТ» (Россия). Помощь в получении и обработке данных на приборе с испарительным детектором по светорассеянию оказана д.х.н. Статкусом М.А. и д.х.н., проф. Цизиным Г.И.; помощь в хемометрической обработке данных – к.х.н. Самохиным А.С., асп. Хрисанфовым М.Д.; помощь в проведении анализов на ионном хроматографе – к.х.н. Гармаем А.В. Под руководством автора выполнена дипломная работа Максимовым Г.С., выпускная квалификационная бакалаврская работа и магистерская диссертация Смагиной М.А.

Структура и объем работы. Работа имеет следующую структуру: список основных обозначений и сокращений, введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение (представлены в четырех главах), заключение, выводы, список использованной литературы, приложения. Материал изложен на 193 страницах машинописного текста, содержит 69 рисунков, 34 таблицы и 8 приложений. В списке литературы 157 наименований.

ГЛАВА 1. Особенности удерживания веществ в гидрофильной хроматографии (обзор литературы)

Метод гидрофильной хроматографии (ГИХ) является широко используемым режимом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для разделения полярных нейтральных и заряженных соединений [1,2], имеющих слабое удерживание в условиях обращенно-фазовой хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Метод играет важную роль в анализе широкого круга объектов, включая анализ фармпрепаратов, биологических образцов, природных объектов и продуктов питания [3–5]. Возможности гидрофильной хроматографии расширяются за счёт сочетания с высокочувствительным и информативным масс-спектрометрическим детектированием, а также использования в варианте двумерной хроматографии [6].

Традиционными условиями работы в режиме ГИХ являются подвижная фаза состава вода/ацетонитрил с преобладанием последнего компонента и полярная неподвижная фаза, на поверхности которой адсорбируется вода из элюента. Для поддержания постоянной степени диссоциации групп сорбента и аналита в подвижную фазу часто добавляют буферный раствор. В такой системе для полярного вещества реализуется механизм распределения между иммобилизованным слоем воды и подвижной фазой, исходно считавшийся преобладающим [1]. Этот механизм удерживания обусловлен гидрофильными взаимодействиями [1]. Однако на удерживание также существенно влияет непосредственное взаимодействие аналита с группами сорбента (электростатические взаимодействия, водородные связи и т.д.) [7], что делает ГИХ смешанным режимом хроматографии (mixed-mode) [3]. Ключевое влияние на соотношение вкладов разных механизмов в удерживание вещества оказывает структура неподвижной фазы [7,8]. В гидрофильной хроматографии не существует универсального сорбента, подобного силикагелю с октадецильными группами в ОФ ВЭЖХ, используют разнообразные фазы в зависимости от решаемой задачи.

Комплексный механизм удерживания в условиях ГИХ обеспечивает селективное разделение многокомпонентных смесей веществ разной структуры и заряда. Однако выбор условий анализа зачастую требует больших временных затрат, поскольку на данный момент механизмы удерживания, а, следовательно, и пути управления селективностью разделения, не до конца изучены. В силу важности

метода для решения большого спектра аналитических задач необходимо углубление понимания процессов в хроматографической системе с целью формирования обоснованных стратегий выбора условий анализа.

1.1. Подвижная фаза в гидрофильной хроматографии

Высокое содержание ацетонитрила более 60 об.% в элюенте приводит к изменению основности и диэлектрической проницаемости среды, что, как следствие, влияет на рН буферных растворов и константы кислотности аналитов и функциональных групп сорбентов [9,10]. Кислотность водно-органической смеси может быть выражена одним из двух способов: ${}^s\text{pH}$ и ${}^w\text{pH}$, где ${}^w\text{pH}$ – значение, полученное при измерении рН смешанной среды рН-метром, калиброванным по водным стандартным растворам, ${}^s\text{pH}$ – термодинамическое значение, полученное при измерении рН смешанной среды рН-метром, калиброванным по водно-органическим смесям. Верхний индекс обозначает среду, в которой измеряют рН, нижний – среду, в которой коэффициент активности принят равным 1 при бесконечном разбавлении (w – вода, s – водно-органическая смесь). Наиболее удобной шкалой является шкала ${}^w\text{pH}$, не требующая дополнительных труднодоступных водно-органических стандартных растворов. Кроме того, существует установленная связь между значениями ${}^w\text{pH}$ и ${}^s\text{pH}$ для одного и того же раствора:

$${}^s\text{pH} = {}^w\text{pH} - \delta \quad (1)$$

где параметр δ , значения которого определены, зависит от состава раствора и температуры [11]. Он представляет собой учёт эффекта среды ($\log(\gamma)$), связанного с изменением стандартной энергии Гиббса для перевода протонов из воды в водно-органический раствор при бесконечном разбавлении при данной температуре, и изменения диффузионного потенциала при переходе от водного раствора к водно-органическому (незначителен, зачастую пренебрегают):

$$\delta = \Delta\bar{E}_j - \log({}^s\gamma_H^\circ) \quad (2)$$

Например, величина параметра δ для подвижной фазы, содержащей 90 об.% ацетонитрила, составляет -1.661 при 25°C [11]. Уравнение (1) также справедливо для констант диссоциации (${}^s\text{pK}_a$ и ${}^w\text{pK}_a$).

Эмпирические зависимости водно-органических рН и рКа от водных и содержания органического растворителя выведены только для смесей с 40-100 об.%

воды для отдельных буферных растворов (ацетатный, фосфатный, цитратный, аммонийный) и аналитов (пиридины, амины, карбоновые кислоты, фенолы) [9,12]:

$${}^s\text{pH} - {}^w\text{pH} = m_{\text{pH}} \varphi_{\text{CH}_3\text{CN}} \quad (3)$$

$${}^s\text{pK}_a = a_s {}^w\text{pK}_a + b_s \quad (4)$$

где m_{pH} – коэффициент пропорциональности между изменением рН при добавлении ацетонитрила и его содержанием, зависящий от природы используемого буферного раствора и исходной величины ${}^w\text{pH}$, a_s и b_s зависят от содержания органического растворителя и ряда эмпирических параметров, специфичных для каждого класса веществ. Для составов смесей, соответствующих подвижным фазам в гидрофильной хроматографии, подобных зависимостей на данный момент не существует. С позиции авторов серии работ по данной теме [13] ограничения на вывод таких уравнений связаны с необходимостью учёта процессов образования ионных пар в среде с высоким содержанием ацетонитрила. Однако такая среда, характеризуется относительно высокой диэлектрической проницаемостью ($\epsilon=40.4$ при 90% содержании ацетонитрила [14]), превышающей нижнюю границу $\epsilon=35$ [15], обеспечивающей диссоциацию веществ. По классификации Брэнстеда даже чистый ацетонитрил ($\epsilon = 36$) имеет выраженные в заметной степени ионизирующие свойства [16]. Таким образом, в предположении высокой ионизирующей способности водно-ацетонитрильных смесей любого состава выражения для констант кислотно-основных равновесий сохраняются [10].

Качественные изменения констант диссоциации при добавлении ацетонитрила в зависимости от типа групп вещества следующие: значения констант кислотности (${}^s\text{pK}_a$, ${}^s\text{pK}_a$) для слабых кислот увеличиваются, для слабых оснований – уменьшаются. В соответствии с теорией Измайлова на константы кислотности кислот в первую очередь влияет уменьшение диэлектрической проницаемости среды при введении ацетонитрила, тогда как на константы кислотности сопряжённых к основаниям кислот – изменение основности среды и специфический сольватационный эффект [17]. Данные изменения констант диссоциации приводят к изменению рН соответствующих буферных растворов (рис. 1).

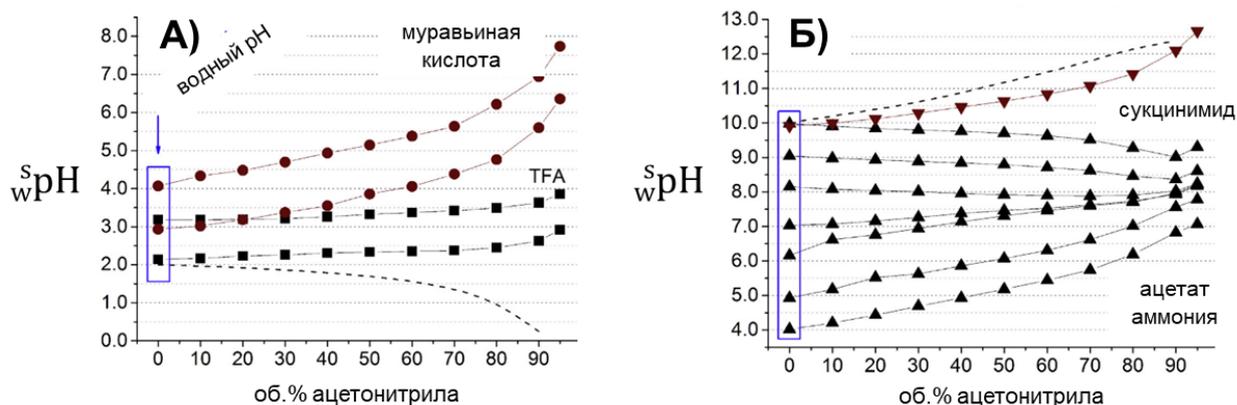


Рис. 1. Измеренные значения s_{pH} при добавлении различных количеств ацетонитрила к буферным растворам на основе А) муравьиной и трифторуксусной кислоты (TFA), Б) сукцинимида и ацетата аммония [18].

Вопрос о том, какими величинами pH и pK_a оперировать при работе в режиме гидрофильной хроматографии, измеренными по водной шкале (w_{pH} , w_{pK_a}) или водно-органической (s_{pH} , s_{pK_a}), остаётся открытым [19,20]. С одной стороны, процессы распределения, адсорбции и ионного обмена протекают у поверхности частиц сорбента, где формируется насыщенный водой слой, что делает оправданным использование водных значение pH [21,22]. Кроме того, константы кислотности w_{pK_a} многих аналитов хорошо известны, тогда как константы s_{pK_a} определены лишь для очень узкого круга веществ при некоторых составах элюента [18,23]. С другой стороны, с опорой на величины s_{pH} и s_{pK_a} интерпретируют тренды удерживания в ГИХ [24,25], что не всегда возможно сделать с использованием только значений w_{pH} и w_{pK_a} , даже при работе в условиях обращенно-фазовой хроматографии [14]. В данной работе w_{pH} водного буферного раствора доводили до нужного значения с использованием pH -метра, измеряли s_{pH} в элюенте и оценивали s_{pK_a} , тем самым пополняя массив измерений для разных соединений.

1.2. Многообразие неподвижных фаз для гидрофильной хроматографии

Известно большое многообразие колонок разных фирм-производителей, используемых для работы в режиме гидрофильной хроматографии [26,27]. По функциональным группам различают нейтральные, положительно, отрицательно заряженные и цвиттер-ионные неподвижные фазы. В рамках каждого типа существует несколько вариантов значительно отличающихся структур, например, сорбенты, модифицированные амидными, циклодекстриновыми, полигидрокси группами относятся к нейтральным фазам. Большинство фаз представляют собой

химически модифицированные силикагели, некоторые из которых первоначально были разработаны для нормально-фазовой ВЭЖХ (амино-, диольные фазы). Спектр неподвижных фаз расширяется за счёт научных разработок, направленных на достижение иной селективности по сравнению с селективностью коммерчески доступных фаз, улучшение химической и гидролитической стабильности. Помимо закрепления новых более сложных функциональных слоёв на поверхности силикагеля, используют альтернативные матрицы, такие как оксид титана [28] или циркония [29], органические полимеры [30].

Особое внимание среди неподвижных фаз, используемых в условиях гидрофильной хроматографии, привлекают многофункциональные сорбенты, которые содержат в своей структуре фрагменты, обеспечивающие различные типы взаимодействий, чаще всего, гидрофобные, гидрофильные и ионообменные [3,31]. За счёт возможности одновременной реализации нескольких механизмов удерживания происходит разделение существенно отличающихся по природе соединений в одних условиях. Они также перспективны для использования в различных режимах жидкостной хроматографии для веществ со схожими свойствами. Отталкиваясь от определения многофункциональных сорбентов, к ним можно отнести практически все вышеперечисленные типы фаз. Например, на традиционной неподвижной фазе для гидрофильной хроматографии 3-аминопропилсиликагеле реализуются механизмы распределения и ионного обмена на протонированных аминогруппах [31]. Электростатические взаимодействия проявляются даже на нейтральных фазах за счёт остаточных немодифицированных силанольных групп матрицы [21]. Как было отмечено выше, ГИХ является смешанным режимом хроматографии. Однако стоит выделить более комплексные случаи, когда в дополнение к гидрофильным и электростатическим взаимодействиям влияние на удерживание оказывают гидрофобные взаимодействия [32–34]. Их проявление при высоком содержании ацетонитрила отмечено на фазах, содержащих гидрофильные функциональные слои, закрепленные на гидрофобной матрице полистирол-дивинилбензоле.

1.3. Механизм удерживания

Удерживание аналита при прохождении через колонку определяется различными типами межмолекулярных взаимодействий: вещество-неподвижная фаза, вещество-подвижная фаза, а также между подвижной и неподвижной фазами (табл. 1) [35]. Образование водородных и донорно-акцепторных связей относят к специфическим взаимодействиям, сопровождающимся перераспределением электронной плотности в молекулах. Остальные типы взаимодействий являются неспецифическими, однако их роль в удерживании вещества на неподвижной фазе может быть существенна.

Таблица 1. Возможные типы взаимодействий между аналитом, подвижной и неподвижной фазой [35]

Тип взаимодействия	Энергия, кДж/моль
Химическое взаимодействие	
Водородная связь	20-30
Донорно-акцепторная	8-188
Физическое взаимодействие	
Ион-ионное	250-1050
Ион-дипольное	~15
Диполь-дипольное	25-40
Диполь-индуцированный диполь	8-25
Мгновенный диполь-индуцированный диполь	5-20
Физико-химическое взаимодействие	
Гидрофобное	4 [36]

Соотношение вкладов взаимодействий в хроматографическом процессе зависит от природы аналита, состава подвижной фазы и структуры сорбента. В первую очередь необходимо понимание возможных типов взаимодействий, обеспечиваемых неподвижной фазой (рис. 2), которые являются её важной характеристикой. Так, гидроксильные группы в структуре функционального слоя сорбента участвуют в образовании водородных связей, аминогруппы – донорно-акцепторных, бензольные кольца – π - π взаимодействий [37].

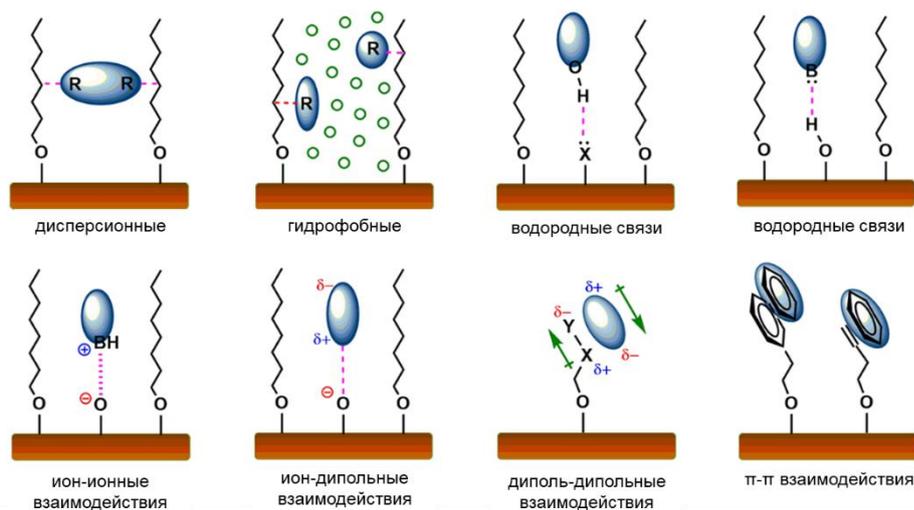


Рис. 2. Различные типы взаимодействий вещество-неподвижная фаза [38].

Более подробную информацию о взаимодействиях в гидрофильной хроматографии можно получить, используя модель Абрахама («LFER» – linear free energy relationship) [39]:

$$\log k' = c + e \cdot E + s \cdot S + a \cdot A + v \cdot V \quad (5)$$

где каждое слагаемое отвечает определенным взаимодействиям вещество-растворитель; e , s , a , b и v – коэффициенты, которые характеризуют хроматографическую систему, их устанавливают путём построения многомерной линейной регрессии между факторами удерживания веществ и их молекулярными дескрипторами E , S , A , B и V , которые должны быть хорошо известны. Однако напрямую модель не применима для заряженных соединений, на удерживание которых влияют электростатические взаимодействия.

1.3.1. Распределительный механизм удерживания

В условиях гидрофильной хроматографии на полярной поверхности сорбента из элюента преимущественно адсорбируются молекулы воды, формируя эффективную неподвижную фазу. Это было подтверждено экспериментально с использованием титрования по Карлу Фишеру образцов подвижной фазы в присутствии сорбента и без него [40], ЯМР ^2H [41], удерживания толуола и бензола [42,43]. Также был предложен подход для оценки количества адсорбированной воды, заключающийся в установлении числа гипотетических эквивалентов мономолекулярных слоёв воды во внутренних порах сорбента, основанный на применении сочетания фронтального анализа и кулонометрического титрования по Карлу Фишеру для определения концентрации воды во фракциях элюента,

собираемого с колонки [44]. Количество адсорбированной воды на поверхности неподвижной фазы зависит от состава элюента, в первую очередь соотношения вода/ацетонитрил [42,43,45]. Так, поверхностная избыточная адсорбция воды достигает максимума при 80 об.% ацетонитрила в элюенте и уменьшается при возрастании доли органического растворителя (рис. 3).

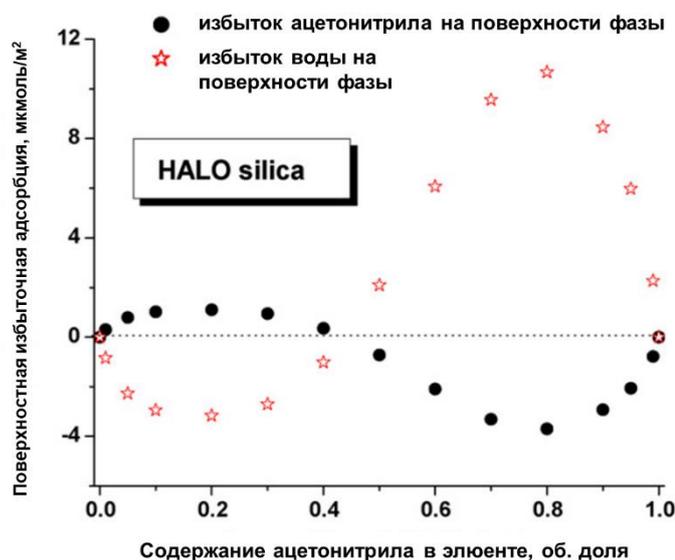


Рис. 3. Поверхностная избыточная адсорбция воды и ацетонитрила на неподвижной фазе HALO silica при различном соотношении вода/ацетонитрил в элюенте, $T=295$ К [45].

Между преимущественно водным слоем на поверхности сорбента и преимущественно органической подвижной фазой, между которыми нет чёткой границы, происходит распределение аналитов в режиме ГИХ. Закономерность удерживания по данному механизму следующая: более полярные соединения удерживаются дольше [1]. Данное свойство веществ оценивают с помощью физического дескриптора – логарифма коэффициента распределения аналита в системе н-октанол-вода [46], характеризующего гидрофильно-гидрофобный баланс молекулярной структуры сорбата [47]:

$$\log P = \log \frac{[S]_o}{[S]_w} \quad (6)$$

где $[S]_o$ – концентрация вещества S в н-октанол, $[S]_w$ – концентрация вещества S в воде. Чем меньше $\log P$, тем гидрофильнее соединение, тем выше удерживание за счёт распределения. Данный параметр устанавливают (рассчитывают/измеряют) для нейтральных веществ. Для кислот (HA/A^-) или оснований (BH^+/B) определяют параметр $\log D$, учитывающий все формы нахождения вещества в растворе:

$$\log D_{(\text{кислота})} = \log \frac{[HA]_o + [A^-]_o}{[HA]_w + [A^-]_w} \quad (7)$$

$$\log D_{(\text{основание})} = \log \frac{[BH^+]_o + [B]_o}{[BH^+]_w + [B]_w} \quad (8)$$

Величина $\log D$ связана с pH и pKa соединений следующим образом (распределение заряженных форм в н-октанол учтено):

$$\log D_{(\text{кислота})} = \log \frac{P_{(HA)} + P_{(A^-)} \cdot 10^{pH-pK_a}}{1 + 10^{pH-pK_a}} \quad (9)$$

$$\log D_{(\text{основание})} = \log \frac{P_{(B)} + P_{(BH^+)} \cdot 10^{pK_a-pH}}{1 + 10^{pK_a-pH}} \quad (10)$$

Используя уравнения (9) и (10), рассчитывают значения $\log D$ при требуемом значении pH [46] (рис. 4). pH и pKa в данном случае являются ${}^w_w\text{pH}$, ${}^w_w\text{pKa}$. Программные пакеты, например, ACD/Labs предсказывают профили изменения $\log D$ в зависимости от pH на основе структурных формул соединений.

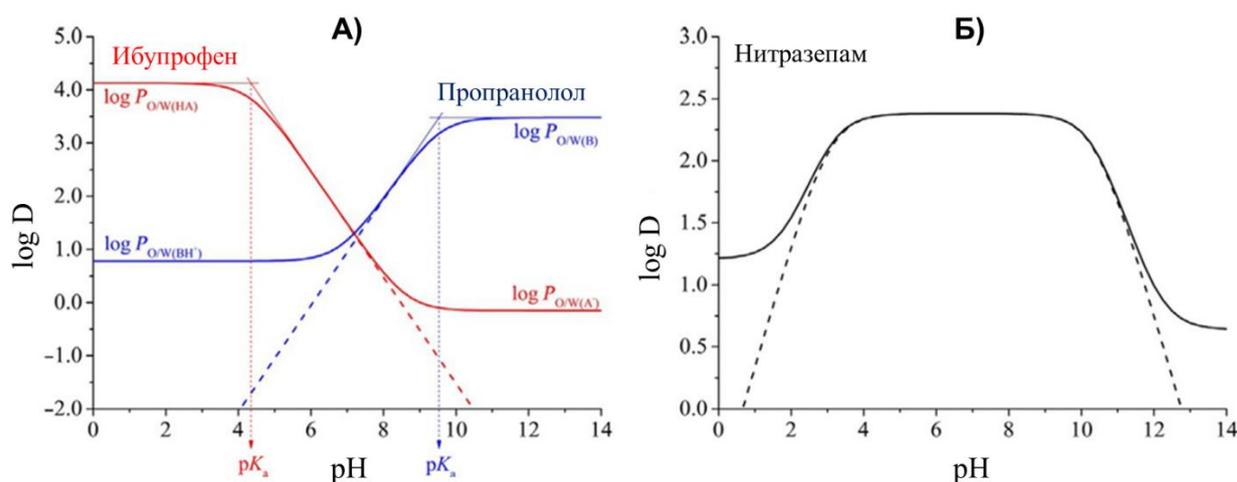


Рис. 4. Зависимость $\log D$ от pH для А) кислоты (ибупрофен), основания (пропранолол) и Б) амфолита (нитразепам) [46].

В ряде работ проверяли гипотезу о корреляции удерживания полярных веществ и параметра $\log P$ ($\log D$) [7,22,48]. Коэффициенты корреляции зависимости $\log k' - \log D$ были меньше 1 на разных колонках при содержании ацетонитрила 80-95 об.% в элюенте, что авторы связывали с реализацией дополнительных вторичных взаимодействий помимо распределения (рис. 5). Особенно было отмечено влияние электростатического притяжения и отталкивания на фазах, содержащих заряженные функциональные группы (силикагель, многофункциональные сорбенты). Однако стоит подчеркнуть, что значения параметров $\log D$, рассчитанных в разных программах для одного и того же вещества, могут существенно отличаться друг от

друга. Также необходимо учитывать влияние ацетонитрила на pH среды и константы кислотности аналитов, что может приводить к изменению их степени диссоциации по сравнению с водным раствором и, следовательно, не точному соответствию рассчитанному $\log D$.

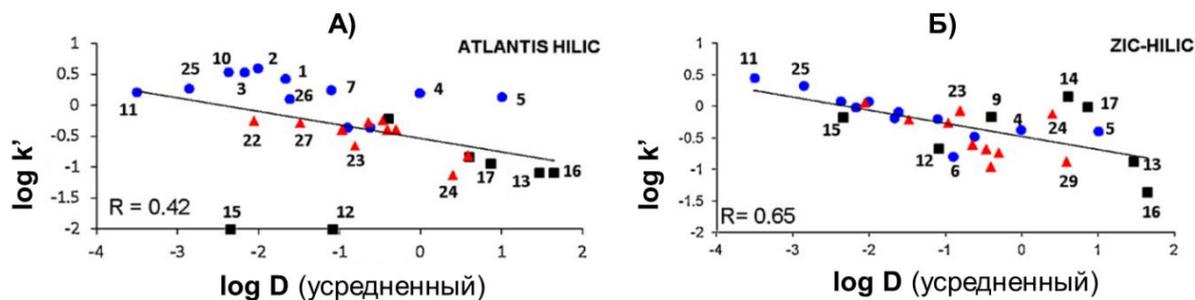


Рис. 5. Зависимость логарифма фактора удерживания вещества от его усредненного параметра $\log D$, рассчитанного при pH 3.0 в трёх разных программах ACD, Marvin и MedChem. Неподвижная фаза: А) ATLANTIS HILIC, Б) ZIC-HILIC. Элюент: 85 об.% ацетонитрила, 5 мМ формиат аммония в элюенте pH 3.0. Обозначения: голубые круги – положительно заряженные соединения, чёрные квадраты – отрицательно заряженные, красные треугольники – нейтральные соединения [7].

В случае реализации распределительного механизма предложена эмпирическая модель удерживания веществ, выведенная изначально для ОФ ВЭЖХ [49]:

$$\log k' = \log k'_o - S \cdot \varphi_{H_2O} \quad (11)$$

где φ_{H_2O} – объёмная доля сильного элюента (воды в гидрофильной хроматографии), k'_o – гипотетический фактор удерживания вещества в 100% слабом элюенте. По линейности зависимости $\log k' - \varphi_{H_2O}$ судят о влиянии распределения на удерживание. С опорой на данную модель была показана реализация распределения для оснований [20,50] и кислот [51].

1.3.2. Вторичные взаимодействия

За время активной разработки метода гидрофильной хроматографии было получено множество свидетельств влияния непосредственного взаимодействия вещество-неподвижная фаза на удерживание. Помимо плохой корреляции удерживания с параметром $\log P$ или $\log D$, различная селективность разделения одинаковых модельных смесей в одних условиях на колонках с разными характеристиками также демонстрирует проявление иных механизмов удерживания кроме распределения [7]. Далее будут рассмотрены теоретические аспекты механизма адсорбции и ионного обмена в условиях ГИХ.

Модель Снайдера-Сочевинского описывает зависимость удерживания от содержания сильного элюента в подвижной фазе при реализации механизма адсорбции в хроматографической системе [52,53]:

$$\log k' = \log k'_B - n \cdot \log X_{H_2O} \quad (12)$$

где X_{H_2O} – мольная доля воды в элюенте, k'_B – фактор удерживания вещества в 100% воде, n – число молекул воды на адсорбционном центре, замещаемых аналитом. Как было отмечено в работе [20], поскольку мольная доля нелинейно связана с объёмной, то использование последней в уравнении (12) приводит к искажённым результатам. По аналогии с моделью для механизма распределения линейность билוגарифмической зависимости $\log k' - \log X_{H_2O}$ следует из влияния адсорбции на удерживание. Однако на практике затруднительно делать вывод о преобладании того или иного механизма на основании различий коэффициентов корреляции [20]. Кроме того увеличение содержания ацетонитрила в подвижной фазе уменьшает адсорбцию воды на поверхности сорбента (рис. 3), а возможность непосредственного взаимодействия аналита с неподвижной фазой возрастает [54]. О преобладании адсорбционного механизма может свидетельствовать меньшее 1 число эквивалентов мономолекулярных слоёв [44].

В ряде случаев была отмечена плохая корреляция удерживания вещества и содержания воды в элюенте как в координатах $\log k' - \varphi_{H_2O}$ (уравнение (11)), так и $\log k' - \log X_{H_2O}$ (уравнение (12)) [51,54,55]. В такой ситуации привлекают комбинированные модели, например:

$$\ln k' = \ln k'_o + S_1 \cdot \varphi + S_2 \cdot \ln \varphi \quad (13)$$

где S_1 отражает взаимодействия вещество-подвижная фаза, S_2 – взаимодействия вещество-неподвижная фаза. Идея данной модели в том, что она может учитывать оба механизма удерживания, успешно описывает поведение веществ в условиях ГИХ и ОФ ВЭЖХ [56] и позволяет более точно предсказывать удерживание аналитов [55]. Однако руководствуясь данным способом описания удерживания, сделать даже качественный вывод о механизме удерживания невозможно.

Для установления относительных вкладов распределения и адсорбции в удерживание аналитов на данный момент известно два подхода [57,58]. Используя модель эффективной диффузии, авторы работы [57] определили константы равновесия распределения тестовых соединений между элюентом внутри

мезопористых материалов и диффузным водным слоем, а также между диффузным и прочно адсорбированным водным слоем на поверхности сорбентов. С опорой на эти константы был установлен доминирующий механизм удерживания. Однако данный подход не позволяет определять количественный вклад механизмов распределения и адсорбции в удерживание соединений.

Принципиально другая методология была предложена Гуо в 2021 году [58]. Она основана на представлении фактора удерживания в виде суммы вкладов от механизмов распределения и адсорбции для нейтральных аналитов с учётом термодинамического определения фактора удерживания за счёт распределения:

$$k' = k'(\text{распределение}) + k'(\text{адсорбция}) = D \cdot \Phi + k'(\text{адсорбция}) \quad (14)$$

где D – коэффициент распределения между подвижной фазой и водным слоем на поверхности сорбента, Φ – соотношение фаз. В случае распределения соотношение фаз эквивалентно соотношению объёмов неподвижной (водный слой) и подвижной фазы $\frac{V_W}{V_M}$ [43], которое рассчитывается по удерживанию толуола в 100% ацетонитриле и в элюенте заданного состава:

$$\frac{V_W}{V_M} = \frac{V_R(\text{толуол}) \text{ в } 100\% \text{ CH}_3\text{CN}}{V_R(\text{толуол}) \text{ в подвижной фазе}} - 1 \quad (15)$$

Варьируя соотношение фаз путём изменения концентрации соли в подвижной фазе и измеряя при этом факторы удерживания соединений, получают зависимости $k' - \Phi$ (рис. 6). При увеличении концентрации предполагают, что 1) увеличивается водный слой на поверхности сорбента за счёт распределения в него большего числа сольватированных ионов соли, 2) коэффициент распределения и адсорбционные взаимодействия $k'(\text{адсорбция})$ [59] остаются постоянными. В рамках принятых допущений свободный член регрессионной модели соответствует $k'(\text{адсорбция})$, угловой коэффициент – коэффициенту распределения D , а произведение $D \cdot \Phi$ – фактору удерживания за счёт распределения $k'(\text{распределение})$. Корректность методологии была подтверждена за счёт статистически обоснованного совпадения коэффициентов распределения цитозина на разных колонках.

Используя данную методологию, были изучены механизмы удерживания аналитов из класса азотистых оснований и нуклеозидов [58–60], а также ряда соединений с межмолекулярными водородными связями [61] (табл. 2). Для большинства соединений был подтверждён одновременный вклад распределения и

адсорбции в удерживание. Вклады больше 100%, вероятно, связаны с неточностью измерения соотношения фаз по удерживанию толуола [58]. Интересно отметить, что вклад адсорбции с увеличением содержания ацетонитрила снижался несмотря на уменьшение слоя воды на поверхности сорбента и, соответственно, соотношения фаз. Это вызвано существенным возрастанием k' (распределение), которое происходит за счёт увеличения коэффициента распределения.

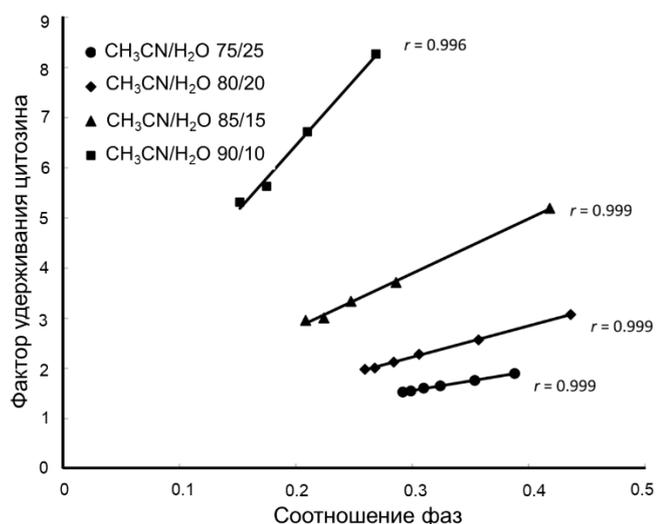


Рис. 6. Зависимость фактора удерживания цитозина от соотношения фаз Φ на колонке ZIC-HILIC в подвижных фазах, содержащих 75-90 об.% ацетонитрила и ацетат аммония. Температура колонки = 25°C [58].

Таблица 2. Вклады распределения и адсорбции в удерживание нейтральных аналитов на разных колонках. Условия: 20 мМ ацетат аммония в подвижной фазе, содержание ацетонитрила указано в таблице

Аналит	Колонка (функциональный слой)	Содержание CH ₃ CN, об. %	k' (распр.)	k' (адс.)
цитозин [58]	XBridge Amide	80	1.11 (73%)	0.41 (27%)
		85	1.81 (75%)	0.62 (26%)
		90	4.55 (79%)	1.17 (20%)
теофиллин [59]	XBridge Amide	85	0.20 (40.0%)	0.29 (58.0%)
теобромин [59]		85	0.24 (39.3%)	0.38 (62.3%)
уридин [60]	TSKgel Amide 80 (полиакриламид)	90	10.0 (90.9%)	0.74 (6.7%)
5-метилуридин [60]			5.90 (79.7%)	1.47 (19.8%)
уридин [60]	SiliChrom HILIC (мочевина)	85	2.16 (94.3%)	0.15 (6.6%)
	TSKgel Amide 80		3.66 (90.1%)	0.43 (7.2%)
	EPIC HILIC (полигидрокси)		2.12 (116%)	-0.30
	УМС PVA (поливиниловый спирт)		1.8 (116.1%)	-0.22

Для ионизируемых аналитов можно количественно оценивать вклад ионного обмена в удерживание на противоположно заряженных неподвижных фазах [21,50,62–66]. Для этого используют один из способов обработки экспериментальных данных – факторов удерживания соединений при разных концентрациях элюирующего иона, рассмотренных далее.

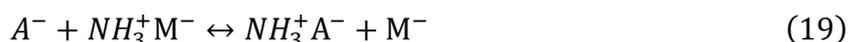
Поскольку фазы для ГИХ могут иметь как отрицательный (например, немодифицированный силикагель), так и положительный заряд (например, 3-аминопропилсиликагель), то необходимо рассматривать два варианта равновесий ионного обмена. Для процесса обмена катионов справедливы следующие уравнения для коэффициента распределения аналита и константы равновесия ионного обмена (с учётом кислотно-основного равновесия для слабого основания) [62]:



$$K_{IEX} = \frac{[\text{SiO}^- \text{BH}^+][\text{M}^+]}{[\text{BH}^+][\text{SiO}^- \text{M}^+]} \quad (17)$$

$$D_{IEX} = \frac{[\text{SiO}^- \text{BH}^+]}{([\text{BH}^+] + [\text{B}])} = \frac{[\text{SiO}^- \text{BH}^+]}{[\text{BH}^+] \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}\right)} = \frac{K_{IEX}[\text{SiO}^- \text{M}^+]}{[\text{M}^+]} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}\right)} \quad (18)$$

Ионообменный процесс на положительно заряженных функциональных группах описывается аналогичными выражениями (с учётом кислотно-основного равновесия для слабой кислоты) [65]:



$$K_{IEX} = \frac{[\text{NH}_3^+ \text{A}^-][\text{M}^-]}{[\text{A}^-][\text{NH}_3^+ \text{M}^-]} \quad (20)$$

$$D_{IEX} = \frac{[\text{NH}_3^+ \text{A}^-]}{([\text{A}^-] + [\text{HA}])} = \frac{[\text{NH}_3^+ \text{A}^-]}{[\text{A}^-] \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}\right)} = \frac{K_{IEX}[\text{NH}_3^+ \text{M}^-]}{[\text{M}^-]} \frac{1}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}\right)} \quad (21)$$

Для сильных кислот, оснований или соединений с постоянным зарядом (например, четвертичных аминов) второй множитель в уравнениях (18) и (21) равен 1. Поскольку фактор удерживания за счёт ионного обмена пропорционально связан с коэффициентом распределения через соотношение фаз, то из этого вытекает обратная зависимость фактора удерживания от концентрации элюирующего иона ($[\text{M}^+]$ или $[\text{M}^-]$). При удерживании аналита только за счёт ионного обмена зависимость $k'-1/[\text{M}]$ должна проходить через начало координат. Вклад иных механизмов удерживания отражается в виде отрезка, отсекаемого на оси ординат, т.е.

связь фактора удерживания с концентрацией элюирующего иона может быть представлена следующим образом (заряд элюирующего иона опущен для обобщения):

$$k' = \frac{\text{const}}{[M]} + k'_{\text{неионные в/д}} \quad (22)$$

Линейность зависимости $k'-1/[M]$ свидетельствует о реализации ионного обмена, угловой коэффициент пропорционален константе ионообменного равновесия $K_{\text{ИEX}}$ и числу доступных заряженных центров на поверхности сорбента. Используя параметры регрессионной модели – угловой коэффициент и свободный член, можно рассчитать относительный вклад ионного обмена ($\frac{\text{const}}{[M]}/k'$) и неионных взаимодействий ($k'_{\text{неионные в/д}}/k'$) в удерживание аналита. Данный подход и методология Гуо принципиально совпадают, в обоих случаях эксперимент заключается в измерении факторов удерживания при разных концентрациях соли в подвижной фазе с дальнейшей обработкой данных с помощью регрессионного анализа и представлением фактора удерживания в виде суммы вкладов различных механизмов. Сравнивая две модели, стоит отметить, что увеличение водного слоя с ростом концентрации соли также влияет на удерживание заряженных аналитов, особенно при высоких концентрациях, искажая ожидаемую линейную зависимость $k'-1/[M]$ [20,67].

Уравнения (18) и (21) также могут быть преобразованы в билогарифмическую зависимость фактора удерживания от концентрации элюирующего иона [65]:

$$\log k' = -s \cdot \log[M] + \text{const} \quad (23)$$

где s – коэффициент, соответствующий отношению зарядов определяемого иона и противоиона подвижной фазы. В случае однозарядных ионов, участвующих только в процессе ионного обмена, коэффициент s должен быть равен 1.

При рассмотрении примеров использования моделей (22) и (23) для исследования влияния ионного обмена на удерживание кислот, оснований и неорганических ионов в условиях ГИХ можно отметить следующее (табл. 3): 1) в большинстве случаев вклад ионного обмена в % и угловой коэффициент зависимости $\log k' - \log [M]$ отличны от 100% и -1 , соответственно, что связывают с влиянием гидрофильных взаимодействий на удерживание, подразумевая распределение и адсорбцию; 2) для неорганических ионов-космотропов (ацетата и

Таблица 3. Примеры установления вклада ионного обмена в условиях гидрофильной хроматографии в рамках моделей (22) и (23)

Аналит ($w_p K_a$)	Колонка (функциональные группы)	Подвижная фаза	Вклад ионного обмена (% или -s)	Ссылка
Сульфометоксазол (5.6)	Alltima Amino (амино)	80% CH ₃ CN, 10-40 мМ ацетат аммония, рН 6.0	-1.004	[65]
Сульфаниламид (10.6)			0.017	
Сульфацетамид (5.4)			-0.684	
Сульфафуразол (5.0), фуросемид (4.2), буметанид (3.7)			-0.773- -0.744	
Бензолсульфоокислота (-0.83)	Luna amino (амино)	85% CH ₃ CN, 5 мМ (20 мМ) формиат аммония, рН 4.4	88.7 (66.1)	[21]
Нафталин-2-сульфоновая кислота (-0.56)			92.7 (76)	
п-ксилолсульфоновая кислота (-0.63)			93.7 (78.9)	
Салициловая кислота (2.9)			92.6 (75.9)	
3-гидроксибензойная кислота (3.9)			85.8 (60.3)	
4-гидроксибензойная кислота (4.5)			81 (51.6)	
Ацетилсалициловая кислота (3.5)			89.1 (67.1)	
4-аминосалициловая кислота (3.5)			89.7 (68.5)	
2-фенилбутановая кислота (4.5)			84.7 (58.1)	
Амитриптилин (9.76)	Inertsil SIL-100 А (силикагель)	80% CH ₃ CN, 5-65 мМ ацетат аммония, рН 4.5	-0.64	[50]
Бромат	Силикагель, покрытый латексными частицами с -NR ₃ ⁺ группами	65% CH ₃ CN, 5-25 мМ метилфосфоновая кислота, рН 4.0	-0.92	[63]
Нитрат			-0.86	
Тиоцианат, иодид			-0.87	
Ацетат			-0.54	
Формиат			-0.79	
Тиоцианат, нитрит	TSKgel NH ₂ -60 (амино)	70% CH ₃ CN, 10-40 мМ NaClO ₄	-0.44	[64]
Иодид, нитрат, бромид			-0.43	
Бромат			-0.45	
Тиоцианат	Polar-Imidazole (имидазол)		-0.69	
Иодид			-0.68	
Нитрат			-0.73	
Гидразин, метилгидразин, 1,1-диметилгидразин, 1,2-диметилгидразин	ZIC HILIC (цвиттер-ион)	80% этанол, 5-90 мМ формиат аммония, рН 3.0	-0.3	[66]
Хлорид			0.1	

формиата) влияние распределения проявляется в большей степени, чем для ионо-хаотропов; 3) в рамках модели (22) можно рассчитать вклад ионного обмена при любой концентрации элюирующего иона, при этом чем больше концентрация, тем меньше вклад, что наглядно отражает подавление взаимодействий между аналитом и заряженными группами сорбента; 4) на примере производных бензойных кислот прослеживается влияние силы кислоты на вклад ионного обмена, при этом чем сильнее кислота, тем выше вклад; 5) во всех рассмотренных случаях варьирование концентрации соли в элюенте проводили при фиксированных параметрах системы, однако изменение рН, природы соли и содержания ацетонитрила может существенно влиять на процесс ионного обмена, приводя к другим выводам и закономерностям. Последнему замечанию можно найти подтверждение в работе 1987 года [62], в которой рассматривали изменение углового коэффициента и свободного члена зависимости $k'-1/[Na^+]$ для оснований на силикагеле при разных рН (2.1, 4.6, 7.0) и содержании метанола (15, 30, 50, 75 об.%). Однако данные условия мало пересекаются с теми, которые используют в современных исследованиях по гидрофильной хроматографии.

Помимо взаимодействий вещество-неподвижная фаза, способствующих удерживанию, необходимо учитывать влияние, снижающее удерживание. В работе [68] было подчеркнуто, что за счёт электростатического отталкивания в условиях ГИХ удаётся добиться селективного разделения многозарядных аналитов, например, пептидов. При этом удерживание обеспечивается за счёт распределения в приповерхностный водный слой. Был введён специальный термин «ERLIC – electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography», отвечающий данному сочетанию взаимодействий. В таком случае увеличение концентрации элюирующего иона в подвижной фазе приводит к росту удерживания за счёт экранирования заряда сорбента [54]. Было показано, что данная зависимость линеаризуется в билогарифмических координатах $\log k' - \log [M]$ (уравнение (23)) с положительным угловым коэффициентом (табл. 3) [66]. В предельном случае полного подавления электростатического отталкивания и притяжения удерживание ионов определяется преимущественно распределением, что оказывает нивелирующий эффект на селективность разделения колонок [68–70].

1.3.3. Термодинамические параметры удерживания в гидрофильной хроматографии

Термодинамические параметры удерживания также характеризуют механизм удерживания аналита в хроматографической системе. Фактор удерживания связан с температурой колонки по уравнению Вант-Гоффа:

$$\ln k' = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R + \ln (V_s/V_m) \quad (24)$$

где ΔH^0 и ΔS^0 – стандартная мольная энтальпия и энтропия переноса вещества из подвижной фазы в неподвижную; (V_s/V_m) – соотношение объёмов неподвижной и подвижной фазы. В случае линейной зависимости $\ln k'-1/T$ по угловому коэффициенту рассчитывают энтальпию удерживания, из свободного члена с учётом соотношения фаз – энтропию [71–73]. Для дополнительной проверки независимости термодинамических величин от температуры, т.е. постоянства механизма удерживания, используют модифицированное уравнение Вант-Гоффа:

$$\ln k'_2/k'_1 = \ln \alpha = -(\Delta H_2^0 - \Delta H_1^0)/RT + (\Delta S_2^0 - \Delta S_1^0)/R \quad (25)$$

где α – коэффициент селективности двух веществ, $\Delta H_2^0, \Delta H_1^0, \Delta S_2^0, \Delta S_1^0$ – стандартные мольные энтальпии и энтропии удерживания веществ.

Увеличение температуры может приводить к изменению $\Delta H^0, \Delta S^0$ и соотношения фаз и, следовательно, к нелинейной зависимости $\ln k'-1/T$ [71,72,74]. Изменение термодинамических величин с температурой может быть вызвано влиянием нескольких типов взаимодействий на удерживание, что характерно для ГИХ, а также существованием в растворе нескольких форм вещества или изменением состояния неподвижной фазы [74]. Увеличение температуры может снижать адсорбцию воды на поверхности фазы, тем самым изменяя соотношение фаз [43]. В таком случае энтальпию и энтропию удерживания рассчитать нельзя.

В условиях гидрофильной хроматографии зачастую отмечают уменьшение удерживания нейтральных веществ при увеличении температуры колонки, а также заряженных аналитов на нейтральных или противоположно заряженных фазах, что соответствует экзотермическому процессу $\Delta H^0 < 0$ [73,75]. Это связывают с преимущественным вкладом гидрофильных взаимодействий в удерживание [2,76]. Для веществ, удерживающихся дополнительно за счёт ионного обмена, например, салициловой кислоты на аминофазе [76] и ряда других пар вещество-неподвижная фаза, были получены $\Delta H^0 > 0$ [77–79]. С увеличением концентрации буферного

раствора в элюенте было показано уменьшение энтальпии удерживания кислоты на аминофазе, что авторы связывали с изменением относительных вкладов распределения и ионного обмена в удерживании аналита [76].

Расчёт энтропии представляет сложность, поскольку необходима информация о соотношении фаз. Однако его невозможно точно установить в условиях ГИХ. В ряде работ соотношение фаз (V_s/V_m) оценивают, исходя из мёртвого и внутреннего объёма колонки: $V_s/V_m = (V_c - V_m)/V_m$ [72,73]. Для веществ с разнообразными свойствами в ГИХ были получены как положительные $\Delta S^0 > 0$, так и отрицательные значения энтропии удерживания $\Delta S^0 < 0$, последние более характерны для процесса удерживания посредством физической адсорбции на поверхности неподвижной фазы, поскольку свидетельствуют об упорядочении молекул по сравнению с состоянием в жидкой среде [72,80,81]. Таким образом, на основании температурных зависимостей удерживания может быть получена дополнительная информация о механизме удерживания. Важным представляется сопоставление данных о вкладах тех или иных взаимодействий, полученных по другим моделям, с термодинамическими параметрами. Кроме того, в ограниченном числе исследований показано влияние состава элюента на энтальпию удерживания [72,76], однако подобные закономерности также могли бы прояснить особенности удерживания аналитов в гидрофильной хроматографии.

1.4. Способы описания свойств неподвижных фаз

Селективность разделения многокомпонентных смесей в первую очередь зависит от структуры неподвижной фазы, определяющей её хроматографические свойства. Для описания свойств фаз в гидрофильной хроматографии используют один или несколько способов [26,82]:

- 1) определение ёмкости колонки (количества адсорбированной воды и концентрации ионообменных центров);
- 2) изучение закономерностей и механизмов удерживания тестовых веществ;
- 3) сравнение удерживания и селективности разделения аналитов разных классов;
- 4) специальные тесты, основанные на измерении коэффициентов селективности определенных пар веществ, отвечающих вторичным взаимодействиям.

Каждый способ имеет свои особенности, преимущества и недостатки, которые будут рассмотрены в соответствующих разделах.

1.4.1. Определение ёмкости колонки

Поскольку распределение считается основным механизмом удерживания в гидрофильной хроматографии, то установление количества адсорбированной воды на поверхности сорбента служит его важной характеристикой. Однако между подвижной и неподвижной фазой нет чёткой границы, концентрация воды уменьшается постепенно от поверхности сорбента к объёму элюента. Однозначно установить объём эффективной неподвижной фазы, участвующей в механизме распределения, не представляется возможным. Предложено несколько подходов для сравнения количества адсорбированной воды (рис. 7): по толщине водного слоя, определяемого с опорой на данные кулонометрического титрования по Карлу Фишеру [40]; по объёму, устанавливаемому с использованием изотерм адсорбции воды из ацетонитрила на сорбентах, получаемых фронтальным анализом в сочетании с титрованием по Карлу Фишеру [83]; по соотношению объёмов фаз $\frac{V_W}{V_M}$, определяемому по удерживанию толуола в элюенте заданного состава и в 100% ацетонитриле (уравнение (15) стр. 23) [43]. Провести сопоставление результатов классификации фаз, представленных в разных исследованиях, достаточно сложно, поскольку отличаются условия, в которых проводится тестирование, а также геометрические характеристики материалов (размер частиц, диаметр пор).

Подход, заключающийся в измерении удерживания толуола, по исполнению является наиболее удобным и экспрессным, не требующим дополнительной титриметрической установки и неупакованного сорбента. Он основан на предположении о том, что гидрофобный толуол не распределяется в водный слой [42], что было обосновано уменьшением его удерживания с увеличением доли воды в элюенте, сопровождающимся ростом её адсорбции на неподвижной фазе [54]. В чистом ацетонитриле количество воды на полярной поверхности сорбента незначительно, следовательно, разница удерживаемых объёмов толуола в чистом ацетонитриле и подвижной фазе определенного состава является хорошей оценкой адсорбированного объёма воды [84].

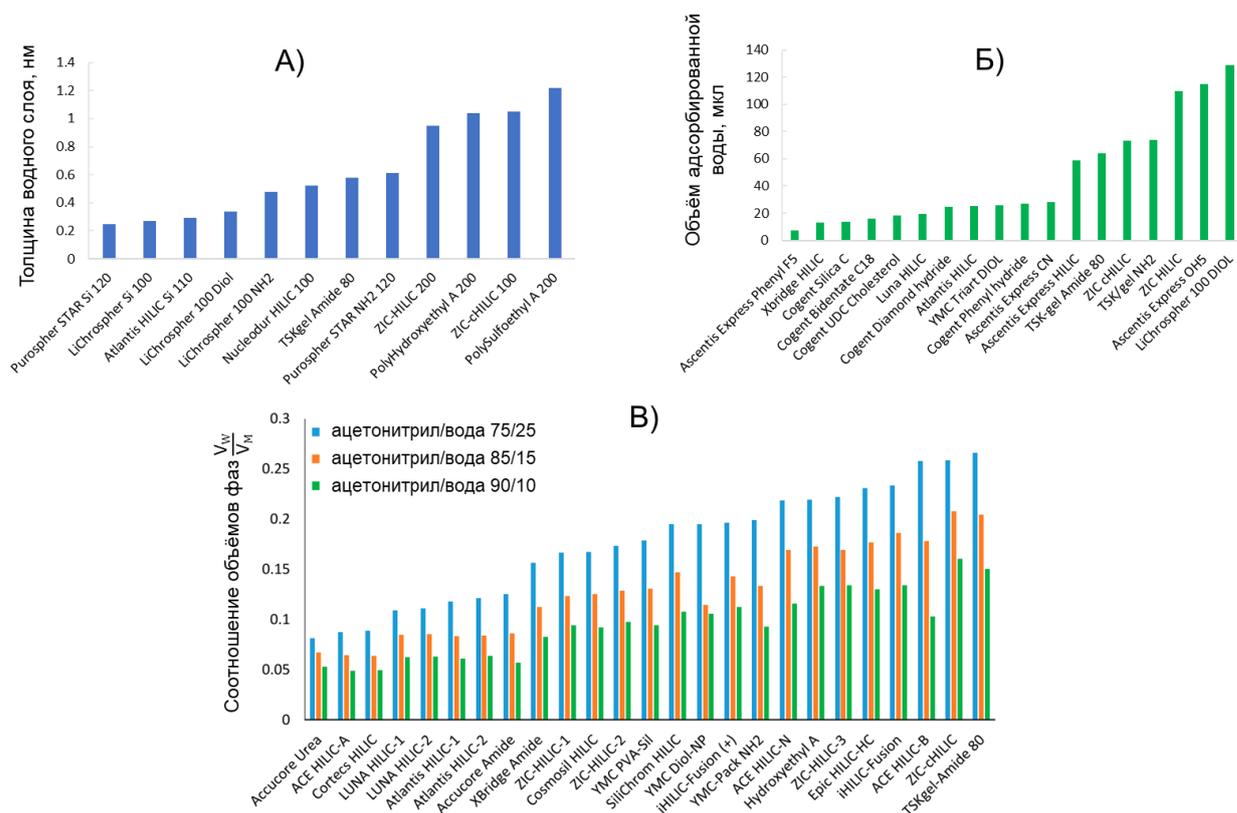


Рис. 7. Сравнение колонок по количеству воды, адсорбированной на поверхности сорбента, оцениваемое разными способами. А) Сравнение по толщине водного слоя. Условия: ацетат аммония рН 6.8/ацетонитрил 20/80 об.%, концентрация ацетата в элюенте 5 мМ. График построен по данным табл. 4 статьи [40]. Б) Сравнение по объёму водной неподвижной фазы. Условия: вода/ацетонитрил 15/85 об.%. График построен по данным табл. 2 статьи [83]. В) Сравнение по соотношению объёмов фаз (уравнение (15) стр. 23). Условия: ацетат аммония/ацетонитрил (соотношение указано на графике), концентрация ацетата в элюенте 5 мМ, температура колонки 25°C [43].

Ионообменная ёмкость колонок является важной характеристикой, определяющей реализацию электростатического кулоновского притяжения или отталкивания в процессе разделения [63]. Данные взаимодействия играют большую иногда определяющую роль в механизме удерживания ионизируемых аналитов в гидрофильной хроматографии. Традиционным методом установления числа доступных заряженных центров является вытеснительная хроматография в водной среде [85]. Колонку заполняют раствором соли до насыщения сайтов ионами противоположного заряда из элюента. Избыток ионов, не удерживаемых электростатически, вымывают чистой водой. Затем проводят вытеснение оставшихся в колонке ионов, количество которых эквивалентно числу заряженных групп. Последняя стадия является ключевой, для её эффективного протекания необходимо, чтобы вытесняемый ион имел меньшее сродство к неподвижной фазе,

чем вытесняющий. В табл. 4 представлены примеры подходов измерения анионообменной ёмкости колонок в водной среде.

Таблица 4. Примеры подходов определения анионообменной ёмкости колонок

Условия заполнения заряженных центров	Промывка водой	Условия вытеснения ионов	Определение ёмкости	Ссылка
2 ч 10 мМ КЮ ₃	40 мин	1 мМ КСl	По кривой прорыва электропроводности или УФ поглощения	[85]
NaCl	не указано	KNO ₃		
30 мин 20 мМ NaCl 1 мл/мин	не указано	1 мМ NaNO ₃ 1 мл/мин	По кривой прорыва при 210 нм	[63]
20 мМ Cl ⁻	не указано	20 мМ Br ⁻	По кривой прорыва при 214 нм	[86]
20 объёмов колонки 10 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор pH 5.0	не указано	10, 20 или 30 мМ NO ₃ ⁻	По кривой прорыва при 230 нм	[87]
10 мМ NO ₃ ⁻	не указано	10, 20 или 30 мМ Br ⁻		
100 мМ NaCl до значения проводимости, соответствующего исходному раствору	До значений проводимости ниже 5 мкСм	100 мМ NaOH	Методом ионной хроматографии	[88]

Определение концентрации вытесняемого иона проводят с использованием параметров кривой прорыва сигнала детектора, либо методом ионной хроматографии (ИХ) в собранном с колонки элюате. В первом случае необходимым требованием к вытесняемому и вытесняющему иону является различная удельная электропроводность или коэффициент молярного поглощения при использовании в эксперименте хроматографа с кондуктометрическим или спектрофотометрическим детектором, соответственно. Концентрацию вытесняемого иона, равную ёмкости колонки (моль/колонку), рассчитывают по формуле:

$$c_1 = c_2 \cdot F \cdot t \quad (26)$$

где c_2 – концентрация вытесняющего иона, моль/см³; F – объемная скорость потока, см³/с; t – время вытеснения иона до прорыва, с.

Стоит отметить, что объяснение свойств колонок в среде с высоким содержанием ацетонитрила с опорой на ёмкости, измеренные в водной среде, имеет ряд ограничений, вытекающих из влияния органического растворителя на константы

кислотности функциональных групп сорбентов. Кроме того, доступность заряженных центров для ионного обмена, вероятно, снижена из-за адсорбции воды на поверхности и в порах частиц.

Таким образом, адсорбционная и ионообменная ёмкости колонок являются важными характеристиками, влияющими на механизм удерживания аналита в условиях гидрофильной хроматографии. Однако существующие методики их определения имеют ряд ограничений и допущений.

1.4.2. Изучение закономерностей и механизмов удерживания тестовых веществ

Изучение влияния каждого параметра системы: природы органического растворителя, доли воды, рН элюента, концентрации и природы буферного раствора, температуры колонки, на удерживание веществ позволяет получать ценную информацию о способах воздействия на селективность разделения сложных смесей. При этом с опорой на уравнения (11), (12), (14), (22), (23) и (24), т.е. при варьировании доли воды в подвижной фазе, концентрации элюирующего иона и температуры колонки, можно делать выводы о механизмах удерживания и рассчитывать их количественный вклад в удерживание.

Тренды удерживания тестовых веществ, получаемые при **варьировании рН** подвижной фазы, дают важную информацию о кислотно-основных свойствах сорбента. Во многих работах подчеркивают, что из всех параметров хроматографической системы рН оказывает второй по величине эффект на селективность разделения после природы неподвижной фазы [7,8,75]. Учитывая, что большинство фаз содержит кислотные, основные и остаточные силанольные группы, и многие аналиты также являются сильными или слабыми электролитами, увеличение рН может приводить к существенному изменению их степени диссоциации, характера и силы ион-ионных взаимодействий. Предложено несколько схожих между собой подходов, использующих водные элюенты, для оценки влияния данных взаимодействий на свойства гидрофильных колонок [89,90]. Основная идея заключается в получении зависимостей факторов удерживания тестовых веществ от рН. В качестве аналитов предлагают использовать набор соединений с постоянным зарядом (нитрат, бензолсульфонат и триметилфениламмоний [90]) или схожих по структуре с различными кислотно-основными свойствами (анилин, триметилфениламмоний, бензолсульфонат, бензойная, сульфаниловая, п-

аминобензойная кислота [89]), а рН создают с использованием дихлоруксусной [90] или лимонной кислоты [89]. Такие условия позволяют проводить изучение свойств неподвижных фаз на доступном хроматографическом оборудовании со спектрофотометрическим детектированием, а неорганические ионы (нитрат) предполагают описание только ионообменных взаимодействий [90]. Однако информация о свойствах колонок, получаемая с использованием водных элюентов, может не соответствовать закономерностям в водно-органических подвижных фазах. В таком случае характеризацию необходимо проводить в условиях, близких к используемым в гидрофильной хроматографии.

Удерживание аналитов в условиях ГИХ существенно изменяется при варьировании рН (табл. 5) [18,19,21,23,24,76,91,92]. При этом наблюдается схожий подход к характеристике неподвижных фаз, как и в водной среде, опирающийся на изучение закономерностей удерживания тестовых веществ, включающих аналиты с постоянным зарядом, а также кислоты и основания, отличающиеся по силе [21,24,75]. Однако стоит отметить, что получаемые тренды удерживания и выводы о диссоциации аналитов в разных работах отличаются. Например, в работе [21] было показано, что с увеличением рН изменения степени протонирования цитозина практически не происходит (цитозин – квазинейтральное соединение), тогда как в работе [76] в похожих условиях отмечают уменьшение числа протонированных молекул цитозина (табл. 5). Также различны выводы и для салициловой кислоты (табл. 5). Проблема, по-видимому, заключается в самой процедуре варьирования рН. Во-первых, в некоторых работах отсутствуют методики приготовления буферных растворов, что не позволяет полноценно анализировать полученные тренды. Во-вторых, исходя из имеющейся информации о процедуре варьирования рН, можно заметить, что в ряде случаев его проводят, используя буферные растворы фиксированной концентрации, следовательно, с разными концентрациями элюирующих ионов, которые одновременно влияют на равновесие ионного обмена. В-третьих, используют вместо буферных растворов соли, буферная ёмкость которых мала, что может приводить к нестабильным временам удерживания. Кроме того, варьирование рН проводят при фиксированных остальных параметрах системы, хотя их изменения могут влиять на получаемые тренды [91].

Таблица 5. Примеры изучения поведения аналитов и неподвижных фаз при варьировании pH в гидрофильной хроматографии

Аналит ($w_p K_a$)	Колонка	Подвижная фаза. Методика приготовления буферного раствора и варьирования pH	Закономерности удерживания с увеличением pH	Выводы	Ссылка
Нейтральные соединения (тиомочевина, урацил, уридин, 2'-дезоксинуридин)	Luna amino (амино)*	85% CH ₃ CN, 5 мМ аммонийно формиатный и аммонийно ацетатный буф. p-p**, w_p pH 3, 4.4, 6.	Удерживание не изменяется	Изменение заряда сорбента на удерживание нейтральных соединений не влияет	[21]
Основания (цитозин, пиридин, нортриптилин, триметилфениламмоний хлорид ТМРАС)			Удерживание цитозина изменяется слабо, остальные соединения не удерживаются	Цитозин – квазинейтральное соединение даже при w_p pH 3. Остальные основания отталкиваются от положительно заряженного сорбента	
Сульфокислоты (<0)			Удерживание уменьшается	Уменьшение количества протонированных аминогрупп, увеличение степени диссоциации остаточных силанольных групп матрицы	
Производные бензойной кислоты (3.9-4.5)			Существенное увеличение удерживания	Происходит диссоциация кислот	
Производные салициловой кислоты (2.9-3.5)			Удерживание возрастает с ростом w_p pH от 3 до 4.4, снижается – при w_p pH от 4.4 до 6	Сначала увеличивается степень диссоциации кислот, затем на удерживание влияет изменение заряда сорбента	
Ацетилсалициловая кислота (3.5), аскорбиновая кислота (4.2)	Zorbax RX-SIL silica (силикагель)	70, 75, 80% CH ₃ CN, 10, 30, 50 мМ аммонийно ацетатный буф. p-p***, w_p pH 3, 4.5, 6. pH доводили до нужного значения путём добавления к ацетату аммония уксусной кислоты	Удерживание сначала возрастает, затем снижается	При pH < pKa удерживание обусловлено гидрофильностью молекул, при pH > pKa реализуется отталкивание от диссоциированных силанолов	[91]
Салициловая кислота (3)			Удерживание уменьшается	Увеличивается степень диссоциации силанольных групп, приводящих к отталкиванию кислоты	

Бензилтриэтиламмоний хлорид (ВТЕАС), нортриптилин (10.2)	Atlantis silica (силикагель)	85% CH ₃ CN, 15 мМ аммонийно формиатный буф. р-р**, w_pH 3.0-10.2 (s_pH 5.2-9.0).	Удерживание постепенно возрастает до w_pH 9.2, существенно увеличивается в диапазоне w_pH от 9.2 до 10.2	Степень диссоциации силанольных групп силикагеля существенно возрастает при $w_pH > 9.2$	[24]
Дифенгидрамин (9.0)		Подробное описание методики отсутствует.	Удерживание в диапазоне w_pH 9.2-10.2 изменяется слабо	При высоких рН уменьшается доля протонированных молекул, снижается электростатическое притяжение и удерживание в приповерхностном водном слое	
Салициловая кислота (2.8)	УМС-Pack NH ₂ (амино)****	90% CH ₃ CN, 10 мМ формиат аммония**, w_pH 3.3, 4.0, 4.8, 6.5. Раствор 100 мМ формиата аммония в воде довели муравьиной кислотой до требуемого рН	Удерживание изменяется слабо	Отсутствуют существенные изменения в степени диссоциации (по-видимому, имеют в виду диссоциацию кислоты)	[76]
Ацетилсалициловая кислота (3.5)		Резкое возрастание удерживания при переходе от w_pH 3.3 к 4.0	Происходит диссоциация кислоты, приводящая возрастанию влияния ионного обмена на удерживание		
Цитозин (4.6, 12.2)		Возрастание удерживания	Уменьшение отталкивания цитозина от положительно заряженной фазы за счёт уменьшения числа протонированных молекул		
Триметилфениламмоний хлорид ТМРАС, атенолол	ACE prototype HILIC-B (основная), ACE prototype HILIC-N (нейтральная), ACE prototype HILIC-A (кислотная)	90% CH ₃ CN, 10 мМ формиат аммония**, w_pH 3, 3.6, 4.6, 5.6, 6. Раствор 200 мМ формиата аммония в воде довели муравьиной кислотой до требуемого рН	Небольшие изменения удерживания	Не происходит изменения степени диссоциации групп сорбентов и аналитов. Силанольные группы не диссоциируют вплоть до w_pH 6.	[75]
Уридин		Существенное увеличение удерживания с ростом w_pH от 3 до 5	Происходит диссоциация кислоты, приводящая к увеличению вклада распределения между элюентом и водным слоем на поверхности сорбентов		
4-гидроксibenзойная кислота (4.5)					

* Аналогичные закономерности удерживания получены для ВЕН amide (амидная фаза), удерживание оснований увеличивается, заряд сорбента определяется степенью диссоциации силанольных групп матрицы. ** Концентрация в подвижной фазе. *** Концентрация в водной составляющей подвижной фазы. В тексте есть разночтения, приведенные концентрации относят как к соли ацетату аммония, так и к буферному раствору. **** Также были изучены закономерности на TSKgel Amide-80, HILIC Silica и ZIC-HILIC, выводы опирались на изменение степени диссоциации аналитов

Стоит отдельно рассмотреть влияние рН на удерживание тестовых соединений – слабых электролитов. В отличие от ОФ ВЭЖХ, где заряженные аналиты имеют слабое удерживание, в ГИХ наблюдается обратный тренд: удерживание кислоты при диссоциации и основания при протонировании увеличивается. При этом фактор удерживания при любом рН для слабого электролита является суммой факторов удерживания нейтральной и заряженной формы с коэффициентами, равными мольным долям:

$$k' = \frac{k'_{(HX)} + k'_{(X)} \cdot 10^{(pH-pK_a)}}{1 + 10^{(pH-pK_a)}} \quad (27)$$

где $k'_{(HX)}$ и $k'_{(X)}$ – факторы удерживания протонированной и депротонированной формы кислоты, соответственно, рН и рКа должны быть выражены в одной шкале (s_pH и s_pK_a , w_pH и w_pK_a). НХ и Х могут быть НА и А⁻ или ВН⁺ и В. Таким образом, получая зависимости факторов удерживания аналитов от рН (s_pH или w_pH) на нейтральных колонках можно устанавливать константы кислотности соединений в водно-органической среде (рис. 8) [18,23].

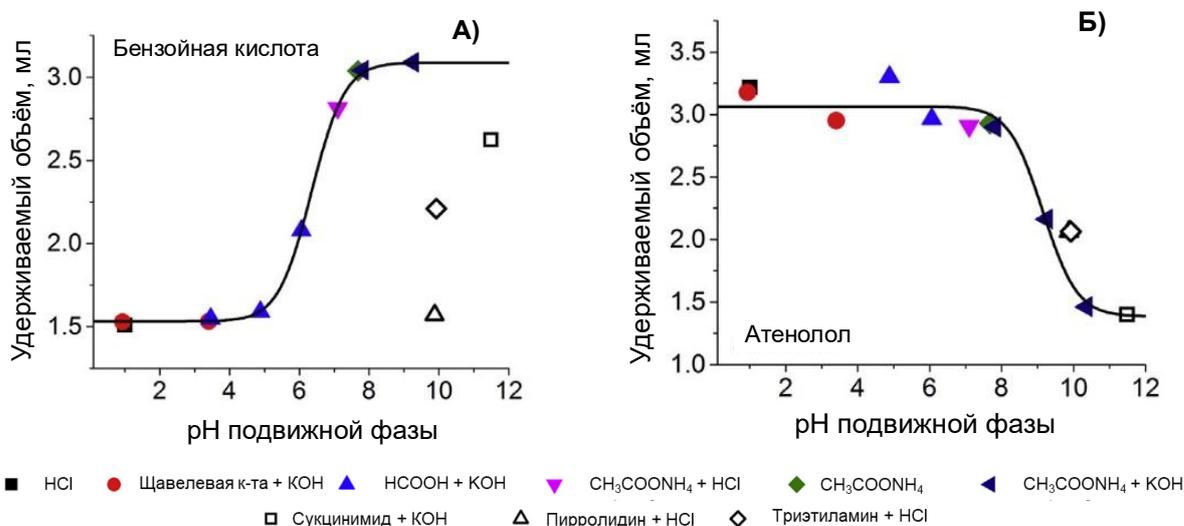


Рис. 8. Влияние w_pH элюента на удерживание кислот и оснований на примере А) бензойной кислоты и Б) атенолола. Условия: колонка ZIC-pHILIC, 80 об.% CH₃CN, w_pH создан разными буферными растворами, указанными на рисунке [18].

Однако важно обратить внимание на два аспекта методики варьирования рН в работах [18,23]. Во-первых, использование разных буферных систем для изучения более широкого диапазона рН приводит к проблеме влияния их природы на удерживание соединений. Так, в случае буферных систем на основе сукцинимида, пирролидина и триэтиламина получены заниженные времена удерживания бензоат-иона (незакрашенные символы на рис. 8), вызванные, вероятно, образованием

ионных пар, имеющих меньшую гидрофильность по сравнению с анионом. Во-вторых, поддерживается постоянная концентрация буферного раствора при варьировании рН. В идеальном случае при использовании нейтральных колонок одновременное изменение концентрации элюирующего иона при варьировании рН не влияет на получаемые тренды, т.к. на таких колонках ионный обмен не реализуется. Однако цвиттер-ионные неподвижные фазы ZIC-pHILIC и ZIC-HILIC, используемые в работах [18,23], проявляют катионообменные свойства [69,70]. Таким образом, необходима разработка единого подхода к варьированию рН в гидрофильной хроматографии, позволяющего получать наиболее достоверные закономерности удерживания веществ.

Поскольку селективность разделения веществ в ГИХ зависит от **природы добавок** к подвижной фазе [93–95], то изучение её влияния на механизм удерживания представляет важную задачу. Эффект, возникающий при замене одной соли в элюенте на другую, является наиболее сложным для интерпретации, поскольку происходит влияние на ион-ионные и другие электростатические взаимодействия, приповерхностный водный слой, образование ионных пар, а также на рН подвижной фазы. Соли, обеспечивающие образование водородных связей и структурирование молекул воды, являются космотропами, например, цитраты, фосфаты, формиаты. Они имеют большие, прочно связанные гидратные оболочки. Соли, препятствующие образованию водородных связей – хаотропы, характеризующиеся тонкими слабосвязанными гидратными оболочками, например, перхлораты, трифторацетаты. Поскольку анионы образуют ряд по данному свойству (ряд Хофмейстера), то возможно предсказывать изменение удерживания при замене электролита [94]. Если удерживание аналита в ГИХ происходит преимущественно за счёт водородных связей, то ожидают уменьшение его удерживания при увеличении концентрации хаотропа в подвижной фазе, как было показано для цитозина [93]. Таким образом, при оценке свойств неподвижных фаз необходимо уделять внимание составу подвижной фазы, который может существенно влиять на вклады механизмов удерживания.

1.4.3. Сравнение удерживания и селективности разделения аналитов разных классов

Сравнение неподвижных фаз по удерживанию и селективности разделения целевых аналитов является наиболее практически значимым способом. При благоприятном сочетании эффективности, удерживания и селективности условия тестирования могут быть непосредственно использованы в анализе реальных объектов. На основании полученных порядков элюирования делают предположения о реализующихся механизмах удерживания. В режиме гидрофильной хроматографии в основном используют модельные смеси биологически активных веществ, таких как водорастворимые витамины, нуклеозиды, ксантины, углеводы, карбоновые и аминокислоты [37,96–100]. Тестирование колонок с использованием широкого круга разных аналитов является предпочтительным с позиции охвата всех возможных взаимодействий и свойств. Однако в случае сравнения большого количества неподвижных фаз по хроматографическим параметрам для нескольких групп веществ необходимо привлечение подходов для обработки многомерных данных (см. раздел 1.4.5).

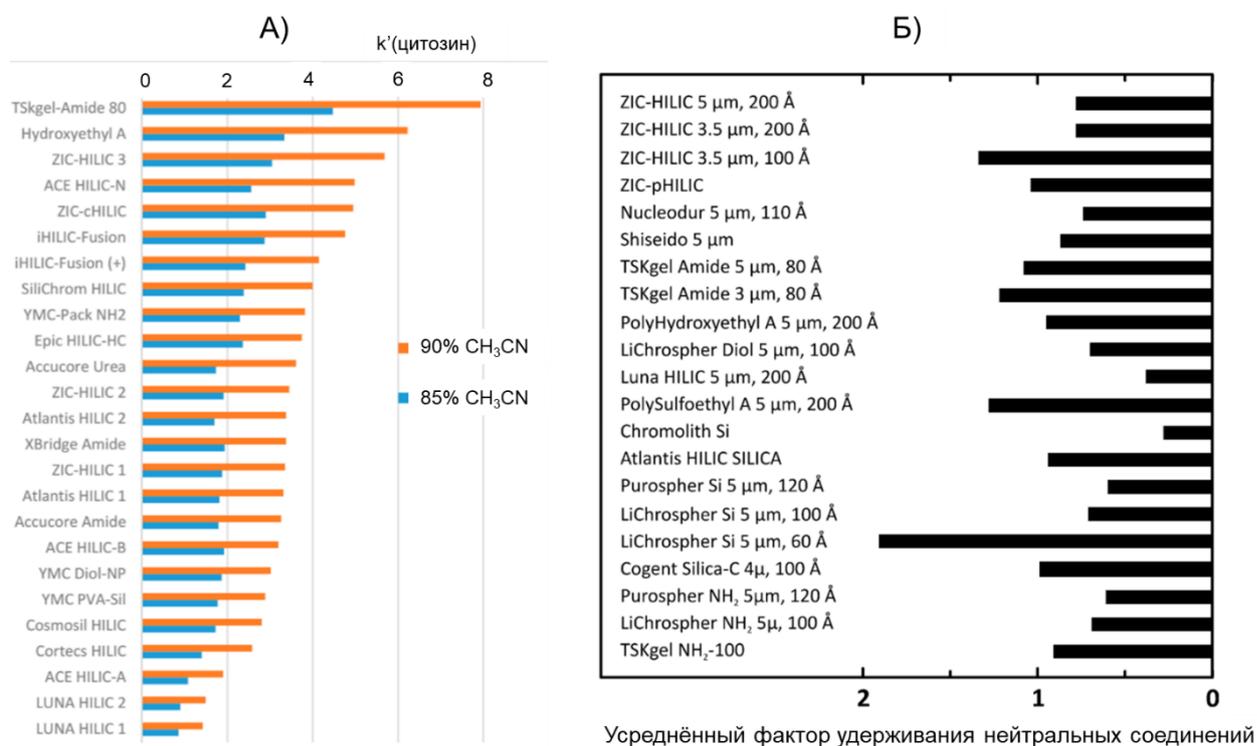


Рис. 9. Сравнение неподвижных фаз по факторам удерживания. А) По фактору удерживания цитозина. Условия: 85 и 90 об.% ацетонитрила, 5 мМ ацетат аммония [43]. Б) По усреднённым факторам удерживания нейтральных веществ [70]. Условия: 100 мМ ацетат аммония, рН 6.8 / ацетонитрил 20/80 об.%.

При выборе неподвижной фазы полезным является понимание того, как она соотносится по абсолютному удерживанию с другими фазами (relative retentivity) [26]. Однако результат сравнения зависит от природы используемого тестового соединения. Например, авторы работы [43] сравнивали 25 неподвижных фаз по удерживанию цитозина, а в другом исследовании [70] для этого использовали усреднённый фактор удерживания нейтральных веществ (цитозин, тиоцитозин, урацил, диметилформаид, α -гидрокси- γ -бутиролактон) (рис. 9). Было отмечено, что колонки TSKgel Amide 80, ZIC-HILIC и PolyHydroxyethyl A в обоих случаях характеризуются относительно высоким удерживанием, тогда как немодифицированный силикагель и LUNA HILIC – низким. Помимо структуры функционального слоя на удерживание существенно влияет размер пор: чем меньше диаметр пор, тем больше удерживание (рис. 9Б). Стоит отметить, что аналогичная идея простого сравнения неподвижных фаз по фактору удерживания вещества-маркера включена в специальные тесты, направленные на оценку вкладов взаимодействий в хроматографической системе (см. раздел 1.4.4).

1.4.4. Специальные тесты, основанные на измерении коэффициентов селективности определенных пар веществ

Наиболее привлекательным способом характеристики колонок является использование ограниченного круга специально подобранных тестовых веществ в строго установленных условиях, удерживание которых отражает определённые свойства колонок. Преимуществами такого тестирования являются единообразное сравнение колонок разными исследователями и производителями, оценка влияния разных механизмов на удерживание, экспрессность и простота. Однако на удерживание большинства веществ влияет более одного типа взаимодействий, что делает необходимым компенсацию всех механизмов, кроме интересующего. Таким приёмом является расчёт коэффициентов селективности специально подобранных пар веществ. Для режима ОФ ВЭЖХ было предложено несколько вариантов данного подхода [101], одним из широко используемых является тест Танака для сравнения гидрофобности, стерической селективности, степени водородного связывания и ионообменных свойств силикагелей с октадецильными группами (табл. 6) [102]. Для оценки гидрофобности колонок используют пару гомологов из ряда алкилбензолов, отличающихся на одну CH_2 группу. Трифенилен и о-терфенил было предложено

использовать для описания стерической селективности, т.к. они обладают схожей гидрофобностью и различным пространственным строением. Для нормализации удерживания кофеина и бензиламина, зависящего от гидрофобности неподвижных фаз, использовали фенол. Поскольку для разработки теста были использованы сорбенты с известными характеристиками и способом получения, то хроматографические параметры были связаны с покрытием поверхности октадецильными радикалами, типом силанов, эндкеппингом, предварительной обработкой силикагеля, а также площадью поверхности частиц силикагеля (табл. 6). Данным подходом были охарактеризованы коммерчески доступные колонки C18 разных производителей [102].

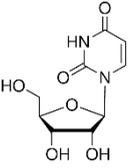
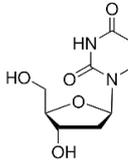
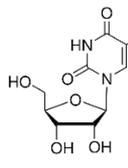
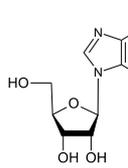
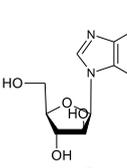
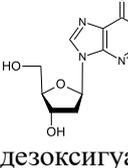
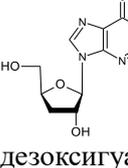
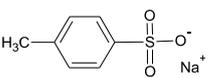
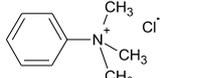
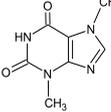
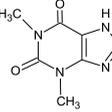
Таблица 6. Условия характеристики колонок C18 по тесту Танака для ОФ ВЭЖХ и интерпретация хроматографических параметров [102]

Параметр	Формула	Состав подвижной фазы	Свойство неподвижной фазы	Характеристика структуры неподвижной фазы
k'_{AB}	$k'_{\text{амилбензол}}$	80 об.% CH ₃ OH	количество алкильных цепей	площадь поверхности силикагеля, покрытие поверхности
α_{CH_2}	$\frac{k'_{\text{амилбензол}}}{k'_{\text{бутилбензол}}}$	80 об.% CH ₃ OH	гидрофобность	покрытие поверхности
$\alpha_{T/O}$	$\frac{k'_{\text{трифенилен}}}{k'_{\text{о-терфенил}}}$	80 об.% CH ₃ OH	стерическая селективность	структура силана, покрытие поверхности
$\alpha_{C/P}$	$\frac{k'_{\text{кофеин}}}{k'_{\text{фенол}}}$	30 об.% CH ₃ OH	способность к образованию водородных связей	количество силанольных групп, эндкеппинг, покрытие поверхности
$\alpha_{A/P}$	$\frac{k'_{\text{бензиламин}}}{k'_{\text{фенол}}}$	30 об.% CH ₃ OH, 0.02 М фосфатный буферный раствор pH 7.6	ионообменная ёмкость при pH > 7	количество силанольных групп и ионообменных центров
$\alpha_{A/P}$	$\frac{k'_{\text{бензиламин}}}{k'_{\text{фенол}}}$	30 об.% CH ₃ OH, 0.02 М фосфатный буферный раствор pH 2.7	ионообменная ёмкость при pH < 3	количество ионообменных центров при pH 3, предварительная обработка силикагеля

Идея селективности к частичным структурным различиям была реализована в тесте Танака для оценки свойств гидрофильных неподвижных фаз в 2011 году [69]. В качестве тестовых веществ были предложены производные нуклеозидов, фенилглюкозида, ксантина, п-толуолсульфонат натрия SPTS и триметилфенилammоний хлорид TMAPS. Соединения и рассчитываемые на их основе параметры представлены в табл. 7. Подход разрабатывался на фазах на

основе силикагеля, рКа силанольных групп которого предполагали равной 4.7. В качестве подвижной фазы была использована смесь 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор рН 4.7/ацетонитрил 10/90 об.%. Выбор уридина для оценивания гидрофильных взаимодействий, обеспечиваемых неподвижными фазами (гидрофильность), был сделан на основании его нейтральности, способности поглощать УФ излучение и приемлемых факторов удерживания ($k' < 5$). Данный подход также как и тест Танака для ОФ ВЭЖХ широко используют для характеристики свойств коммерчески доступных и разрабатываемых неподвижных фаз для гидрофильной хроматографии [30,32,33,100,103–105].

Таблица 7. Параметры теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз [69].
Условия: 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор рН 4.7/ацетонитрил 10/90 об.%; скорость потока 0.5 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм

Соединение	 Уридин (U)	 2'-дезоксиуридин (2dU)	 5-метилуридин (5MU)	
Параметр	Гидрофильные взаимодействия $k'(U)$	Гидрофильные взаимодействия $\alpha(OH) = \frac{k'(U)}{k'(2dU)}$	Гидрофобные взаимодействия $\alpha(CH_2) = \frac{k'(U)}{k'(5MU)}$	
Соединение	 Аденозин (A)	 Видарабин (V)	 2'-дезоксигуанозин (2dG)	 3'-дезоксигуанозин (3dG)
Параметр	Селективность к конфигурационным изомерам $\alpha(V/A)$		Селективность к региоизомерам $\alpha(2dG/3dG)$	
Параметр	Селективность по форме $\alpha(4\text{-нитрофенил-}\alpha\text{-D-глюкопиранозид} / 4\text{-нитрофенил-}\beta\text{-D-глюкопиранозид})$			
Соединение	 п-толуолсульфонат натрия (SPTS)	 N,N,N-триметилфенил-аммоний хлорид (TMPAC)	 Теобромин (Тб)	 Теофиллин (Тр)
Параметр	Анионообменная селективность $\alpha(AX) = \frac{k'(SPTS)}{k'(U)}$	Катионообменная селективность $\alpha(CX) = \frac{k'(TMPAC)}{k'(U)}$	Кислотно-основные свойства неподвижных фаз $\alpha(Tb/Tr)$	

Из полного набор селективностей теста Танака были выделены два параметра: $\alpha(OH)$ и $\alpha(Tb/Tr)$, характеризующие гидрофильность и кислотно-основные свойства поверхности сорбента, которые позволили дифференцировать неподвижные фазы на

основе силикагеля с полимерным функциональным слоем и модифицированные низкомолекулярными силанами [104]. Авторы также установили, что гидроксильная селективность $\alpha(\text{OH})$ является ключевым параметром для классификации колонок с точки зрения механизма распределения, т.к. он отражает толщину водного слоя на поверхности сорбента (рис. 10). Вывод о влиянии соотношения объёмов фаз $\frac{V_W}{V_M}$, участвующих в процессе распределения, на $\alpha(\text{OH})$ был также сделан в исследовании [59], рассматривающем вклады механизмов в коэффициенты селективности.

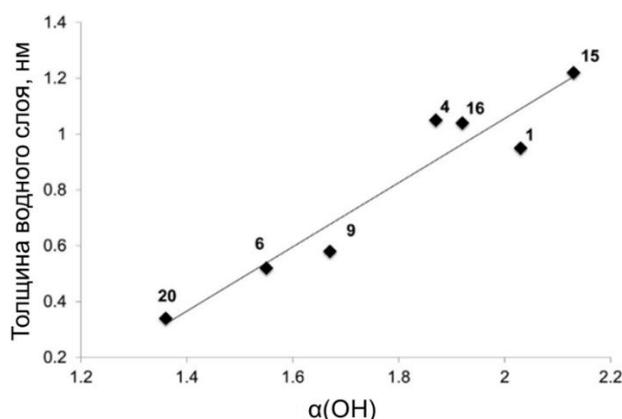


Рис. 10. Связь толщины водного слоя, установленной в работе [40], с гидроксильной селективностью [104]. Колонки: 1 – ZIC®-HILIC, 200 Å, 4 – ZIC®-cHILIC, 6 – Nucleodur® HILIC, 9 – TSKgel® Amide-80, 15 – PolySULFOETHYL A™, 16 – PolyHYDROXYETHYL A™, 20 – LiChrospher 100 Diol. Условия измерения $\alpha(\text{OH})$: 20 mM аммонийно-ацетатный буферный раствор pH 4.7/ацетонитрил 10/90 об.%, скорость потока 1 мл/мин, температура колонки 30°C.

Однако при более подробном рассмотрении параметров теста Танака для гидрофильной хроматографии можно отметить некоторые недостатки:

1) при разработке данного теста не обсуждалось влияние непосредственных взаимодействий вещество-неподвижная фаза на удерживание уридина, которое, как было отмечено при рассмотрении теоретических аспектов механизма удерживания, может приводить к некорректному сравнению колонок по количеству воды, адсорбированной на поверхности фазы (уравнение (14) стр. 23).

2) Для расчёта метиленовой селективности $\alpha(\text{CH}_2)$, которая предположительно должна характеризовать силу гидрофобных взаимодействий между анализом и неподвижной фазой, предлагают делить фактор удерживания более гидрофильного уридина на фактор удерживания его метилированного производного, а не наоборот, как это было в тесте для силикагелей C18. Кроме того, уридин и 5-метилуридин не являются гомологами, метильная группа замещает водород в пиримидиновом

кольце, что может существенно влиять на распределение электронной плотности в молекуле, в отличие от таковых различий между амил- и бутилбензолом (табл. 6).

3) Для оценивания ионообменных свойств фаз заведомо предложено использовать относительно гидрофобные органические ионы п-толуолсульфонат и триметилфениламмоний, факторы удерживание которых делят на фактор удерживания уридина для учёта влияния гидрофильных взаимодействий на удерживание ионов. Однако эти пары соединений имеют существенные структурные различия, что может приводить к влиянию на параметр иных неионообменных взаимодействий и, как следствие, некорректным результатам сравнения колонок. Так, для неподвижных фаз на основе полистирол-дивинилбензола было отмечено влияние гидрофобных и π - π взаимодействий на $\alpha(A_X)$ [34,106].

Одновременно с тестом Танака был предложен другой набор веществ и селективностей для оценки взаимодействий, обеспечиваемых полярными неподвижными фазами различной структуры [70], с помощью которого также были изучены различные колонки [19,32,61,107]. Выбор соединений был сделан с опорой на принципы, применяемые в тестах для ОФ ВЭЖХ [101], их предполагаемые взаимодействия с неподвижной фазой и низкий (отрицательный) логарифм коэффициента распределения в системе н-октанол – вода (табл. 8). Для расчёта параметров анионо- и катионообменных свойств использовали кислоты, диссоциирующие при рН 6.8, и четвертичные амины, соответственно, гидрофильные взаимодействия которых компенсировали с помощью цитозина. Выбор цитозина обосновывали за счёт отсутствия у него заряда в условиях теста, высокой гидрофильности и наибольшего структурного сходства с ионами по сравнению с остальными рассматриваемыми нейтральными соединениями. Можно отметить, что коэффициенты селективности триметилфениламмоний/цитозин и бензолсульфоновая кислота/цитозин напоминают $\alpha(C_X)$ и $\alpha(A_X)$ из теста Танака, основное отличие заключается в использовании цитозина вместо уридина. В качестве меры гидрофильных взаимодействий была предложена селективность пары структурно схожих соединений цитозин/урацил: чем выше селективность, тем больше гидрофильность неподвижной фазы [107]. Однако стоит отметить различия результатов дифференциации свойств колонок по параметру гидрофильности в работе [70] и тесте Танака [69]. Например, немодифицированные силикагели были

Таблица 8. Параметры, предлагаемые в работе [70], для оценки взаимодействий в гидрофильной хроматографии. Условия: 25 мМ ацетат аммония pH ~6.8/ацетонитрил 20/80 об.%, скорость потока 0.5 мл/мин, температура колонки 22 ± 2 °C

Тип взаимодействия	Коэффициент селективности	pKa соединений	Соотношение $\log D$ (pH 6.8)
«Гидрофильное»	Цитозин/урацил*	4.83, 9.98 / 9.77, 13.79	1.4
	Цитозин/тиоцитозин	4.83, 9.98 / 6.45, 9.48	2.4
Гидрофобное	1-этилимидазол/ 1-метилимидазол	7.25 / 6.82	-0.6
Донор водородной связи	1,3-дигидроксиацетон/ метилгликолят	-	1.7
Многоочечная водородная связь	1,3-дигидроксиацетон/ диметилформамид	-	2.4
	Аденозин/аденин	2.73, 5.2 / 3.15, 5.43, 9.91	3.8
Гидрофильная пространственная селективность	Метилгликолят/ α -гидрокси- γ -бутиролактон	-	1.1
Диполь-дипольное	Цис- / транс- диаминдихлоро платина (II)	-	-
π - π	1-винилимидазол/ 1-этилимидазол	5.92 / 7.25	2.9
Катионообменное	Триметилфениламмоний/ цитозин	- / 4.83, 9.98	4.7
	Бензилтриметиламмоний ВТМА / цитозин	- / 4.83, 9.98	5.0
	Бензилтриэтиламмоний/ цитозин	- / 4.83, 9.98	4.1
Анионообменное	Бензолсульфоновая кислота/ цитозин	-2.36 / 4.83, 9.98	1.0
	Бензойная кислота/ цитозин	4.08 / 4.83, 9.98	0.9
	Сорбиновая кислота/ цитозин	5.01 / 4.83, 9.98	0.3
Цвиттер-ионное	Триптофан/аденин	2.54, 9.4, 16.6 / 3.15, 5.43, 9.91	6.7
Гидрофобная пространственная селективность	Сорбиновая кислота/ бензойная кислота	5.01 / 4.08	0.3

* жирным выделены пары веществ, выбранные для упрощения тестирования. На удерживание тиоцитозина влияет ионообменный механизм, проявление которого негативно сказывается на оцениваемом параметре гидрофильности.

отнесены к высокогидрофильным фазам в первом случае и слабогидрофильным во втором. По-видимому, селективность цитозин/урацил и фактор удерживания уридина, описывают разные свойства неподвижных фаз, объединяемые одним термином «гидрофильность», что делает необходимым, во-первых, тщательное сравнение результатов характеристики и, во-вторых, проверку с использованием

принципиально другого подхода. Однако стоит отметить, что условия измерения параметров отличаются, кроме того, на фактор удерживания может существенно влиять диаметр пор [70], что также необходимо учитывать.

Таким образом, несмотря на экспрессность способа описания свойств неподвижных фаз по коэффициентам селективности и удобства сравнения результатов, необходима его доработка с опорой на подробное изучение механизмов удерживания веществ-маркеров, от которых зависит результат оценки вторичных взаимодействий.

1.4.5. Способы представления и обработки результатов характеристики неподвижных фаз

Для наглядного представления результатов характеристики неподвижных фаз и их классификации используют разные варианты. К ним относятся лепестковые диаграммы, графики в строго установленных координатах, графики счетов для двух первых главных компонент (ГК) и дендрограммы (рис. 11).

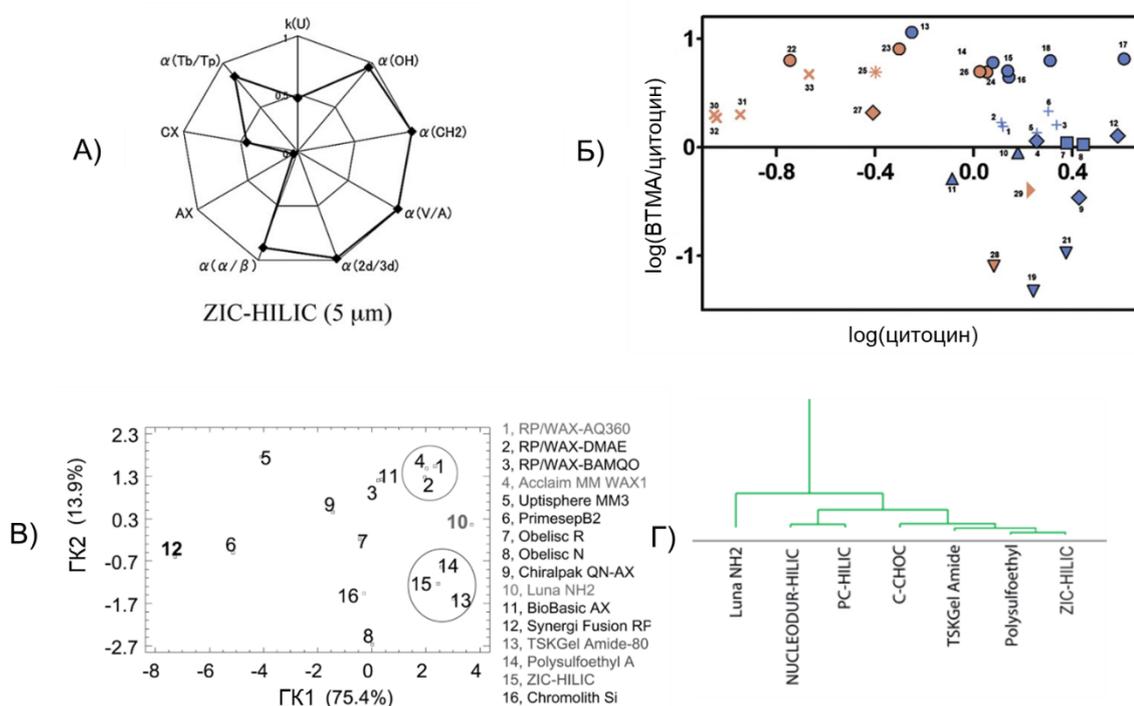


Рис. 11. Примеры представления результатов характеристики неподвижных фаз в гидрофильной хроматографии. А) Лепестковая диаграмма для колонки ЗИС-НЛЛС по данным теста Танака [69]. Б) График, отражающий сравнение гидрофильности и ионообменных свойств неподвижных фаз [107]. В) График счетов ГК1-ГК2 по данным удерживания ксантинов, нуклеозидов и водорастворимых витаминов для полярных неподвижных фаз [96]. Г) Иерархическая кластеризация многофункциональных сорбентов, полученная по данным удерживания тестовых веществ в условиях ГИХ и ОФ ВЭЖХ [108].

В первых двух случаях по осям откладывают значения параметров, описывающих отдельные свойства сорбентов, для двумерных графиков свойства предположительно являются ортогональными (независимыми). Лепестковые диаграммы обычно используют для многомерных данных теста Танака [69,102] (рис. 11А), различие формы которых свидетельствует о разных свойствах неподвижных фаз. Упрощённым вариантом представления является построение графиков по выделенным свойствам, позволяющим сравнивать фазы по их относительному расположению (рис. 11Б). В качестве координат используют пары параметров $\log k'(U) - \log k'(TМРАС)$ [69], $\log \alpha(ВТМА/цитозин) - \log k'(цитозин)$ (рис. 11Б) [107], $\log \alpha(ВТМРА/урацил) - \log \alpha(цитозин/урацил)$ [19], $\alpha(ОН) - \alpha(Тb/Тр)$ [104] и некоторые другие [100].

При сравнении большого набора неподвижных фаз с использованием одного или нескольких классов тестовых веществ используют хемометрические подходы. Метод главных компонент (МГК) обычно применяют к матрицам данных, содержащих факторы удерживания соединений [8,69,70,100,108,109] или коэффициенты селективности [8,69,70,105]. Реже матрица данных включает одновременно факторы удерживания и селективности [96], а также другие хроматографические параметры, такие как эффективность и асимметрия пиков [110]. Для выяснения сходств или различий свойств неподвижных фаз используют график счетов, построенный по первой и второй главной компоненте ГК1-ГК2 (рис. 11В). При этом предполагают, что фазы, расположенные на графике близко друг к другу, имеют схожие хроматографические свойства. Однако если дисперсия, описываемая суммарно первой и второй главной компонентой, далека от 100 %, то необходимо рассматривать следующие главные компоненты ГК3, ГК4 и т.д. В таком случае может быть применён метод иерархической кластеризации, использование которого мало представлено в гидрофильной хроматографии (рис. 11Г) [8,108].

1.5. Существующие рекомендации выбора условий разделения в гидрофильной хроматографии

Правильный выбор условий разделения обеспечивает успех анализа реальных объектов. Поскольку на данный момент не разработаны достаточно надёжные модели предсказания удерживания соединений в режиме гидрофильной хроматографии, исходя из их структуры, то выбор условий разделения зачастую

происходит методом проб и ошибок. Существующие рекомендации носят общий характер, при этом выбор условий связан с тестированием аналитов при различных составах подвижной фазы на нескольких колонках разных типов без непосредственной привязки к свойствам веществ [2,75], в том числе оформленные в более сложные автоматизированные хроматографические системы [111]. Если неподвижная фаза определена, то для выбора условий используют методы планирования эксперимента (Design of Experiment, DoE), позволяющие за меньшее число экспериментов выбрать оптимальные [91,112–114]. Несмотря на это, систематическое варьирование параметров (доли ацетонитрила, рН, концентрации буферного раствора, температуры колонки) является трудо- и времязатратным процессом.

Интерес представляют схемы (деревья решений) [115], содержащие информацию о способах изменения удерживания и улучшения селективности, которые позволяют уменьшить количество перебираемых условий для достижения разделения компонентов. Для отрицательно заряженных соединений рекомендуют основные или цвиттер-ионные неподвижные фазы, для положительно заряженных – кислотные, нейтральные или цвиттер-ионные фазы, для нейтральных или цвиттер-ионных аналитов могут быть использованы любые фазы [115]. В качестве начальных условий предложен состав подвижной фазы 10 мМ формиат аммония/ацетонитрил 25/75 об.%. При недостаточной селективности разделения на одной колонке рекомендуют в первую очередь использовать другую, при этом колонка того же типа может обеспечивать альтернативный порядок элюирования. Дальнейшего повышения селективности добиваются изменением состава элюента или температуры колонки, при этом величину эффекта от варьирования параметров оценивают следующим образом: рН > доля органического растворителя > концентрация буферного раствора > температура колонки [7], рН > концентрация буферного раствора > температура колонки > доля ацетонитрила [75]. Возможна замена ацетонитрила на метанол для снижения времени удерживания полярных аналитов. При выборе состава подвижной фазы также необходимо учитывать его совместимость с выбранным способом детектирования.

Постановка задачи работы

Метод гидрофильной хроматографии вызывает у исследователей интерес благодаря обеспечению удерживания сильнополярных соединений разной структуры и заряда, а также иной селективности по сравнению с методом ОФ ВЭЖХ. Значительная вариативность ГИХ обусловлена разнообразными неподвижными фазами, на которых в условиях с высоким содержанием органического растворителя реализуется сложный механизм удерживания. Неполная информация об относительных вкладах механизмов в удерживание веществ существенно затрудняет выбор условий для проведения анализа реальных объектов. Кроме того, до сих пор нет единого мнения о том, на какие величины pH и pK_a , водные или водно-органические, опираться при работе с методом гидрофильной хроматографии.

Для изучения свойств полярных неподвижных фаз в условиях гидрофильной хроматографии используют несколько способов, основанных 1) на закономерностях удерживания тестовых веществ при варьировании параметров хроматографической системы, 2) на сравнении удерживания и селективности разделения соединений разных классов, 3) на измерении хроматографических параметров специально подобранных веществ-маркеров в фиксированных условиях, оценивающих роль различных взаимодействий в хроматографической системе (тест Танака). Однако, они имеют недостатки, требующие устранения для более корректного сравнения фаз.

Наиболее полную информацию о свойствах неподвижных фаз можно получить на основании трендов удерживания модельных соединений. Однако закономерности удерживания веществ в значительной степени зависят от состава элюента. На данный момент отсутствует единый подход к варьированию pH элюента, при этом в ряде используемых подходов отмечено одновременное влияние других параметров системы на удерживание веществ помимо pH , что существенно усложняет интерпретацию закономерностей удерживания. Кроме того, изучение механизмов и профилей удерживания тестовых аналитов зачастую проводят при одном фиксированном наборе параметров хроматографической системы, что значительно ограничивает применимость получаемых выводов. Таким образом, необходим тщательный выбор состава подвижной фазы и разработка подходов к варьированию её параметров независимо друг от друга, которые позволили бы улучшить качество регистрируемых закономерностей удерживания и,

следовательно, понимание механизмов удерживания и свойств неподвижных фаз в условиях гидрофильной хроматографии. Это дало бы возможность целенаправленно выбирать начальные условия разделения компонентов реальных объектов и их дорабатывать, руководствуясь установленными закономерностями.

Способ, основанный на сравнении удерживания и селективности разделения широкого круга модельных аналитов разных классов, с одной стороны, обеспечивает более полную информацию о свойствах неподвижных фаз, с другой – требует существенных временных затрат для их тестирования. Для выявления сходств и различий селективности фаз используют отдельные методы многомерной обработки данных. Однако комплекс хемометрических подходов позволил бы не только надёжнее провести сравнение свойств фаз, но и сократить число аналитов, необходимых для выявления различий в селективности.

Экспрессный способ характеристики неподвижных фаз по определённым коэффициентам селективности (тест Танака) может давать некорректные результаты из-за использования неподходящих веществ-маркеров. Изучение их механизмов удерживания и установление связи параметров с ёмкостью колонок позволило бы оценить правильность описания свойств полярных неподвижных фаз по существующим параметрам и выбрать более подходящие вещества-маркеры.

Таким образом, для разработки способов изучения свойств неподвижных фаз в условиях гидрофильной хроматографии необходимо выбрать состав подвижной фазы и разработать подходы к его варьированию, применить комплекс хемометрических подходов к данным удерживания большого набора тестовых веществ на сорбентах разной структуры, оценить правильность описания свойств фаз параметрами из теста Танака и выбрать более подходящие.

ГЛАВА 2. Экспериментальная часть

2.1. Аппаратура

Использовали хроматографические системы с различными детекторами:

- Жидкостной хроматограф Vanquish Flex с четырехканальным градиентным насосом, автоматической системой ввода пробы, термостатом колонки с флуоресцентным и *диодно-матричным детектором*, программный пакет Chromeleon 7.3 (Thermo Fisher Scientific, США). Мёртвый объём системы – 0.097 мл.
- Жидкостной хроматограф Dionex UltiMate 3000 с двухканальным градиентным насосом, автоматической системой ввода пробы, термостатом колонки (25°C) и *диодно-матричным детектором*, программный пакет Chromeleon 7.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Мёртвый объём системы – 0.117 мл.
- Жидкостной хроматограф Shimadzu Prominence (Shimadzu, Япония) 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 *испарительным 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 +35°C для нейтральных соединений (раздел 6.1), +60-75°C для анионов (раздел 6.2), коэффициент усиления детектора $k=6-9$ выбирали, исходя из высоты пиков на хроматограмме в ходе эксперимента. Программное обеспечение – LabSolutions ver. 5.55. Мёртвый объём системы – 0.093 мл.
- ВЭЖХ система, включающая изократический насос Shimadzu LC-20ADSP (Shimadzu, Япония), шестиходовой кран-дозатор и *рефрактометрический детектор* (Agilent Technologies, США), программный пакет ChemStation (Agilent Technologies, США).
- Жидкостной хроматограф Dionex ICS-1600 с изократическим насосом, *кондуктометрическим детектором* и электромембранным подавителем фонового сигнала, программный пакет Chromeleon (Thermo Fisher Scientific, США).

Объем пробы во всех случаях составлял 20 мкл. Кроме экспериментов, направленных на получение термодинамических параметров, проводимых путём варьирования температуры колонки, в остальных случаях температура

соответствовала комнатной или 25°C при наличии блока термостатирования колонки.

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 $\pm 5\%$ («НТЛ», Польша). Измерение pH подвижной фазы проводили при помощи pH-метра «pH-420» («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).

2.2. Реактивы и материалы

В качестве компонентов подвижной фазы использовали ацетонитрил для ВЭЖХ: *Компонент-реактив*, Россия; ацетонитрил «HPLCgradientgrade»; ледяную уксусную кислоту, 99.5%; кислоту ортофосфорную, 85%, х.ч.: *Panreac*, Испания; монохлоруксусную кислоту, >99%; лимонную кислоту, $\geq 99.5\%$: *Sigma-Aldrich*, США; муравьиную кислоту, 99.7%; гидроксид натрия, ч.д.а., гидроксид калия, ч.д.а.: *Компонент-Реактив*, Россия; пропионовую кислоту, 99.5%: *Кемикал Лайн*, Россия; аммиак водный, ос.ч.: *Сигма Тек*, Россия; метансульфоновою кислоту, >99%: *Sigma-Aldrich*, Китай; гидрофосфат калия 3-водный, ч.д.а.; дигидрофосфат калия, ч.д.а.: *Русхим*, Россия; ацетат аммония, 98.0%, хлорид натрия, >99%: *CDH*, Индия; нитрат натрия, ч.д.а.: *Merk*, Германия.

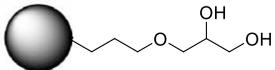
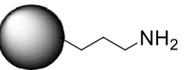
Тестовые вещества: толуол, х.ч., мочеви́на, 99.5%: *Компонент-Реактив*, Россия; урацил, >99.0%; уридин, >98.0%, аденозин, >99.0%; теобромин, >98.0%; теофиллин, >98.0%; видарабин моногидрат, >98.0%; 5-метилуридин, >98.0%; 2'-дезоксинуридин, >98.0%; N,N,N-триметилфениламмоний хлорид, >98.0%; п-толуолсульфонат натрия, >90.0%; рибофлавин, 99%; пиридоксин гидрохлорид, 99%; тиамин, >96%; п-толуолсульфоновая кислота, >98%; 1-бутансульфонат натрия, >98%; 1-пропансульфонат натрия, >98%; этансульфонат натрия, >98%; D-(+)-рибоза, 98%; D-(+)-ксилоза, >98%; D-(+)-глюкоза, 99,5%; D-(+)-фруктоза, 99.9%; 3,4-диаминобензойная кислота, 98%; 4-винилпиридин, 95%: *TCI*, Япония; цитозин, >99%; цитидин, >99%; гуанин, 98%; ксантин, >99%; салициловая кислота, $\geq 99.0\%$; 2-аминоэтансульфоновая кислота, >99%; 2-метиламиноэтансульфонат натрия,

>99%; гуанозин, >98%; бензиламин, 99%; п-стиролсульфоная кислота; никотинамид, 99.7%; кислота никотиновая; арил-винилбензилтриметиламмоний хлорид (смесь 3- и 4-винил- изомеров), 99%; 2,4-динитробензойная кислота, 98%; 3-нитробензойная кислота, 99%; 4-нитробензойная кислота, 98%; 4-метилбензойная кислота, 98%; 4-метоксибензойная кислота, 99%; 4-аминобензойная кислота, 99%; 4-диметиламинопиридин, $\geq 99\%$; 4-аминопиридин, 98%; п-фенилендиамин, 98%; 4-метоксианилин, $\geq 99\%$; N,N-диметиланилин, 99%; пиколиновая кислота, 99%; *Sigma-Aldrich*, Китай, Великобритания, Германия, США; хлорид калия, >99%: *CDH*, Индия; бензойная кислота, >99.5%: *Fluka Garantie*, Швейцария; хлорид лития, >98%; ацетат магния 4-водный, >98%; хлорид кальция, >98%; бензолсульфоная кислота, ч.д.а.: *Reaxim*, Россия; D,L-фенилаланин, х.ч.: *Serva*, Германия; анилин, 99.5%; пиридин, 99.5%: *SRL*, Индия; молочная кислота, ч.д.а.: *Panreac*, Испания; сорбиновая кислота, $\geq 99.0\%$: *Хромалаб*, Россия; тиомочевина, 98%, формамид, 97%; ацесульфам калия, >99%: *Anhui Jinhe Industrial*, Китай; сахаринат натрия: *Tianjin North Food*, Китай; цикламат натрия: *Foodmate*, Китай; аспартам, >98%: *SiniSweet*, Китай; метансульфонамид: *Apollo Scientific*, Великобритания. Бензилтриметиламмоний хлорид, бензилтриэтиламмоний хлорид предоставлены Нуриевым В.Н., чистота > 97%.

2.3. Характеристики неподвижных фаз

В работе использовали как коммерчески доступные, так и разработанные в лаборатории хроматографии МГУ неподвижные фазы (табл. 9, табл. 10), на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола (ПС-ДВБ). Силикагель *Kromasil*, являющийся матрицей сорбента С2 с привитым эремомицином, имел удельную поверхность 300 м²/г, аминопропилсиликагель с содержанием 1.70 масс.% азота, являющийся матрицей сорбентов, полученных по реакции Уги (табл. 10), – 200 м²/г, сополимер стирола и дивинилбензола со степенью сшивки 50%, являющийся матрицей сорбентов «П», – 650 м²/г. Данные были предоставлены производителями. Благодаря высокой степени сшивки полимерные сорбенты не набухают в органическом растворителе, что позволило работать с данными колонками в условиях гидрофильной хроматографии. Высокие ёмкости (см. раздел 6.2.2) являлись следствием поверхностного модифицирования частиц ПС-ДВБ в несколько стадий с использованием аминирующих и кватернизирующих агентов (табл. 9).

Таблица 9. Характеристики неподвижных фаз на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола, используемых в работе

Коммерческое название/название в других работах	Обозначение	Функциональный слой	Размер колонки, мм	Размер частиц, мкм	Размер пор, нм
Кromasil 100-5-SIL (Кromasil)	C1	немодифицированный силикагель	100×3	5	11
Диасфер-110-Ere (АО «БиоХимМак СТ»)	C2	эремомицин	50×3 100×3		
Диасфер-300-диол (АО «БиоХимМак СТ»)	C3		250×4.6	6	30
Диасфер-110-амин (АО «БиоХимМак СТ») [116]	C4 другие партии: C4_1, C4_2, C4_3	 C4 (2.10% N)*, C4_1 (1.70% N), C4_2 (1.67% N), C4_3(1.52% N)	100×3	5	11
УМС-Pack Polyamine II (УМС)	C5	полиамин	150×4.6		
Т-Б-ИД	C6	гиперразветвлённый слой из диэпоксида** (предполагают наличие NR ₄ ⁺), таурин и иминодиуксусная кислоты, немодифицированные аминопропильные группы	100×3		5
С _А -Б [117]	C7	разветвлённый слой из диэпоксида** (предполагают наличие NR ₄ ⁺), остаточные аминопропильные группы			
С _А -Б-Э [117]	C8	разветвлённый слой из диэпоксида** (предполагают наличие NR ₄ ⁺), эремомицин, остаточные аминопропильные группы			
С-М [118]	C9	продукт реакции Уги, содержит амидные и немодифицированные аминопропильные группы	100×3	5	11
ПАМ 1:0.1 [119]	C10	продукт реакции Уги, содержит амидные группы, сополимер акриловой кислоты и амида, немодифицированные аминопропильные группы			
ВРЕI-DMA [120]***	П1	привитой полиэтиленимин и полиэлектролиты, полученные из диэпоксида** и диметиламина	100×4	5.5±0.5	4
ВРЕI-GI 80°С [121]***	П2	привитой полиэтиленимин, кватернизованный глицидолом			

P-DMA x10 [106]***	П3	привитые полиэлектролиты, полученные из диэпоксида** и диметиламина			
P-MEA [120]***	П4	привитые полиэлектролиты, полученные из диэпоксида** и N-метилэтанолamina			
E-MG-DMA-A****	П5	привитые полиэлектролиты двух типов: первый получен из диэпоксида** и N-метилглицина, второй – из диэпоксида** и диметиламина			
E-MG-DMA-B****	П6				

* указано содержание азота по результатам элементного анализа [116]; ** диэпоксид – 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир; *** матрица ПС-ДВБ после ацилирования и восстановительного аминирования метиламином; **** матрица ПС-ДВБ после эпоксицирования. Сорбенты получены способом, аналогичным описанному в работе [122], с использованием N-метилглицина вместо иминодиуксусной кислоты.

Таблица 10. Условия получения сорбентов по реакции Уги [118,119,123] из аминопропилсиликагеля С4_1, сравнение свойств которых приведено в главе 5. Размеры колонок 100×3 мм

Неподвижная фаза	Изоцианид R ₃ -NC	Карбонильное соединений R ₁ -CO-R ₂	Карбоновая кислота R ₄ COOH	Массовое соотношение матрица : полимер	Растворитель	Время, дни	Кат.
С-У1	трет-бутилизоцианид	ацетон	гликолевая	–	MeOH	1	–
С-У2					EtOH	1	–
С-У3	п-толуолсульфонил-метилизоцианид				MeOH	4	–
С-У4					EtOH	4	–
С-У5					EtOH	4	+
С-У6	этилизоцианацетат				MeOH	1	–
С-У7					EtOH	4	+
С-У8	диэтилизоциано-метилфосфонат				EtOH	4	+
С-У9	2-морфолиноэтил-изоцианид				EtOH	1	–
С-У10					MeOH	4	–
С-У11					EtOH	4	–
С-У12					EtOH	1	+
С-У13					MeOH	4	+

С-У14					EtOH	4	+	
С-У15		2-ацетилпиррол			EtOH	4	-	
С-У16		ацетальдегид			EtOH	4	-	
С-У17		2-ацетилфуран			EtOH	4	-	
С-У18		ацетон	серин			H ₂ O:EtOH (1:2)	4	-
С-У19			аспарагин			H ₂ O:EtOH (1:2)	4	-
С-пУ1		ацетальдегид	полимолочная (Mw 60000)	1:0.01		CH ₂ Cl ₂ : EtOH (1:1)	4	-
С-пУ2			полиакриловая (Mw 2000)	1:0.1		H ₂ O:EtOH (1:4)	4	-
С-пУ3			сополимер акриловой кислоты и акрилата натрия (Mw 2000)	1:0.1		EtOH	4	-
С-пУ4			сополимер акриловой и малеиновой кислот (Mw 2000)	1:0.1		EtOH	4	-
С-пУ5				1:1		EtOH	4	-
С-пУ6			сополимер акриловой и малеиновой кислот (Mw 70000)	1:0.1		H ₂ O:EtOH (2:1)	4	-
С-пУ7 (совпадает с С10)			сополимер акриловой кислоты и амида (Mw 150000)	1:0.1		H ₂ O:EtOH (1:2)	4	-
С-пУ8				1:0.3		H ₂ O:EtOH (1:2)	4	-

Сорбенты, полученные по реакции Уги, были упакованы в колонки размером 100×3 мм. Немодифицированный силикагель, 3-аминопропилсиликагель и сорбент С2, предоставленные Староверовым С.М. в виде порошка, были самостоятельно упакованы в колонки. Заполнение осуществляли в стальные колонки размером 100×3 и 50×3 мм, при помощи насоса «Кнауер К-1900» («Кнауер», Германия).

Для определения мёртвого времени на неподвижных фазах на основе силикагеля использовали время удерживания толуола, на основе ПС-ДВБ – возмущение базовой линии при введении деионизованной воды. Поскольку колонки имели разную геометрию, то при расчёте факторов удерживания аналитов учитывали мёртвый объём системы, который устанавливали по времени выхода толуола в отсутствие колонки при соединении капилляров переходником нулевого объёма (см. раздел 2.1). В большинстве случаев хроматографический эксперимент проводили при линейной скорости потока 3.3 мм/с, соответствующей 1.0 мл/мин для колонок 3 мм диаметра и 1.8-2.0 мл/мин для колонок с диаметром 4 и 4.6 мм.

Поскольку для получения закономерностей удерживания тестовых веществ колонки переуравновешивали на разные составы подвижной фазы, отличающиеся рН, концентрацией и природой буферного раствора, долей ацетонитрила, то периодически проверяли их стабильность. Было показано, что факторы удерживания веществ со временем изменяются незначительно (рис. 12), следовательно, полученные тренды удерживания вызваны именно изменением состава элюента.

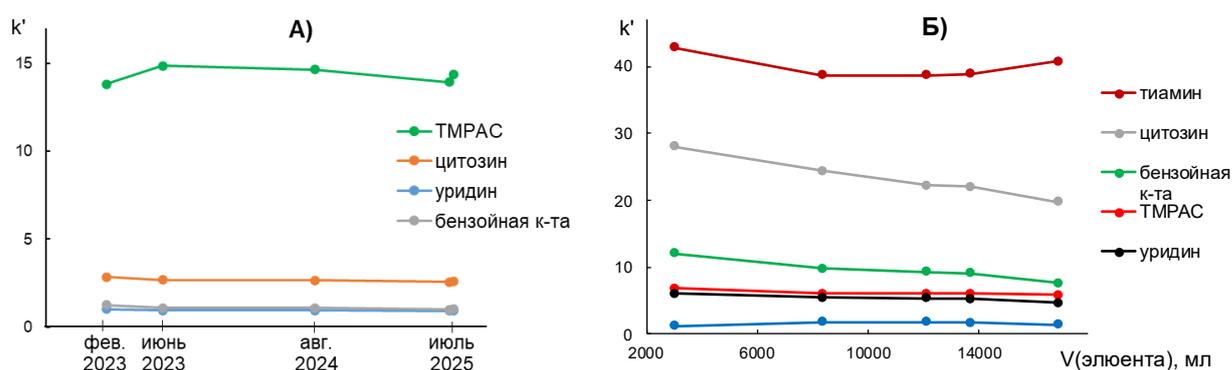
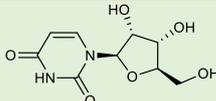
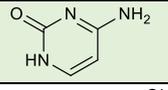
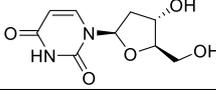
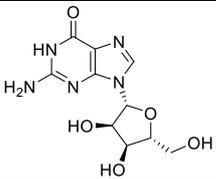
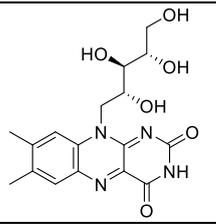
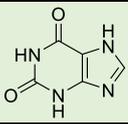


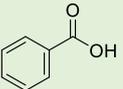
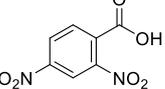
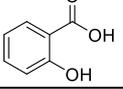
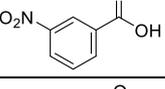
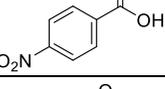
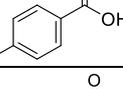
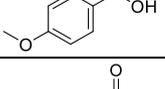
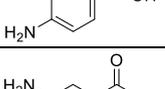
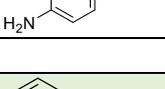
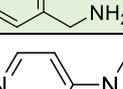
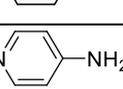
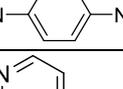
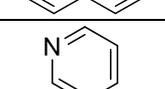
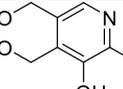
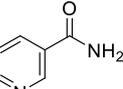
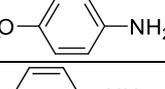
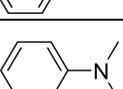
Рис. 12. Изменение факторов удерживания тестовых соединений от времени эксплуатации (объёма пропущенного элюента) на А) силикагеле С1 и Б) силикагеле с привитым эремоницином С2. Условия: 50 мМ АсОНа/АсОН w/pH 4.76 / ацетонитрил 10/90 об.%.

2.4. Свойства тестовых веществ

В главах 3 и 4 использовали тестовые вещества различной структуры и кислотно-основных свойств. В табл. 11 приведены рассчитанные в программе ACD/Labs 12.01 (ACD Labs, Канада) и экспериментальные данные для констант диссоциации (источник: база данных pKa IUPAC) и параметра log P (база данных KOWWIN v1.69). Вещества были разделены на 6 групп, учитывая их предполагаемое поведение в подвижной фазе с высоким содержанием ацетонитрила. Ксантин был отнесён к группе слабых кислот, поскольку ранее было показано, что для него реализуется ионный обмен в гидрофильной хроматографии [119]. Вещества, выделенные зелёным, были выбраны для сравнения закономерностей удерживания на разных неподвижных фазах (раздел 4.3). Структурные формулы аналитов, используемые в главах 5 и 6, приведены непосредственно в тексте обсуждения с необходимыми характеристиками.

Таблица 11. Структурные формулы и свойства тестовых веществ, используемых преимущественно в главах 3 и 4

Вещество	Структура	Константы диссоциации				logP _{эксп}	logP*	logD*
		тип	w pK _a _{эксп}	w pK _a *	s pK _a **			
Нейтральные соединения								
урацил		HA	9.4	9.0	–	–1.07	–1.0	–
уридин		HA	9.5	9.4	–	–1.98	–1.6	–
цитозин		BH ⁺ HA	4.6 12.2	4.4 12.3	–	–1.73	–1.7	–
2'-дезоксидеозидин		HA	–	9.4	–	–1.51	–1.3	–
гуанозин		BH ⁺ HA	2.6 9.3	2.4 9.6	–	–1.90	–2.3	–
рибофлавин		HA	9.9	9.9	–	–1.46	0.1	–
Слабые кислоты								
ксантин		HA	7.5	7.6	–	–0.73	–0.7	–1.1

Бензойная кислота		HA	4.2	4.2	7.1 [18] 6.8 [23]	1.87	1.6	-1.6
2,4-динитро-бензойная кислота		HA	-	1.4	-	-	1.3	-1.8
2-гидрокси-бензойная кислота		HA	3.0	3.0	5.1 [23]	2.26	2.0	-1.1
3-нитро-бензойная кислота		HA	3.5	3.5	-	1.83	1.7	-1.5
4-нитро-бензойная кислота		HA	3.4	3.4	-	1.89	1.8	-1.4
4-метил-бензойная кислота		HA	4.4	4.4	-	2.27	2.0	-1.2
4-метокси-бензойная кислота		HA	4.5	4.5	-	1.96	1.8	-1.4
4-амино-бензойная кислота		BH ⁺ HA	2.5 4.9	2.5 4.9	-	0.83	0.7	-2.5
3,4-диамино-бензойная кислота		BH ⁺ HA	3.4 -	3.1 5.0	-	0.13	0.04	-3.1
Слабые основания								
Бензиламин		BH ⁺	9.4	9.1	-	1.09	1.36	-1.7
4-диметил-амино-пиридин		BH ⁺	9.6	9.5	-	1.34	1.34	-1.2
4-амино-пиридин		BH ⁺	9.1	9.3	-	0.32	0.34	-2.2
фенилен-диамин		BH ⁺⁺ BH ⁺	2.7 6.2	2.7 6.2	-	-0.30	-0.38	-3.9
4-винил-пиридин		BH ⁺	5.6	5.4	-	-	1.82	-0.7
пиридин		BH ⁺	5.2	5.2	3.6 [23]	0.65	0.84	-1.7
пиридоксин		BH ⁺ HA	5.0 9.0	5.0 9.6	-	-	-0.83	-3.3
никотинамид		BH ⁺	-	3.5	-	-0.37	-0.4	-2.8
4-метокси-анилин		BH ⁺	5.3	5.2	-	0.95	0.9	-1.6
анилин		BH ⁺	4.6	4.6	2.9 [23]	0.90	1.1	-1.4
N,N-диметил-анилин		BH ⁺	5.1	5.1	2.9 [23]	2.31	2.1	-0.4

Сильные кислоты – анионы								
п-толуол-сульфонат SPTS		HA	-1.3	-0.4	-	-	0.9	-2.6
п-стирол-сульфонат SPSS		HA	-	-0.6	-	-	0.1	-3.4
Бензол-сульфонат SBS		HA	-	-0.6	-	-	-0.6	-4.1
Четвертичные амины – катионы								
Тиамин		BH ⁺⁺	-	4.8	-	-	-	-4.2
Триметил-фенил-аммоний хлорид TMPAC		-	-	-	-	-	-	-1.5
4-винилбензил-триметил-аммоний хлорид VBTMAC		-	-	-	-	-	-	-1.2
Бензил-триметил-аммоний хлорид BTMAC		-	-	-	-	-2.17	-	-1.9
Бензил-триэтил-аммоний хлорид BTEAC		-	-	-	-	-	-	-1.6
Амфолиты								
Фенилаланин		HA BH ⁺	2.0 9.2	2.2 9.2	-	-1.38	0.2	-2.3
Пиколиновая кислота		HA BH ⁺	1.0 5.4	1.0 4.7	-	0.72	0.2	-2.9 A ⁻
Никотиновая кислота		HA BH ⁺	- 4.8	2.2 4.8	-	0.36	0.2	-2.9 A ⁻

* рассчитано в ACD/Labs 12.01 (ACD Labs, Канада), $\log P$ приведены для нейтральных форм веществ, $\log D$ – для однозарядных ионов;

** константы диссоциации в среде, содержащей 90 об.% ацетонитрила.

2.5. Приготовление растворов

2.5.1. Приготовление буферных растворов и растворов тестовых веществ

Исходные водные буферные растворы, которые использовали для получения данных, представленных в главах 3 и 4, готовили путём добавления к карбоновой кислоте (моноклоруксусной МСАА, муравьиной НСООН, уксусной АсОН, пропионовой C_2H_5COOH), 0.5 М водного гидроксида натрия в мерной колбе на 250.0 или 500.0 мл. Количество кислоты соответствовало требуемой концентрации буферного раствора, добавляли примерный объём раствора щёлочи, требуемый для получения рН, близкого к необходимому. Далее разбавляли до метки деионизованной водой, перемешивали и доводили рН до нужного значения (w_pH) щёлочью с использованием рН-метра, калиброванного по водным стандартным растворам с рН 4.01, 6.86, 9.18 (Лабтех, Русхим, Россия, ГОСТ 8.135). Готовили водно-органические смеси, состав которых соответствовал подвижным фазам, и измеряли их рН (s_pH), также используя рН-метр, калиброванный по стандартным водным растворам. Для нескольких параллельных измерений s_pH (n от 3 до 19 для разных буферных растворов, $P=0.95$) доверительный интервал не превышал ± 0.1 , однако, учитывая, что точность измерений s_pH хуже, чем w_pH из-за не соответствия растворителей стандартных и анализируемых растворов, то значения s_pH приводили с точностью до десятых. Концентрации и рН буферных растворов представлены в табл. 12.

Таблица 12. Состав буферных растворов, рассчитанная концентрация элюирующего иона в подвижной фазе и буферная ёмкость элюента

Буферный раствор	w_pH	об.% CH_3CN	s_pH	$C_{буф}^*$ в водном растворе, мМ	$C_{буф}$ в элюенте, мМ	$[M]**$ в элюенте, мМ	Буферная ёмкость элюента, мМ
МСАА/МСАNa	2.85	85	5.1	17	2.5	1.25	1.4
				33	5.0	2.5	2.9
				67	10.0	5	5.8
	90	5.6	25	2.5	1.25	1.4	
			33	3.3	1.7	1.9	
			50	5.0	2.5	2.9	
			65	6.5	3.3	3.7	
100	10.0	5	5.8				
НСООН/НСОONa	2.85	85	5.1	75	11.3	1.25	2.6
				149	22.4	2.5	5.1
				298	44.7	5	10.2
		88	5.4	186	22.3	2.5	5.1
				112	11.2	1.25	2.6
		90	5.6	148	14.8	1.7	3.4

				224	22.4	2.5	5.1	
				292	29.2	3.3	6.7	
				447	44.7	5	10.2	
		93	6.0		319	22.3	2.5	5.1
					224	11.2	1.25	2.6
					447	22.4	2.5	5.1
		95	6.4		626	31.3	3.5	7.1
					104	10.4	2.5	4.4
					25	2.5	1.25	1.4
	3.25	90	6.0		50	5.0	2.5	2.9
					100	10.0	5	5.8
					33	3.3	2.5	1.4
	3.75	90	6.6		30	3.0	2.5	0.9
28					2.8	2.5	0.5	
138					13.8	1.25	2.6	
AcOH/AcONa	3.76	90	7.0	275	27.5	2.5	5.2	
				550	55.0	5	10.5	
				169	16.9	2.5	4.9	
	4.00	90	7.3		104	10.4	2.5	4.4
					70.5	7.1	2.5	3.7
	4.26	90	7.6		25	2.5	1.25	1.4
					50	5.0	2.5	2.9
	4.50	90	7.9		100	10.0	5.0	5.8
					18	2.7	2.5	0.5
	4.76	90	8.3		37	5.6	5.0	1.1
					55	8.3	7.5	1.6
					23	2.8	2.5	0.5
	5.76	85	8.6		28	2.8	2.5	0.5
55					5.5	5.0	1.0	
83					8.3	7.5	1.6	
88		9.0			39	2.7	2.5	0.5
					33	1.7	1.5	0.3
90		9.2			44	2.2	2.0	0.4
	48				2.4	2.2	0.5	
	55				2.8	2.5	0.5	
93	9.7			59	3.0	2.7	0.6	
				66	3.3	3.0	0.6	
				17	2.5	1.25	1.4	
C ₂ H ₅ COOH/ C ₂ H ₅ COONa	4.88	85	8.0	33	5.0	2.5	2.9	
				67	10.0	5.0	5.8	
				25	2.5	1.25	1.4	
	90	8.7			50	5.0	2.5	2.9
					100	10.0	5.0	5.8

* концентрация буферного раствора; ** концентрация элюирующего иона (соли), рассчитанная из $c_{\text{буф}}$ в элюенте и мольной доли α_{A^-} ; *** буферную ёмкость $\pi = 2.3 \times (1 - \alpha_{A^-}) \times \alpha_{A^-} \times c_{\text{буф}}$, мольную долю рассчитывали по водным w_{pH} и w_{pK_a} .

Ацетатные буферные растворы с катионом калия и аммония, а также калий и аммоний фосфатные буферные растворы, натрий цитратный и подкисленный

раствор метансульфоната (для выбора условий разделения компонентов спортивного напитка), готовили аналогичным образом. Для исследования по веществам-маркерам в главе 6 концентрацию аммонийно-ацетатного водного буферного раствора варьировали от 20-300 мМ, долю ацетонитрила – от 6.7 до 20 об.% в подвижной фазе.

Таблица 13. Концентрации тестовых веществ (мг/л) в модельных смесях для сравнения селективности разделения в разных условиях в главе 4

Аналит	Неподвижная фаза					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
уридин	3	4	3	5	7	5
цитозин	7	7	6	8	7	10
ксантин	7	30	6	7	7	10
бензойная кислота	65	60	65	80	70	120
SPTS	80	85	85	150	200	235
ТМРАС	230	170	230	215	100	130
тиамин	30	30	30	20	20	2
бензиламин	–	–	160	100	85	100

Индивидуальные растворы тестовых веществ готовили в смеси вода/ацетонитрил, соответствующей составу используемой подвижной фазы, в концентрации 10-100 мг/л. Концентрации соединений в модельных смесях подбирали индивидуально для каждой неподвижной фазы для достижения сопоставимых интенсивностей пиков (табл. 13).

2.5.2. Пробоподготовка спортивного напитка

Спортивный напиток «ISOCARB» (Sport Technology Nutrition, Россия) служил примером реальной многокомпонентной смеси полярных соединений. Пробоподготовка напитка перед проведением качественного анализа в предложенных хроматографических условиях состояла из нескольких этапов. Образец центрифугировали в течение 10 мин, отделяли декантацией от осадка, фильтровали через шприцевой нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. С использованием картриджа Chromabond® C18 ec f (силикагель, модифицированный октадецильными группами, объём 3 мл, масса адсорбента 500 мг, Macherey-Nagel, Германия) проводили очистку для удаления неполярных компонентов. Картридж предварительно кондиционировали 10 мл ацетонитрила и 5 мл воды. Полученный раствор смешивали с ацетонитрилом в объёмном соотношении 1/9. Перед непосредственным вводом в хроматографическую систему фильтровали через шприцевой фильтр. Качественный состав устанавливали по совпадению времён

удерживания в образце и стандартном растворе, а также с помощью УФ спектров для пиков, полученных на диодно-матричном детекторе.

2.6. Подходы к измерению ${}^s\text{p}K_a$

Константы диссоциации в водно-органической среде ${}^s\text{p}K_a$ для карбоновых кислот, являющихся основой буферных растворов, и аммония оценивали путём измерения ${}^s\text{pH}$ в смеси, приготовленной из водного раствора, содержащего эквимольную смесь кислоты и сопряженного с ней основания (${}^w\text{pH} = {}^w\text{p}K_a$), и ацетонитрила в нужном соотношении [18]. Сопряженные к кислотам основания были в натриевой форме, сопряженная к аммиаку кислота – в форме хлорида. Растворы готовили, как описано в разделе 2.5, таким образом, что концентрация соли в итоговом водно-органическом растворе составила 5 мМ. Константы диссоциации ${}^s\text{p}K_a$ 4-метил-, 4-метоксибензойной и бензойной кислоты устанавливали по зависимостям факторов удерживания от ${}^s\text{pH}$ по уравнению (27) стр. 38.

2.7. Способы измерения анионообменной ёмкости

Измерение ёмкости колонок проводили традиционным способом в водной среде (способ 'В'), так и в присутствии 90 об.% ацетонитрила (способы 'В/А' и 'В/А-В') (табл. 14). Значение ёмкости рассчитывали из концентрации вытесненного иона в собранном с колонки элюате. Для всех колонок кроме С5 элюат собирали в мерную колбу на 50.0 мл, для колонки С5, которая имела больший размер, – в колбу на 100.0 мл. Собранные водные элюаты способами 'В' и 'В/А-В' доводили до метки деионизованной водой, перемешивали и анализировали методом ионной хроматографии (ИХ). Условия хроматографического анализа представлены на рис. 13А. Метрологические характеристики определения хлорида методом ИХ: диапазон линейности градуировочной зависимости 10-50 мг/л, угловой наклон 0.19 ± 0.02 , $r=0.999$, предел обнаружения 0.08 мг/л. Собранные водно-органические элюаты способом 'В/А' доводили до метки смесью $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 35/65 об.%, перемешивали и анализировали методом гидрофильной хроматографии. Условия хроматографического анализа представлены на рис. 13Б. Метрологические характеристики определения хлорида методом ГИХ: диапазон линейности градуировочной зависимости 5-60 мг/л, угловой наклон 1.8 ± 0.3 , $r=0.999$, предел обнаружения 0.03 мг/л.

Таблица 14. Этапы эксперимента для измерения ёмкости колонок тремя способами

Способ	Заполнение заряженных центров неподвижной фазы	Вымывание ионов, не удерживаемых на заряженных центрах	Вытеснение ионов, удерживаемых на заряженных центрах	Метод анализа, определяемый ион
‘В’	20 мМ NaCl в деионизованной воде, в течение 1 ч при 1 мл/мин	деионизованная вода, в течение 1 ч или до стабилизации сигнала УФ-детектора при 1 мл/мин	10 мМ NaNO ₃ в деионизованной воде, в течение 30 мин (60 мин в случае колонки C5) при 1 мл/мин	ИХ Cl ⁻
‘В/А’	10 мМ NaNO ₃ в H ₂ O/CH ₃ CN 10/90 об.%	H ₂ O/CH ₃ CN 10/90 об.%	20 мМ NaCl в H ₂ O/CH ₃ CN 10/90 об.%	ГИХ NO ₃ ⁻
‘В/А-В’	20 мМ NaCl в H ₂ O/CH ₃ CN 10/90 об.%	градиентная перемывка колонки от H ₂ O/CH ₃ CN 10/90 об.% до 100% H ₂ O	10 мМ NaNO ₃ в деионизованной воде	ИХ Cl ⁻

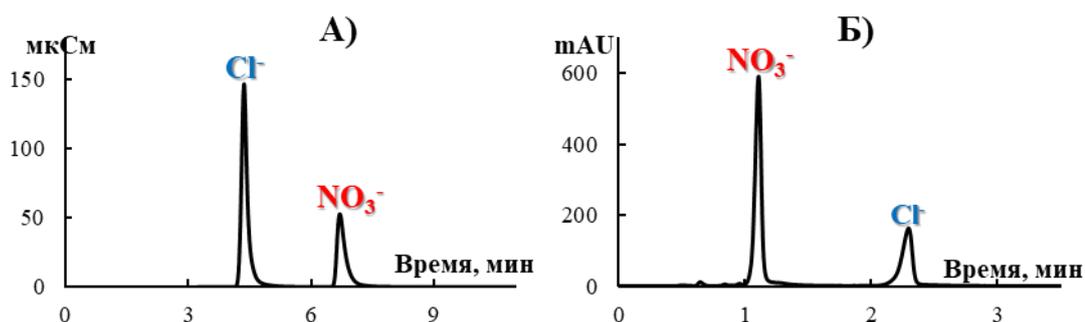


Рис. 13. Хроматограммы смесей нитрата и хлорида в режиме А) ионной и Б) гидрофильной хроматографии. Условия А): колонка IonPac AS22 (Thermo Scientific, размер колонки 250×4 мм), подвижная фаза: 4.5 мМ Na₂CO₃ + 1.4 мМ NaHCO₃, скорость потока 1.2 мл/мин, кондуктометрическое детектирование; Б): колонка C4 (Диасфер-110-амин, размер колонки 100×3 мм), подвижная фаза: 10 мМ фосфатный буферный раствор w/w рН 3.0 / ацетонитрил 20/80 об.%, скорость потока 1 мл/мин, УФ детектирование при 200 нм.

Проверку эффективности процесса вытеснения одного иона другим проводили путём поминутного сбора элюата в мерные колбы на 10.0 мл. Водные и водно-органические пробы доводили до метки, как указано выше. Проводили определение концентрации анионов соответствующим методом.

2.8. Подходы к обработке многомерных данных

Для обработки данных использовали Python 3.12 со следующими библиотеками: NumPy [124] (для работы с массивами и векторизованными

математическими функциями), Scipy [125] (построение дендрограмм и статистика), Pandas [126] (чтение и запись CSV файлов, изменение данных), Scikit-learn [127] (машинное обучение), Matplotlib [128] и Seaborn [129] (визуализация).

Кластеризацию методом К-средних (K-means) (доступна в sklearn.cluster.KMeans) использовали для разделения данных на предварительно заданное число кластеров. Для инициализации использовали алгоритм “K-means++” с 10 повторениями. Метод К-средних выбирает такие центры кластеров, что минимизируется сумма квадратов расстояний внутри кластера. Иерархический кластерный анализ (НСА, доступен в sklearn.cluster.AgglomerativeClustering) применяли с Евклидовым расстоянием и методом Уорда (Ward linkage). Метод Уорда был выбран, поскольку он лучше других подходит для плотных и разреженных кластеров разных размеров. Несмотря на то, что иерархический кластерный анализ и К-средних минимизируют дисперсию, это не значит, что конечные результаты обязательно совпадут. Полное совпадение обычно достигается в случае легко разделяющихся кластеров.

Перед кластеризацией данные вида объекты \times свойства (в данной работе неподвижные фазы \times коэффициенты селективности) центрировали и масштабировали, применяли метод главных компонент, после чего отбрасывали компоненты с наибольшими номерами. Центрирование заключается в вычитании средней величины из всех значений для каждого столбца (свойства):

$$x_{ik}^* = x_{ik} - \bar{x}_k \quad (28)$$

где i – индекс номера строки, k – столбца матрицы. Масштабирование служит для приведения данных к единичному стандартному отклонению для устранения различий размахов свойств. Эти процедуры подготовки данных необходимы для предотвращения искажений результатов их обработки. Автошкалирование объединяет центрирование и масштабирование:

$$x_{ik}^* = \frac{x_{ik} - \bar{x}_k}{s_k}, \text{ где } s_k = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_{ik} - \bar{x}_k)^2}{N - 1}} \quad (29)$$

В полученном пространстве Евклидово расстояние и расстояние Махаланобиса численно равны [130,131]. Однако, учитывая, что наборы данных содержат объекты из разных групп, лучше было бы рассчитать расстояние Махаланобиса отдельно для каждой из групп, выбирая разное количество главных

компонент. Реализация такого подхода является простой в случае обучения с учителем, однако для неразмеченных данных задача является крайне сложной. Несмотря на то, что в литературе представлены попытки применения такого подхода [132], описанные алгоритмы не были включены в широко известные библиотеки, такие как Scikit-learn. Поэтому в работе использовали проверенные и надежные подходы, которые обеспечили воспроизводимость результатов.

Для оценки количества кластеров без использования априорной информации использовали три разных метрики: индекс силуэта (silhouette score), индекс Калински-Харабаш (Calinski-Harabasz index) и индекс Дэвиса-Булдина (Davies-Bouldin index). Индекс силуэта (доступен в `sklearn.metrics.silhouette_score`) рассчитывали для каждой точки, используя уравнение $s=(b-a)/\max(a,b)$, где a – среднее расстояние между образцом и остальными точками класса, b – среднее расстояние между образцом и точками второго по близости кластера. Для четко очерченных кластеров значение s стремится к 1, для перекрывающихся – к 0. Индекс Дэвиса-Булдина служит для сравнения расстояния между кластерами с их размерами, чем ближе значение к 0, тем лучше разделены кластеры. Индекс Калински-Харабаш также использовали для оценки качества кластеризации, сравнивая межкластерную и внутрикластерную дисперсии. Чем больше полученное значение, тем лучше очерчены кластеры.

Исправленный индекс Рэнда (adjusted Rand index, доступен в `sklearn.metrics.adjusted_rand_score`) использовали для сопоставления двух вариантов кластеризации. Алгоритм сравнивает кластеры без учета меток, что удобно при постоянно меняющихся номерах кластеров. Для случайного разбиения результат близок к 0, если два варианта кластеризации полностью совпадают – к 1.0.

ГЛАВА 3. Разработка подходов для изучения независимого влияния компонентов подвижной фазы на удерживание тестовых веществ¹

Изучение влияния каждого параметра подвижной фазы на удерживание веществ позволяет получать ценную информацию о способах воздействия на селективность разделения сложных смесей. А с использованием специальных уравнений (11), (12), (14), (22), (23) и (24) можно делать выводы о механизмах удерживания, рассчитывать их количественный вклад в удерживание и предсказывать селективность в элюентах другого состава. Однако в обзоре литературных источников было отмечено, что, во многих исследованиях, во-первых, зачастую не учитывают влияние на удерживание одновременно изменяющихся параметров помимо варьируемого, и, во-вторых, проводят варьирование только при одном наборе параметров, что может приводить к неполноценным или искажённым трендам удерживания. В данной работе этим аспектам было уделено большое внимание с целью получения наиболее достоверных закономерностей удерживания веществ.

Таблица 15. Перечень одновременно изменяющихся параметров хроматографической системы при варьировании состава подвижной фазы и температуры колонки, составленный на основании анализа литературных источников

Варьируемый параметр	Одновременно изменяющийся параметр
pH	Концентрация элюирующего иона Природа буферного раствора
Тип буферного раствора	s_pH
Концентрация буферного раствора	Толщина водного слоя
Доля ацетонитрила	s_pK_a , s_pH Толщина водного слоя
Температура колонки	pK_a , pH^* Толщина водного слоя

* здесь и далее pK_a и pH , указанные без индексов, относятся как к водным, так и водно-органическим шкалам.

¹ 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:

Khrisanfova A., Smagina M., Maksimov G., Tsizin G., Shpigun O., Chernobrovkina A. Evaluating independent effect of mobile phase components on retention mechanism of ionizable analytes in hydrophilic interaction liquid chromatography // Journal of Chromatography A. 2025. V. 1758. 466201. EDN: IJYIKG.

Рассматривали все параметры хроматографической системы, кроме природы органического растворителя, в качестве которого использовали ацетонитрил. Из табл. 15 видно, что варьирование состава подвижной фазы и температуры колонки сопровождается изменением одного или нескольких параметров системы. В большинстве случаев устранить дополнительное влияние не представляется возможным, его необходимо учитывать при интерпретации закономерностей. Так, в случае варьирования доли ацетонитрила, часто проводимого для изучения механизмов удерживания веществ и селективности неподвижных фаз в ГИХ, несмотря на поддержание постоянным $w_p\text{pH}$ и концентрации элюирующего иона происходит изменение константы диссоциации слабых электролитов и итогового $w_p\text{pH}$ подвижной фазы. В случае варьирования pH, типа буферного раствора и концентрации элюирующего иона в данной работе были предложены способы его устранения, минимизации или учёта. Они были продемонстрированы на неподвижных фазах на основе силикагеля с разными функциональными группами (табл. 9 стр. 55). Поскольку некоторые способы предполагали сравнение удерживания тестовых веществ, то в первую очередь был выбран подходящий набор аналитов.

3.1. Выбор тестовых веществ

При выборе тестовых веществ руководствовались следующими критериями: высокая гидрофильность ($\log P$ или $\log D$ меньше 0), обеспечивающая приемлемые факторы удерживания в условиях ГИХ, и поглощение УФ излучения при $\lambda > 220$ нм, позволяющее использовать доступное хроматографическое оборудование и буферные растворы на основе карбоновых кислот в составе элюента. Для характеристики различных взаимодействий в хроматографической системе выбирали соединения, имеющие постоянный заряд в исследуемых условиях, а также слабые кислоты и основания. Первая группа веществ включала нейтральные аналиты (урацил, уридин, цитозин), которые фигурируют в существующих тестах для оценки гидрофильности неподвижных фаз [58,69,107], а также катионы (триметилфениламмоний хлорид TMPAC, тиамин) и анион (п-толуолсульфонат SPTS). TMPAC и SPTS были использованы в тесте Танака для оценки катионо- и анионообменных свойств сорбентов [69], тиамин – в работе [100] для классификации фаз, аналогичные четвертичные амины и сульфонаты применяли в работах

[21,24,70,75,133,134]. Бензойная кислота и бензиламин служили представителями слабых кислот и оснований. В набор тестовых веществ также были включены салициловая кислота и ксантин. Константы кислотности, $\log P$ и $\log D$ соединений представлены в табл. 11 на стр. 59.

3.2. Варьирование концентрации элюирующего иона

Как было рассмотрено в обзоре литературы, концентрация соли в подвижной фазе влияет на удерживание не только заряженных соединений, но и нейтральных. Во втором случае проявляемый эффект меньше по величине. Многие авторы связывают его с изменением объёма диффузного водного слоя на поверхности сорбента [20,21,54,76,93,135], что было подтверждено по увеличению соотношения объёмов фаз $\frac{V_W}{V_M}$ (уравнение (15) стр. 23) [43]. Таким образом, для заряженных аналитов увеличение концентрации элюирующего иона в подвижной фазе приводит не только к подавлению электростатических взаимодействий вещество-неподвижная фаза, но и возрастанию влияния механизма распределения, что особенно проявляется при высоких концентрациях [20,67]. Для того чтобы минимизировать эффект от изменения толщины водного слоя на удерживание заряженных соединений, в данной работе предложили проводить изучение механизма ионного обмена при достаточно низких концентрациях элюирующего иона из узкого диапазона (1-7.5 мМ в подвижной фазе). Проверкой стабильности ^spH в условиях хроматографического эксперимента, т.е. измерением ^spH подвижной фазы до и после колонки [23], показали, что буферные растворы с соответствующими концентрациями солей имеют достаточную буферную ёмкость (табл. 12). Для подтверждения того, что наблюдаемые изменения удерживания заряженных соединений вызваны именно воздействием на механизм ионного обмена, сравнивали полученные тренды с таковыми для нейтральных веществ, для которых проявления электростатических взаимодействий не ожидали.

3.3. Независимое варьирование рН

Варьирование рН подвижной фазы в гидрофильной хроматографии зачастую проводят с использованием аммонийно-ацетатного и/или аммонийно-формиатного буферных растворов $\text{HA}/\text{NH}_4\text{A}$ (табл. 5 стр. 36), которые широко распространены в данном методе за счёт высокой растворимости в присутствии ацетонитрила и

летучести, необходимой для совмещения с испарительными детекторами. Чаще в подвижную фазу добавляют именно буферные растворы для поддержания постоянной степени диссоциации групп сорбента и аналита и, следовательно, получения воспроизводимых времён удерживания. При этом процедуры приготовления буферных растворов в работах различаются или их описание отсутствует. Например, для создания требуемого рН с помощью аммонийно-ацетатного буферного раствора используют следующие варианты: 1) к ацетату аммония добавляют уксусную кислоту [91,136]; 2) к ацетату аммония добавляют соляную кислоту [18,19]; 3) к уксусной кислоте добавляют аммиак [29]. Добавляя кислоту или основание, доводят рН до нужного значения с использованием рН-метра. При этом концентрацию исходного реагента сохраняют постоянной для разных значений рН, которая в случае процедур 2) и 3) соответствует концентрации получаемого буферного раствора. Из этого вытекает проблема изменения концентрации аниона A^- в подвижной фазе, а также катиона NH_4^+ в способе 3), в зависимости от рН, которые могут играть роль элюирующих ионов и участвовать в процессе ионного обмена (уравнения (16), (19) стр. 25). Кроме того, стоит подчеркнуть, что важным аспектом является буферная ёмкость элюента, необходимая для получения воспроизводимых времен удерживания соединений, что приводит к применению нескольких буферных систем для варьирования рН в более широком диапазоне [23]. Таким образом, изучение влияния рН элюента на удерживание аналитов в гидрофильной хроматографии является достаточно сложной задачей, поскольку включает эффекты, вызванные изменением концентрации элюирующих ионов, типом буферного раствора, катионом аммония, а также высоким содержанием ацетонитрила. Эти эффекты рассмотрены в данном разделе и разделах 3.4 и 3.5.

Концентрация элюирующего иона и рН подвижной являются ключевыми факторами, влияющими на механизм ионного обмена. Увеличение концентрации приводит к сокращению времени удерживания заряженного аналита на сорбенте, уменьшение даёт обратный эффект. При фиксированной концентрации буферного раствора снижение рН уменьшает концентрацию элюирующего иона, что может накладываться на изменение степени диссоциации групп сорбента или аналита. Для демонстрации этого эффекта сравнили факторы удерживания тестовых ионов на

колонке С2, полученные при условии поддержания постоянным концентрации формиатного буферного раствора и формиат-иона, при разных рН (табл. 16). Сразу стоит отметить, что концентрацию элюирующего иона в подвижной фазе рассчитывали как произведение концентрации буферного раствора и мольной доли сопряжённого основания при определенном $w_p\text{pH}$ с учётом разбавления ацетонитрилом, т.е. предполагая, что в водно-ацетонитрильном растворе соотношение кислота/сопряженное основание сохраняется аналогично работам [10,13]. Однако оно может изменяться в приповерхностном слое сорбента за счёт преимущественного концентрирования заряженных частиц, степень которого во многом определяется их природой. Установить действующую концентрацию элюирующего иона не представляется возможным.

Таблица 16. Факторы удерживания ионов при разных рН, концентрациях элюирующего иона, буферного раствора и его природы. Условия: колонка С2, 90 об.% ацетонитрила в подвижной фазе, остальные условия указаны в таблице

Буферный раствор*	Концентрация буферного раствора в подвижной фазе, мМ	Рассчитанная концентрация элюирующего аниона $[A^-]$ в подвижной фазе, мМ**	k' (SPTS)	k' (салициловая кислота)	k' (тиамин)	k' (ТМРАС)
HCOOH/ HCOONa $w_p\text{pH}$ 2.85 $s_p\text{pH}$ 5.6	5	0.6	20.1	23.1	12.0	1.4
	22	2.5	5.4	6.4	22.5	2.7
HCOOH/ HCOONa $w_p\text{pH}$ 3.75 $s_p\text{pH}$ 6.6	5	2.5	3.8	5.2	23.5	3.5
MCAA/ MCANa $w_p\text{pH}$ 2.85 $s_p\text{pH}$ 5.6	5	2.5	10.2	11.6	10.3	1.4

* процедура приготовления буферного раствора описана в разделе 2.5.1.

** $[A^-] = \alpha_{A^-} \cdot c_{\text{буф}}$, где $\alpha_{A^-} = \frac{w_p K_a}{(w_p K_a + [H^+])}$, $w_p K_a$ муравьиной кислоты 3.75.

При изменении $w_p\text{pH}$ от 3.75 до 2.85 при постоянной концентрации буферного раствора, равной 5 мМ, факторы удерживания анионов возрастают практически в 5 раз, катионов – снижаются в 2 раза. Для сравнения при фиксированной концентрации формиата, равной 2.5 мМ, факторы удерживания ионов изменяются в значительно меньшей степени. Для подтверждения правильности поддержания постоянным именно концентрации элюирующего иона сравнили удерживание тестовых ионов в

формиатном и монохлорацетатном буферных растворах при w_pH 2.85. Как будет показано в разделе 3.4.2, монохлорацетат имеет меньшую элюирующую силу, чем формиат, следовательно, удерживание анионов в его присутствии выше при прочих равных условиях. Данная закономерность соблюдается при одинаковых концентрациях элюирующего иона.

При варьировании w_pH с использованием буферного раствора на основе одной кислоты в диапазоне от $w_pK_a - 1$ до $w_pK_a + 1$ при поддержании постоянной концентрации сопряженного основания концентрация кислоты изменяется на 2 порядка. Однако поскольку именно ионы буферного раствора влияют на механизм ионного обмена и толщину водного слоя, то такое изменение предпологаемо не должно искажать получаемые закономерности удерживания веществ. Для подтверждения гипотезы предложили подход для оценки влияния количества кислоты (уксусной, муравьиной) в подвижной фазе на механизм удерживания веществ. w_pH водной части элюента, равный 2.5, создавали с использованием 100 мМ натрий цитратного буферного раствора, в который вводили добавки кислот разной концентрации. В таких условиях уксусная кислота находится в молекулярной форме (w_pK_a 4.76), муравьиная (w_pK_a 3.75) диссоциирована примерно на 5%. Было показано, что добавление уксусной кислоты к водному буферному раствору в количестве от 2.5 до 500 мМ не влияет на факторы удерживания тестовых веществ

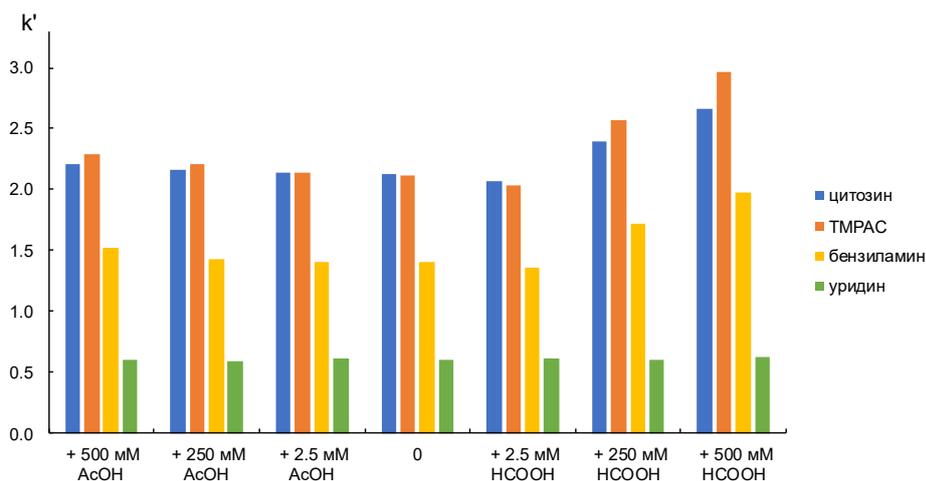


Рис. 14. Влияние количества добавленной уксусной и муравьиной кислоты на факторы удерживания цитозина, уридина, бензиламина и ТМРАС на немодифицированном силикагеле С1. Условия: 100 мМ натрий цитратный буферный раствор w_pH 2.5 + указанная на графике добавка кислоты / ацетонитрил 10/90 об.%, s_pH 3.8-4.0.

на немодифицированном силикагеле в ГИХ (рис. 14), что подтверждает гипотезу. При добавлении 2.5 мМ муравьиной кислоты изменений также не наблюдали. Однако при введении 250 и 500 мМ был отмечен рост факторов удерживания оснований, а также уменьшение ^spH с 4.0 до 3.8, по-видимому, связанные с большей силой муравьиной кислоты.

Таким образом, для приготовления буферных растворов с требуемым ^wpH выбрали способ добавления основания к определенному количеству слабой кислоты. Концентрацию кислоты рассчитывали, исходя из требуемой равновесной концентрации элюирующего иона: $c_{\text{к-ты}} = c_{\text{буф}} = [\text{M}]/\alpha_{\text{A}^-}$.

3.4. Оценка влияния природы буферного раствора

Поскольку варьирование pH подвижной фазы и типа буферного раствора тесно связаны, то далее рассматривали влияние природы катиона и аниона буферного раствора на удерживание тестовых веществ с двух позиций для оценки влияния одного параметра при изменении другого. Изучали только буферные растворы на основе карбоновых кислот HA/A^- с разными катионами.

3.4.1. Влияние катиона буферного раствора

Для оценки влияния катиона буферного раствора (NH_4^+ , Na^+ , K^+) на удерживание тестовых веществ использовали ацетатный буферный раствор ^wpH 4.76 фиксированной концентрации (50 мМ в водной составляющей элюента) при 90 об.% ацетонитрила в подвижной фазе. Эффект рассматривали на немодифицированном силикагеле С1 и его производном с привитым эремомицином (С2). В обоих случаях было отмечено, что в присутствии катионов натрия и калия тестовые вещества имеют близкие факторы удерживания (табл. 17), что согласовалось с наблюдениями в работе [94]. Однако по сравнению с аммонийно-ацетатным буферным раствором селективность разделения и удерживание существенно отличались (Приложение 1).

Во-первых, при добавлении 90 об.% ацетонитрила к аммонийно-ацетатному буферному раствору с $^w\text{pH} = ^w\text{pK}_a(\text{AcOH}) = 4.76$ равновесие $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+$, полностью смещенное в сторону аммония в водном растворе ($^w\text{pK}_a(\text{NH}_4^+)$ 9.25), смещается в сторону продуктов [18]. Это вызвано влиянием органического растворителя на константы диссоциации слабых кислот. Значения $^s\text{pK}_a$ при 90 об.%

Таблица 17. Влияние катиона буферного раствора (NH_4^+ , Na^+ , K^+) на удерживание тестовых соединений на немодифицированном силикагеле С1 и неподвижной фазе С2. Условия: 50 мМ ацетатный буферный раствор w_pH 4.76 / CH_3CN 10/90 об.% (s_pH приведен в таблице), размер колонки 50×3 мм (С2) и 100×3 мм (С1), скорость потока 0.5 мл/мин (С2) и 1.0 мл/мин (С1), УФ детектирование при 254 нм

Катион	NH_4^+	Na^+		K^+		
w_pH	7.8	8.3		8.3		
	k'	k'	$\%(\text{NH}_4^+ - \text{Na}^+)^*$	k'	$\%(\text{NH}_4^+ - \text{K}^+)$	$\%(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$
Немодифицированный силикагель С1**						
Урацил	0.57	0.67	17	0.67	17	0
Уридин	0.92	1.17	27	1.19	30	2
Цитозин	3.18	3.31	4	3.17	0	-4
Бензойная кислота	1.17	1.36	17	1.52	30	11
Ксантин	1.10	1.51	37	1.53	39	2
ТМРАС	22.39	18.42	-18	16.52	-26	-10
Неподвижная фаза С2						
Урацил	2.80	2.96	6	2.91	4	-2
Уридин	4.97	5.37	8	5.25	6	-2
Цитозин	21.79	22.30	2	22.01	1	-1
SPTS	2.68	1.79	-33	1.54	-42	-14
Бензойная кислота	11.46	9.31	-19	8.49	-26	-9
Ксантин	19.73	26.16	33	24.19	23	-8
ТМРАС	5.12	6.05	18	6.44	26	6
Тиамин	32.23	38.72	20	42.47	32	10

* $\%(\text{NH}_4^+ - \text{Na}^+) = (k'(\text{вещества в присутствии } \text{Na}^+) - k'(\text{вещества в присутствии } \text{NH}_4^+)) / k'(\text{вещества в присутствии } \text{NH}_4^+) \cdot 100\%$. $\%(\text{NH}_4^+ - \text{K}^+)$ и $\%(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ были рассчитаны аналогично.

** SPTS на силикагеле не удерживается, тиамин удерживается более 60 мин.

ацетонитрила, измеренные способом, описанным в разделе 2.6, составили: 8.3 и 8.1 для уксусной кислоты и аммония, соответственно. В результате происходит отклонение s_pH аммонийно-ацетатного буферного раствора в сторону меньших значений (табл. 17), а также снижение равновесных концентраций ионов (аммония и ацетата) по сравнению с таковыми для натрий или калий ацетатных буферных растворов.

Во-вторых, катионы NH_4^+ , Na^+ и K^+ имеют различную элюирующую силу, что может оказывать влияние на удерживание тестовых катионов на отрицательно заряженной фазе (например, силикагеле). При этом отмечают, что она выше у Na^+ , чем у аммония в ГИХ [136]. Различия факторов удерживания ионов (ТМРАС, тиамин, SPTS) и бензойной кислоты в присутствии Na^+ и K^+ , по-видимому,

являются следствием их разной элюирующей силы, поскольку удерживание нейтральных соединений совпадает.

В случае силикагеля сочетание описанных факторов ожидаемо должно приводить к большему удерживанию катиона в присутствии аммонийно-ацетатного буферного раствора, что согласуется с полученными данными для ТМРАС (табл. 17). Стоит подчеркнуть, что наблюдаемые эффекты от катиона буферного раствора невозможно было бы объяснить без привлечения водно-органической шкалы ^spH , что служит в пользу её применения в условиях гидрофильной хроматографии. Таким образом, несмотря на преимущества использования буферных растворов, содержащих аммоний, для устранения эффектов, возникающих из-за его диссоциации в диапазоне ^wpH от 7 до 9, необходима его замена на катион щелочного металла для более точного контроля концентрации элюирующего иона при разных pH . В данной работе выбрали Na^+ .

3.4.2. Влияние основы буферного раствора

Эффект от варьирования кислоты-основы буферного раствора является комплексным, поскольку анионы (сопряжённые основания) могут способствовать или препятствовать образованию водородных связей между аналитом, растворителем и неподвижной фазой, характеризуются различной элюирующей силой и ион-парными свойствами по отношению к веществам основного характера [23,76,93,94]. Он также сопровождается изменением толщины водного слоя.

В данной работе ^wpH водной компоненты элюента создавали, используя буферные растворы на основе доступных карбоновых кислот: монохлоруксусной, муравьиной, уксусной и пропионовой (табл. 18). Рабочий диапазон ^wpH составил 2.85-5.76, что входит в границы гидролитической устойчивости неподвижных фаз на основе силикагеля, а также удовлетворяет требованиям к наличию буферной ёмкости подвижных фаз. Стоит подчеркнуть, что, во-первых, разница между ^spH водно-ацетонитрильной смеси и ^wpH зависит от кислоты, что влияет на ширину диапазона ^spH . Во-вторых, различия между значениями ^spH буферных растворов на основе одной кислоты (уксусной или муравьиной) близки к таковым между соответствующими ^wpH , что служит аргументом в пользу корректности предположения о сохранении соотношения концентраций кислота/сопряжённое основание после добавления ацетонитрила.

Таблица 18. Буферные растворы типа HA/NaA, используемые в данной работе, их $w_p\text{pH}$ и $s_p\text{pK}_a(\text{HA})$, измеренные в присутствии 85 и 90 об.% ацетонитрила

Буферный раствор	$w_p\text{pH}$	$s_p\text{pH}$ (90 об.% CH_3CN)	$s_p\text{pH}$ (85 об.% CH_3CN)
моноклорацетатный	2.85 ($w_p\text{pK}_a$)	5.6 ($s_p\text{pK}_a$)	5.2 ($s_p\text{pK}_a$)
формиатный	2.85	5.6	5.1
	3.25	6.1	—
	3.75 ($w_p\text{pK}_a$)	6.6 ($s_p\text{pK}_a$)	6.1 ($s_p\text{pK}_a$)
	4.00	6.9	—
	4.25	7.3	—
	4.50	7.5	—
ацетатный	4.75	7.8	—
	3.76	7.1	6.5
	4.00	7.3	—
	4.26	7.6	—
	4.50	7.9	—
	4.76 ($w_p\text{pK}_a$)	8.3 ($s_p\text{pK}_a$)	7.7 ($s_p\text{pK}_a$)
пропионатный	5.76	9.3	8.7
	4.88 ($w_p\text{pK}_a$)	8.7 ($s_p\text{pK}_a$)	8 ($s_p\text{pK}_a$)

Для того чтобы оценить влияние природы основы буферного раствора на удерживание тестовых веществ при варьировании pH, желательно сначала рассмотреть его при фиксированном значении pH. Но как было отмечено выше, буферные растворы с одинаковым $w_p\text{pH}$ зачастую имеют разные значения $s_p\text{pH}$, что может давать дополнительный эффект на удерживание аналитов и усложнять интерпретацию трендов [76]. Однако было обнаружено, что $s_p\text{pH}$ водно-ацетонитрильных смесей в присутствии формиатного и моноклорацетатного буферных растворов ($w_p\text{pH}$ 2.85) совпадали (табл. 18, рис. 15).

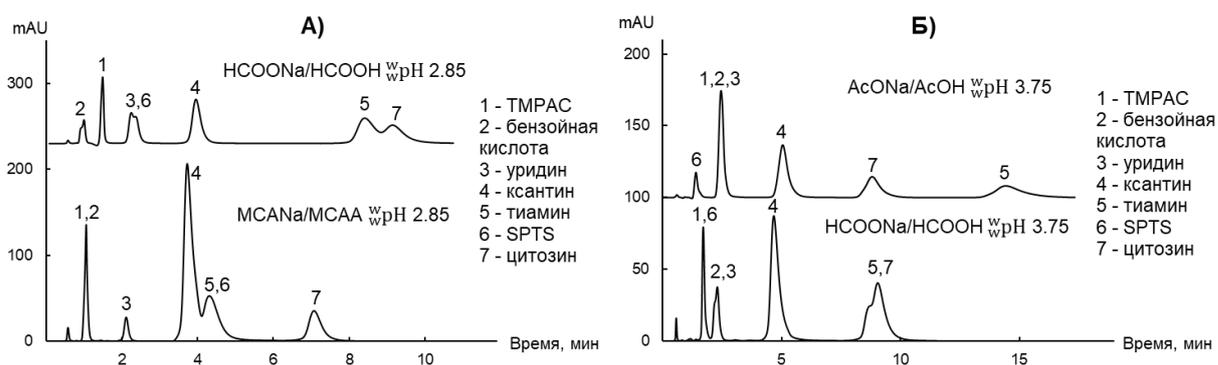


Рис. 15. Влияние природы буферного раствора на селективность разделения на колонке C2 (размер колонки 50×3 мм). А) 224 мМ $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w_p\text{pH}$ 2.85 / CH_3CN 10/90 об.% ($s_p\text{pH}$ 5.6), 50 мМ MCANa/MCAA $w_p\text{pH}$ 2.85 / CH_3CN 10/90 об.% ($s_p\text{pH}$ 5.6); Б) 275 мМ AcONa/AcOH $w_p\text{pH}$ 3.75 / CH_3CN 10/90 об.% ($s_p\text{pH}$ 7.1), 50 мМ $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w_p\text{pH}$ 3.75 / CH_3CN 10/90 об.% ($s_p\text{pH}$ 6.6). Концентрация элюирующего иона в подвижной фазе 2.5 мМ; скорость потока 0.5 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.

Хроматограммы модельной смеси, иллюстрирующие влияние природы кислоты на селективность разделения на колонке С2 при постоянной концентрации элюирующего иона 2.5 мМ в подвижной фазе, представлены на рис. 15. Времена удерживания уридина и ксантина, находящихся в нейтральной форме при данных условиях, не изменялись при замене муравьиной кислоты на монохлоруксусную, тогда как было отмечено увеличение или уменьшение удерживания остальных соединений в зависимости от их заряда. Поэтому проводили количественную оценку влияния электростатических взаимодействий на их удерживание в присутствии формиатного и монохлорацетатного буферного раствора с использованием билогарифмической модели $\log k' - \log [M]$ (уравнение (23) стр. 26), варьируя концентрацию элюирующего иона в подвижной фазе (рис. 16). Большой вклад ионного обмена в удерживание бензойной кислоты и SPTS, показанный по величине углового коэффициента зависимости, был продемонстрирован для элюента, содержащего монохлорацетат. Данное наблюдение согласуется с результатами исследования Альперта [93], что большая концентрация хаотропа (в данном случае монохлорацетата) необходима для обеспечения аналогичной космотропу (формиату) концентрации в адсорбированном водном слое.

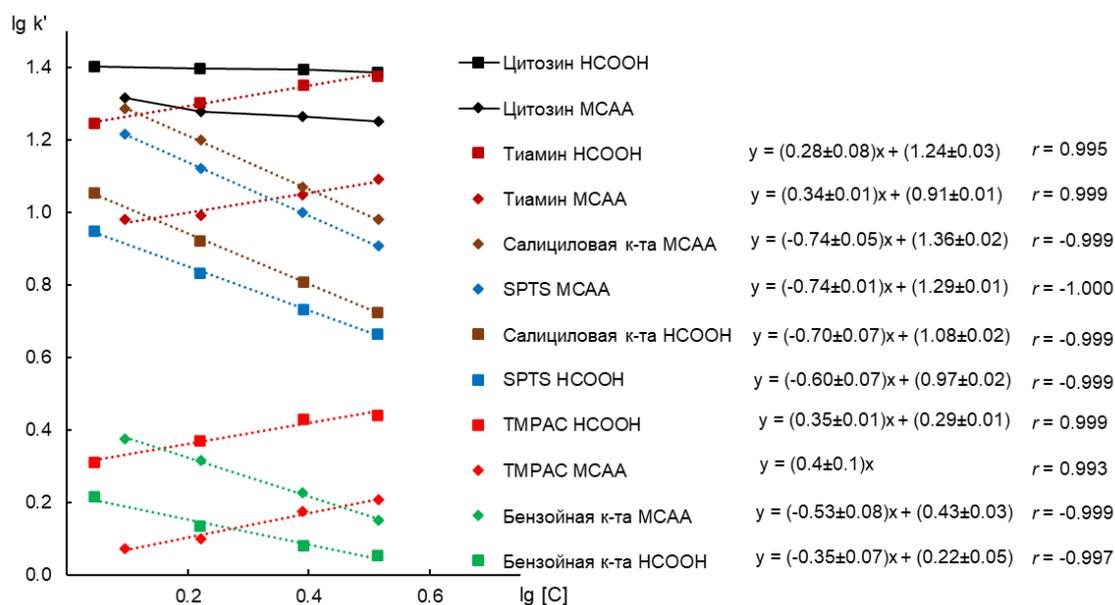


Рис. 16. Зависимости факторов удерживания заряженных соединений от концентрации элюирующего аниона в подвижной фазе. Условия: неподвижная фаза С2 (размер колонки 50×3 мм); маркеры в форме квадратов: HCOONa/HCOOH w/w рН 2.85 / CH₃CN 10/90 об.% (s_p рН 5.6), в форме ромбов: MCANa/MCAA w/w рН 2.85 / CH₃CN 10/90 об.% (s_p рН 5.6). Диапазон концентрации элюирующего аниона в подвижной фазе: 1-3.5 мМ. Скорость потока 0.5 мл/мин, УФ-детектирование при 254 нм. $n=4$, $P=0.95$.

Концентрация буферного раствора оказывала меньшее влияние на удерживание катионов (тиамина и ТМРАС) по сравнению с анионами, сопоставимое по величине для двух буферных растворов (рис. 16). Однако факторы удерживания катионов были ниже в присутствии монохлорацетата, что, по-видимому, было вызвано образованием ионных пар, имеющих меньшую гидрофильность, чем свободный аналит [23], в сочетании с меньшим экранированием заряда сорбента противоионами. Аналогичный тренд наблюдали на немодифицированном силикагеле. Удерживание цитозина также было меньше в подвижной фазе, содержащей монохлорацетат, при этом оно сохранялось практически постоянным при разных концентрациях элюирующего иона. Несмотря на предположение о протонировании цитозина в условиях ГИХ, используемое в работах [69,76,93], данные наблюдения свидетельствуют об отсутствии электростатического отталкивания при ^wpH 2.85 (^spH 5.6) и наличии водородных связей между цитозином и неподвижной фазой [93]. Первое заключение подкрепляется снижением силы основания в присутствии ацетонитрила $^s\text{p}K_a(\text{BH}^+) < ^w\text{p}K_a(\text{BH}^+)$ (4.4), ^spH (5.6) $>$ ^wpH (2.85) [25], вероятно, $^s\text{p}K_a(\text{BH}^+)$ имеет значение ~ 4 , а второе – хаотропными свойствами монохлорацетата, т.е. противодействию образованию водородных связей.

В результате замены формиатного буферного раствора на ацетатный при ^wpH 3.75 также происходит изменение селективности разделения модельной смеси тестовых соединений (рис. 15). Однако ^spH соответствующих подвижных фаз отличается, что может накладываться на эффект от изменения природы кислоты-основы. Для проверки влияния данных буферных растворов предложили сравнивать факторы удерживания тестовых веществ, полученные в присутствии формиата и ацетата в одинаковом диапазоне ^wpH 3.75-4.76, в котором обеспечивается достаточная буферная ёмкость в элюенте. На немодифицированном силикагеле было показано, что факторы удерживания катионов и слабых оснований в большинстве случаев в перекрывающемся диапазоне ^spH на 10-20 % выше в ацетатном буферном растворе (рис. 17). Аналогичная закономерность была отмечена для нейтральных соединений и ксантина. В случае бензойной кислоты вывод зависел от того, по какой шкале (^wpH или ^spH) проводится сравнение. При этом общий тренд изменения фактора удерживания от pH не зависел от природы используемого буферного

раствора. Из этого можно предположить, что различия в удерживании связаны с большей адсорбцией воды на поверхности сорбента в присутствии ацетата, влияющей на удерживание аналитов.

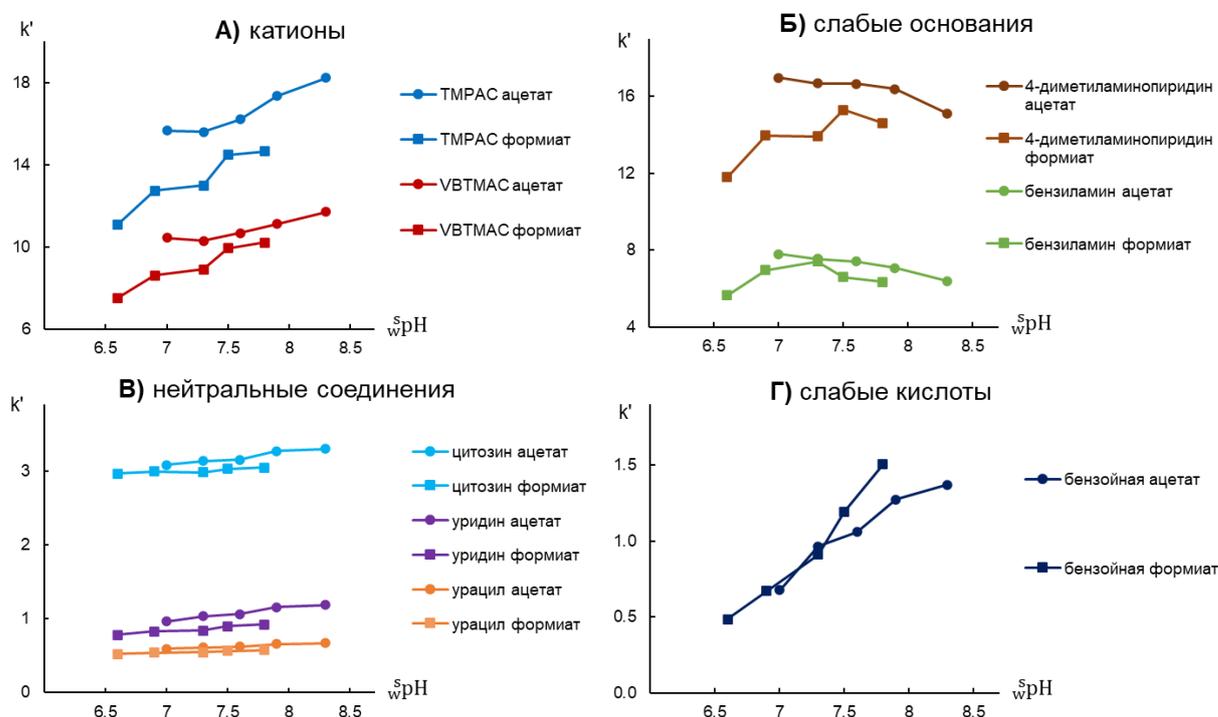


Рис. 17. Сравнение факторов удерживания А) катионов, Б) слабых оснований, В) нейтральных соединений и Г) слабых кислот на немодифицированном силикагеле S1, полученных в присутствии ацетатного (круглые маркеры) и формиатного (квадратные маркеры) буферных растворов с w_pH 3.75-4.76. Условия: $AcONa/AcOH$ или $HCOONa/HCOOH$ w_pH 3.75-4.76 / CH_3CN 10/90 об.% (s_pH 7-8.3 или 6.6-7.8, соответственно). Концентрация элюирующего иона в подвижной фазе 2.5 мМ; скорость потока 1 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.

Поскольку изучение независимого влияния природы буферного раствора на удерживание тестовых веществ не всегда возможно, то предложили его оценивать по совокупной характеристике, отражающей средство анионов к неподвижной фазе. Для этого необходимо определить их собственное удерживание на сорбенте [137] в условиях ГИХ. Выбрали состав подвижной фазы: 10 мМ калий фосфатный буферный раствор w_pH 7.0 / ацетонитрил 20/80 об.% (w_pH 9.0), обеспечивающий нахождение кислот преимущественно в анионной форме, хорошую форму пиков и возможность их детектирования при длине волны 200 нм. Из-за плохой растворимости фосфата в присутствии ацетонитрила снижение доли воды в подвижной фазе приводит к уменьшению концентрации буферного раствора в элюенте (<1 мМ) и, следовательно, буферной ёмкости, что негативно сказывается на эффективности и асимметрии пиков.

На шести неподвижных фазах на основе силикагеля с различными функциональными группами наименьшее удерживание было отмечено для монохлорацетата, а наибольшее – для ацетата (табл. 19, хроматограммы приведены в Приложении 2). Коэффициент селективности пары формиат/пропионат для сорбентов с выраженными анионообменными свойствами имел значения 1.2-1.4, в остальных случаях был близок к 1 (0.9 - 1.1).

Таблица 19. Сравнение сродства анионов к неподвижным фазам на основе силикагеля с различными функциональными группами по абсолютным и относительным факторам удерживания. Условия: 10 мМ калий фосфатный буферный раствор $w\text{pH}$ 7.0 / ацетонитрил 20/80 об.% ($s\text{pH}$ 9.0)

k' (α)	Силикагель (C1)	Диол (C3)	Аминопропил (C4)	Полиамин (C5)	C6	C2
МСАА pKa 2.85 log D -1.32*	0.15 (1)**	0.08 (1)	0.66 (1)	0.89 (1)	2.07 (1)	0.74 (1)
НСООН pKa 3.75 log D -4.29	0.66 (4.5)	0.36 (4.7)	1.80 (2.7)	2.16 (2.4)	3.05 (1.5)	1.15 (1.6)
АсОН pKa 4.76 log D -4.07	0.98 (6.7)	0.57 (7.4)	2.25 (3.4)	2.35 (2.6)	3.08 (1.5)	1.63 (2.2)
C ₂ H ₅ COOH pKa 4.88 log D -3.56	0.62 (4.2)	0.38 (4.9)	1.47 (2.2)	1.55 (1.7)	2.53 (1.2)	1.29 (1.8)
NO ₃ ⁻	<0.14	–	–	0.53	1.70	–

* log D рассчитан для аниона в программе ACD/Labs 12.01; ** в скобках приведен коэффициент селективности по отношению к монохлорацетату.

Различия в удерживании анионов были вызваны влиянием их гидрофильности и адсорбции на неподвижных фазах. Данные факторы влияют на удерживание тестовых веществ в присутствии соответствующих буферных растворов. Для случая неподвижных фаз с анионообменными свойствами большее сродство аниона буферного раствора свидетельствует о его большей элюирующей силе [94]. Как было показано для сорбента С2 (рис. 16) п-толуолсульфонат SPTS, салициловая и бензойная кислота удерживаются дольше в присутствии монохлорацетата, чем формиата при одинаковой концентрации элюирующего иона, что согласуется с большим сродством последнего к неподвижной фазе. Для сорбентов с катионообменными свойствами влияние, вероятно, проявляется за счёт изменения количества адсорбированной воды, определяющего механизм распределения сильнополярных нейтральных и заряженных соединений. Чем больше сродство, тем

больше концентрация ионов буферного раствора в приповерхностном водном слое. Иллюстрацией является большее удерживание тестовых веществ в присутствии ацетата на силикагеле (рис. 17). Однако за счёт концентрирования в водном слое и возможной адсорбции на поверхности силикагеля ацетат может влиять на ионный обмен на заряженных группах сорбента. Для проверки данной гипотезы для сравнения изучали данный механизм удерживания в присутствии нитрата (см. раздел 4.1.1). Однако на основании относительного удерживания анионов буферных растворов невозможно предположить образование ионных пар с катионами или влияние на водородные связи аналит-неподвижная фаза. Данные выводы можно сделать лишь по отклонению удерживания тестовых веществ от общего тренда удерживания при варьировании pH [18,23].

Таким образом, выбраны буферные системы на основе муравьиной, уксусной, монохлоруксусной и пропионовой кислот для варьирования ^wpH подвижной фазы в условиях гидрофильной хроматографии в диапазоне от 2.85 до 5.76. Предложены подходы к учёту одновременного влияния природы буферного раствора на профили удерживания веществ.

3.5. Уточнение процедуры варьирования pH

Учитывая рассмотренные выше эффекты, для получения более достоверных закономерностей удерживания тестовых веществ при варьировании pH необходимо соблюдать следующие условия:

- 1) поддерживать постоянным концентрацию элюирующего иона;
- 2) заменить катион буферного раствора NH_4^+ на Na^+ ;
- 3) использовать каждую буферную систему в диапазоне ^wpH от $^w\text{pK}_a - 1$ до $^w\text{pK}_a + 1$;
- 4) предварительно оценивать сродство анионов буферных систем к неподвижной фазе по их собственному удерживанию и учитывать при интерпретации трендов;
- 5) измерять ^spH раствора, соответствующего по составу подвижной фазе.

Из данных, рассмотренных в разделе 3.4, следует, что использование водно-органической шкалы ^spH предпочтительнее, чем ^wpH , особенно в случае интерпретации закономерностей слабых оснований, несмотря на ограниченную информацию о константах кислотности соединений $^s\text{pK}_a$.

Заключение из главы 3

В данной главе представлены рекомендации для сокращения нежелательного влияния одновременно изменяющихся параметров при варьировании концентрации элюирующего иона, рН и природы буферного раствора. Рекомендован способ приготовления буферных растворов, заключающийся в добавлении основания к определенному количеству слабой кислоты до заданного ^wpH , концентрация которой соответствует требуемой равновесной концентрации элюирующего иона: $c_{\text{к-ты}} = c_{\text{буф}} = [\text{M}]/\alpha_{\text{A-}}$. Показано влияние природы катиона и аниона буферного раствора на факторы удерживания, селективность разделения и механизм удерживания веществ разных кислотно-основных свойств. Суммированы основные принципы варьирования рН, соблюдение которых необходимо для получения более корректных закономерностей удерживания, на основании которых можно точнее судить о свойствах неподвижных фаз в условиях гидрофильной хроматографии.

ГЛАВА 4. Изучение механизмов и закономерностей удерживания тестовых веществ²

Закономерности удерживания тестовых веществ в различных условиях позволяют получить подробную информацию о свойствах неподвижных фаз. В данной работе устанавливали механизмы удерживания соединений при независимом варьировании концентрации элюирующего иона, рН подвижной фазы, содержания ацетонитрила и температуры колонки, как было описано в главе 3, при нескольких комбинациях фиксированных параметров.

Данный подход применили для характеристики неподвижных фаз на основе силикагеля с разнообразными функциональными группами. Наибольшее внимание уделили изучению свойств матрицы – немодифицированному силикагелю, влияние которой за счёт остаточных силанольных групп проявляется для всех фаз, полученных на её основе [21,69]. Набор тестовых соединений (см. раздел 3.1) был расширен (табл. 11 стр. 59) для того, чтобы нивелировать влияние их специфических взаимодействий с сорбентом и установить связь силы электролита и его удерживания. Также провели подробное изучение закономерностей удерживания на силикагеле с привитым эремоницином, перспективы применения которого в методе гидрофильной хроматографии были показаны в работе [117]. Закономерности удерживания тестовых веществ при варьировании рН и концентрации элюирующего иона на данных сорбентах сравнивали с таковыми, полученными на неподвижных фазах с диольными, аминопропил, полиамин и гиперразветвленными цвиттер-ионными функциональными слоями.

4.1. Силикагель

Несмотря на популярность силикагеля в ВЭЖХ и в гидрофильной хроматографии, в частности, в описании его свойств до сих пор имеются пробелы и разногласия. Поверхность силикагеля достаточно сложная, она содержит

² 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:

Shemiakina A., Xie A., Maksimov G., Chernobrovkina A. Effect of mobile phase pH and counterion concentration on retention and selectivity for a diol column in hydrophilic interaction liquid chromatography // LCGC International. 2024. P. 8-18. EDN: VJZWHR.

Максимов Г.С., Шемякина А.О., Ужель А.С., Чернобровкина А.В. Изучение хроматографических свойств разработанного гиперразветвленного цвиттер-ионного сорбента на основе силикагеля в режиме гидрофильной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2024. Т. 24. № 3. С. 304-320. EDN: VJYUTA.

силанольные группы Si-OH нескольких типов (изолированные, вицинальные, геминальные), а также силоксановые связи Si-O-Si. Известно, что основную роль в удерживании аналитов играют полярные силанолы [138], которые взаимодействуют с молекулами воды или функциональными группами органических соединений за счёт водородных связей или неспецифических сил, а также диссоциируют при повышении pH, обеспечивая катионообменный механизм удерживания [139], тогда как силоксановые группы проявляют гидрофобные свойства. Имеются разные оценки средних или диапазонов величин констант кислотности силанолов, в основном отражающие начало диссоциации при $\text{pH} \sim 2$ [138]. Однако в среде с высоким содержанием ацетонитрила может происходить их изменение, влияющее на свойства сорбента. Кроме того, в условиях гидрофильной хроматографии силикагель адсорбирует воду из элюента, толщина слоя которой была оценена в 0.25-0.29 нм [40], что соответствует монослою молекул. Имея наименьшую толщину слоя среди сорбентов, предназначенных для ГИХ, на силикагеле всё равно демонстрируют удерживание аналитов за счёт распределения наряду с адсорбцией [24,134]. Существующие исследования по изучению механизма удерживания на силикагеле в гидрофильной хроматографии не дают полного представления о влиянии тех или иных параметров системы на вклады механизмов удерживания.

4.1.1. Закономерности для веществ с постоянным зарядом

Для того чтобы проследить, как параметры хроматографической системы влияют на свойства сорбента, предпочтительнее использовать вещества с постоянным зарядом. Механизм ионного обмена оценивали по удерживанию четвертичных аминов триметилфениламмоний хлорида ТМРАС и 4-винилбензилтриметиламмоний хлорида ВВТМАС. Соотношение вкладов механизмов распределения и адсорбции в удерживание аналитов устанавливали по соединениям, находящимся в нейтральной форме в исследуемых условиях с учётом уменьшения силы слабых кислот и оснований в присутствии ацетонитрила: урацила, уридина, 2'-дезоксинуридина, цитозина, гуанозина, рибофлавина (табл. 11 стр. 59).

4.1.1.1. Варьирование концентрации элюирующего иона при разных pH

Поскольку свойства силикагеля во многом определяются степенью диссоциации силанольных групп, то сначала проводили изучение закономерностей удерживания тестовых веществ при различных pH. С увеличением pH подвижной

фазы, содержащей 90 об.% ацетонитрила и 2.5 мМ элюирующего иона Na^+ , было показано постепенное увеличение факторов удерживания катионов (рис. 18А). При этом анионы сильных сульфокислот (SPTS и SPSS) практически не удерживались. Указанные тренды свидетельствовали о постепенной диссоциации силанольных групп силикагеля. Выпадающие точки (незакрашенные маркеры), полученные в присутствии монохлорацетата и пропионата, вероятно, являются следствием образования ионных пар с четвертичными аминами.

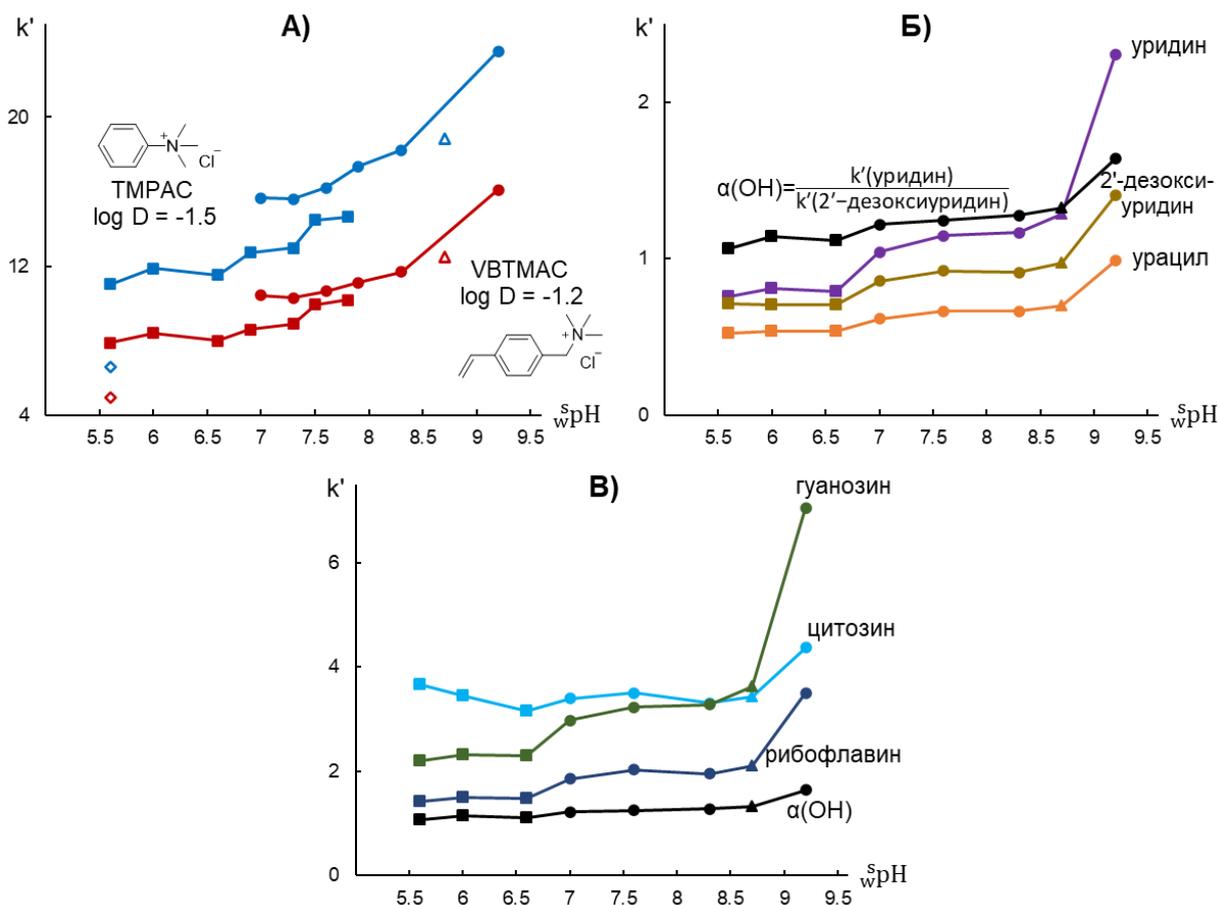


Рис. 18. Зависимости факторов удерживания А) катионов, Б) и В) нейтральных соединений и гидроксильной селективности $\alpha(\text{OH})$ от pH подвижной фазы на немодифицированном силикагеле С1. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%; буферный раствор (форма маркера): $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ (квадрат), AcONa/AcOH (круг), MCANa/MCAA (ромб), $\text{C}_2\text{H}_5\text{COONa}/\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$ (треугольник), диапазон pH 2.85-5.76. Концентрация элюирующего иона Na^+ в подвижной фазе 2.5 мМ; скорость потока 1 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.

Диссоциация силикагеля сопровождалась небольшим увеличением факторов удерживания для большинства нейтральных соединений в диапазоне pH от 5.6 до 8.7 (pH 2.85-4.88), в том числе связанное с изменением природы буферного раствора, тогда как при переходе к pH 9.2 (pH 5.76) факторы удерживания возрастали практически в 2 раза (рис. 18Б,В). Можно предположить, что увеличение

заряда неподвижной фазы приводит к увеличению адсорбции воды на её поверхности, в которой удерживаются полярные соединения, как упоминалось в работе [75]. Это было проиллюстрировано по возрастанию от 1.06 до 1.64 параметра $\alpha(\text{OH})$, коррелирующего с толщиной водного слоя (рис. 10 стр. 44 [104]), и соотношения объёмов фаз $\frac{V_W}{V_M}$ (уравнение (15) стр. 23) от 0.065 до 0.094 с увеличением pH подвижной фазы.

Абсолютные величины факторов удерживания как катионов, так и нейтральных веществ в большинстве случаев согласовались с их гидрофильностью (табл. 11 стр. 59): чем меньше $\log P$ или $\log D$, тем выше удерживание, что отражает влияние механизма распределения между элюентом и приповерхностным водным

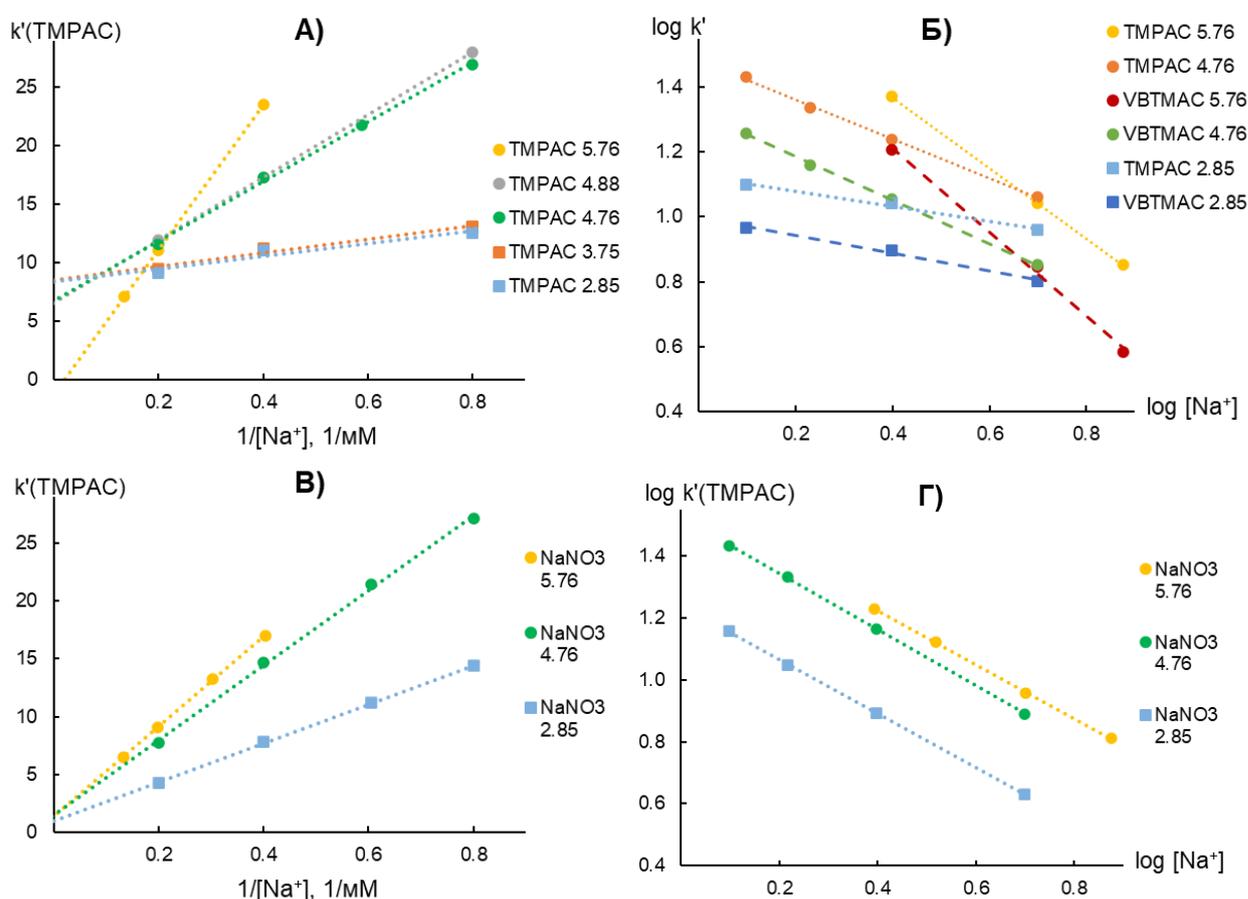


Рис. 19. Зависимости фактора удерживания катионов на немодифицированном силикагеле С1 от концентрации элюирующего иона в подвижной фазе в координатах $k'-1/[\text{Na}^+]$ (А, В) и $\log k'-\log [\text{Na}^+]$ (Б, Г) при разных pH . Условия А), Б): буферные растворы $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ w/pH 2.85, $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ w/pH 3.75, AcONa/AcOH w/pH 4.76, $\text{C}_2\text{H}_5\text{COONa}/\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$ w/pH 4.88, AcONa/AcOH w/pH 5.76; 90 об.% ацетонитрила, диапазон концентраций Na^+ в элюенте 1.25-7.5 мМ. Условия В), Г): NaNO_3 /ацетонитрил 10/90 об.%, диапазон концентраций NaNO_3 в элюенте 1.25-7.5 мМ, предварительное уравнивание колонки буферными растворами $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ w/pH 2.85, AcONa/AcOH w/pH 4.76, AcONa/AcOH w/pH 5.76.

слоем на удерживание. Из данной закономерности выбивался цитозин, селективность которого по отношению к гуанозину менялась с увеличением рН, что, вероятно, связано с большим вкладом адсорбции в его удерживание.

Для выяснения влияния рН на механизм удерживания тестовых веществ проводили варьирование концентрации элюирующего иона Na^+ от 1.25 до 5 мМ при разных рН подвижной фазы (табл. 12 стр. 62). В случае ацетатного буферного раствора $w\text{pH}$ 5.76 концентрации были увеличены для обеспечения приемлемой буферной ёмкости, что соответствовало 2.5-7.5 мМ Na^+ в элюенте. Для катионов результаты представляли в двух формах: $k'-1/[\text{Na}^+]$ и $\log k'-\log [\text{Na}^+]$ (уравнения (22), (23) стр. 26). Данные зависимости во всех условиях были линейны, что подтверждало реализацию ионного обмена (рис. 19А,Б, табл. 20). С увеличением

Таблица 20. Угловые коэффициенты, свободные члены и коэффициенты корреляции (указаны по модулю) зависимостей $k'-1/[\text{Na}^+]$ и $\log k'-\log [\text{Na}^+]$ для катионов ТМРАС и ВВТМАС на немодифицированном силикагеле С1 при 90 об.% ацетонитрила и разных рН. Условия указаны в подписи к рис. 19

Состав водной части элюента	$k' = a/[\text{Na}^+] + b$			$\log k' = s \cdot \log [\text{Na}^+] + \text{const}^*$		
	a	b	r	s	const	r
	ТМРАС					
$\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w\text{pH}$ 2.85	5.4	8.4	0.966	-0.23	1.1	0.993
$\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w\text{pH}$ 3.75	5.8	8.5	0.982	-0.23	1.1	0.999
AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 4.76	25.4	6.7	0.999	-0.61	1.5	0.999
$\text{C}_2\text{H}_5\text{COONa}/\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$ $w\text{pH}$ 4.88	26.8	6.6	1.000	-0.62	1.5	0.997
AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 5.76	61.8	-1.2	0.999	-1.1	1.8	1.000
NaNO_3 $w\text{pH}$ 2.85	16.8	1.0	0.999	-0.87	1.2	0.999
NaNO_3 $w\text{pH}$ 4.76	32.4	1.5	0.999	-0.91	1.5	0.999
NaNO_3 $w\text{pH}$ 5.76	38.9	1.4	0.999	-0.87	1.6	0.999
ВВТМАС						
$\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w\text{pH}$ 2.85	4.7	5.6	0.973	-0.27	1.0	0.995
AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 4.76	18.1	3.8	0.998	-0.67	1.3	0.999
AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 5.76	45.9	-2.2	0.999	-1.3	1.7	0.998
NaNO_3 $w\text{pH}$ 2.85	11.8	0.6	0.999	-0.90	1.1	1.000
NaNO_3 $w\text{pH}$ 4.76	22.3	0.9	0.999	-0.92	1.4	0.999
NaNO_3 $w\text{pH}$ 5.76	25.9	0.7	0.999	-0.91	1.4	0.999

* здесь и далее перед угловым коэффициентом s заведомо опущен знак минус (см. уравнение (23) стр. 26) для удобства использования модели как в случае электростатического притяжения ($s < 0$), так и отталкивания ($s > 0$).

рН наряду с возрастанием факторов удерживания ионов происходило уменьшение удерживания за счёт неионных взаимодействий (отрезок на оси ординат на рис. 19А), а также рост абсолютных значений угловых коэффициентов зависимостей $k'-1/[\text{Na}^+]$

и $\log k' - \log [Na^+]$. В совокупности данные наблюдения показывали увеличение ёмкости силикагеля, приводящей к возрастанию вклада ионного обмена в удерживание катионов.

Поскольку, как было отмечено в разделе 3.4.2, ацетат и формиат удерживаются на силикагеле в отличие от нитрата, несмотря на электростатическое отталкивание от диссоциированных силанольных групп, то, вероятно, при работе с соответствующими буферными растворами они концентрируются у поверхности сорбента из подвижной фазы, что может оказывать влияние на катионный обмен. Для проверки данного предположения выполнили следующий эксперимент: уравнили колонку элюентом, содержащим $AcONa/AcOH$ w_pH 5.76 и 90 об.% ацетонитрила, промыли смесью водного раствора $NaNO_3$ с ацетонитрилом 10/90 об.% в течение 1.5-2 ч при 1 мл/мин и провели варьирование концентрации нитрата натрия. Аналогичные этапы выполнили, используя для предварительного уравнивания буферные растворы с другими рН: $AcONa/AcOH$ w_pH 4.76 и $HCOONa/HCOOH$ w_pH 2.85. В описанном эксперименте происходит титрование части силанольных групп, которые в результате оказываются в натриевой форме. Из-за того, что силикагель является слабой поликислотой, то в отсутствии добавок сильных кислот и оснований он может сохранять постоянным соотношение диссоциированных и нейтральных силанолов, а нитрат, почти не удерживающийся на силикагеле, предположительно не вносит дополнительных эффектов (табл. 19 стр. 82). Действительно, времена удерживания тестовых аналитов были стабильны, эффективность не ухудшалась для всех соединений кроме бензойной кислоты, для которой, по-видимому, изменялась степень диссоциации в процессе удерживания из-за нестабильного рН элюента. Результаты для катионов ТМРАС и ВВТМАС представлены на рис. 19В,Г и в табл. 20. Удерживание катионов с увеличением рН возрастало, как в случае элюентов, содержащих буферные растворы. При этом были отмечены следующие особенности зависимостей, полученных в присутствии нитрата: удерживание катионов за счёт неионных взаимодействий имеет меньшую величину, чем в присутствии большинства буферных растворов (свободный член b в табл. 20), а также угловые наклоны $\log k' - \log [Na^+]$ при разных рН практически совпадают. Из этого следует, что вклад ионного обмена для катионов близок к 100% и не зависит от рН, при котором уравнивается колонка. Таким образом, по-

видимому, карбоксилат-ионы буферных растворов влияют на вклад ионного обмена в удерживание четвертичных аминов с ароматическим гидрофобным заместителем на силикагеле.

Путём варьирования концентрации соли в элюенте можно также рассчитывать вклад распределения и адсорбции в удерживание нейтральных соединений с использованием подхода, предложенного Гуо (уравнение (14) стр. 23) [58–60]. В данной работе ацетат аммония, применявшийся в исследованиях Гуо, был заменён на натрий формиатный и ацетатный буферный раствор. При w pH 2.85 и 5.76 было показано, что с увеличением концентрации соли в элюенте соотношение объёмов фаз возрастает (рис. 20А), что позволяет использовать методологию Гуо. Были получены линейные зависимости $k' - \frac{V_W}{V_M}$ для нейтральных соединений (рис. 20Б) и рассчитаны вклады распределения и адсорбции в данных условиях (табл. 21).

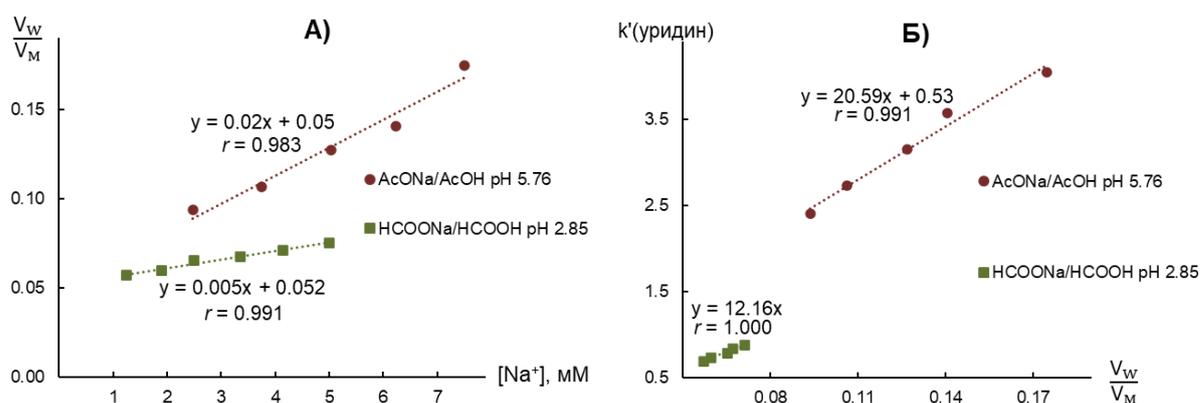


Рис. 20. Влияние концентрации HCOONa или AcONa на А) соотношение объёмов фаз и Б) фактор удерживания уридина на немодифицированном силикагеле С1. Условия: HCOONa/HCOOH w pH 2.85 или AcONa/AcOH w pH 5.76; 90 об.% ацетонитрила, диапазон концентраций Na^+ в элюенте 1.25-7.5 мМ. Соотношение объёмов фаз рассчитано по удерживанию толуола по уравнению (15) стр. 23.

Стоит подчеркнуть, что цитозин при w pH 2.85 также считали нейтральным согласно оценке величины $s_pK_a(BH^+) \sim 4$ (см. раздел 3.4.2). Во-первых, для всех азотистых оснований и нуклеозидов показано увеличение удерживания за счёт распределения $k'_{распр.}$ при возрастании pH, вызванное увеличением не только соотношением объёмов фаз $\frac{V_W}{V_M}$, но и коэффициентов распределения D . Во-вторых, увеличивалось удерживание за счёт адсорбции $k'_{адсорбция}$ и вклад данного механизма в удерживание большинства соединений. Из данных трендов выбивались рибофлавин и цитозин, для которых было отмечено преобладание адсорбции в удерживание (>50%). Изменение вкладов механизмов в разной степени при переходе

Таблица 21. Коэффициенты распределения D , вклады распределения $k'_{\text{распр.}}$ и адсорбции $k'_{\text{адсорбция}}$ в удерживание нейтральных соединений при двух w_{pH} на немодифицированном силикагеле С1. Условия: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ w_{pH} 2.85 или AcONa/AcOH w_{pH} 5.76; 90 об.% ацетонитрила, концентрация Na^+ в элюенте 2.5 мМ

Вещество	$\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ w_{pH} 2.85				AcONa/AcOH w_{pH} 5.76			
	$\frac{V_W}{V_M}$	D	$k'_{\text{распр.}}$ *	$k'_{\text{адсорбция}}$ **	$\frac{V_W}{V_M}$	D	$k'_{\text{распр.}}$	$k'_{\text{адсорбция}}$
Урацил	0.065	5.5	0.36 (69%)	0.17 (32%)	0.094	6.5	0.61 (60%)	0.41 (41%)
2'-дезоксигуанидин		7.3	0.47 (68%)	0.23 (33%)		8.4	0.79 (56%)	0.64 (46%)
Уридин		12	0.79 (102%)	0		21	1.93 (80%)	0.53 (22%)
Рибофлавин		21	1.39 (94%)	0.11 (7%)		14	1.32 (35%)	2.6 (69%)
Гуанозин		31	2.01 (89%)	0.29 (13%)		67	6.27 (86%)	1.3 (18%)
Цитозин		0	0	3.55 (100%)		20	1.86 (41%)	2.7 (60%)

* $k'_{\text{распр.}} = \frac{V_W}{V_M} \cdot D$, значения в скобках – вклад распределения в удерживание $k'_{\text{распр.}} / k' \cdot 100\%$;

** значения в скобках – вклад адсорбции в удерживание $k'_{\text{адсорбция}} / k' \cdot 100\%$.

от w_{pH} 2.85 к 5.76 приводило к изменению селективности разделения и порядка выхода цитозина и гуанозина.

Таким образом, с увеличением w_{pH} элюента, содержащего 90 об.% ацетонитрила, от 5.6 до 9.2 (w_{pH} 2.85-5.76) происходит диссоциация силанольных групп силикагеля, сопровождающаяся увеличением катионообменной ёмкости и количества адсорбированной воды на поверхности сорбента. Изменения свойств сорбента приводят к увеличению удерживания катионов и нейтральных соединений, удерживающихся преимущественно за счёт распределения. Карбоксилат-ионы буферных растворов, вероятно, влияют на процесс ионного обмена из-за концентрирования в приповерхностном водном слое. Однако дальнейшее изучение продолжили с их использованием, поскольку формиатные и ацетатные буферные растворы обеспечивают постоянство времён удерживания веществ и являются наиболее часто применяемыми в методе гидрофильной хроматографии, что позволит опираться на полученные в данной работе закономерности для выбора условий разделения компонентов реальных объектов.

4.1.1.2. Варьирование доли ацетонитрила при разных рН

Для выяснения влияния степени диссоциации силанольных групп силикагеля на зависимости удерживания веществ от содержания ацетонитрила в элюенте проводили его варьирование в диапазоне от 85 до 95 об.% при $w\text{pH}$ 2.85 и 5.76. В обоих случаях с увеличением доли ацетонитрила (т.е. с уменьшением доли сильного элюента – воды) происходило уменьшение количества воды, адсорбированного силикагелем, показанное по соотношению объёмов фаз $\frac{V_W}{V_M}$ (рис. 21), а также возрастание $w\text{pH}$ элюента на ~ 1.5 единицы (табл. 12 стр. 62). Выпадающая точка из зависимости при $w\text{pH}$ 5.76 на рис. 21, вероятно, связана с тем, что колонка была не до конца уравновешена в условиях с низким содержанием воды в элюенте, для достижения стабильной работы в которых требуется значительное время.

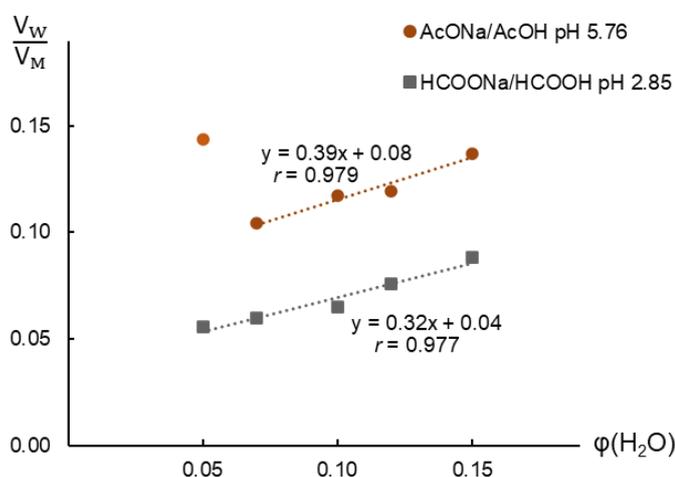


Рис. 21. Зависимость соотношения объёмов фаз $\frac{V_W}{V_M}$ от объёмной доли воды в элюенте при $w\text{pH}$ 2.85 (квадратные маркеры) и 5.76 (круглые маркеры) на немодифицированном силикагеле С1. Условия: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w\text{pH}$ 2.85 или AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 5.76; диапазон долей воды 5-15 об.% (95-85 об.% ацетонитрила), концентрация Na^+ в элюенте 2.5 мМ. Соотношение объёмов фаз рассчитано по удерживанию толуола по уравнению (15) стр. 23.

Для катионов зависимости $\log k' - \phi_{\text{H}_2\text{O}}$ при двух $w\text{pH}$ существенно отличались. При $w\text{pH}$ 2.85, соответствующему малой степени диссоциации силанолов, факторы удерживания катионов уменьшались при увеличении элюирующей силы подвижной фазы (рис. 22А). Зависимости в координатах $\log k' - \phi_{\text{H}_2\text{O}}$, где $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ – объёмная доля воды, были линейны ($r=0.997$), подтверждая реализацию механизма распределения, типичного для режима гидрофильной хроматографии (уравнение (11) стр. 21).

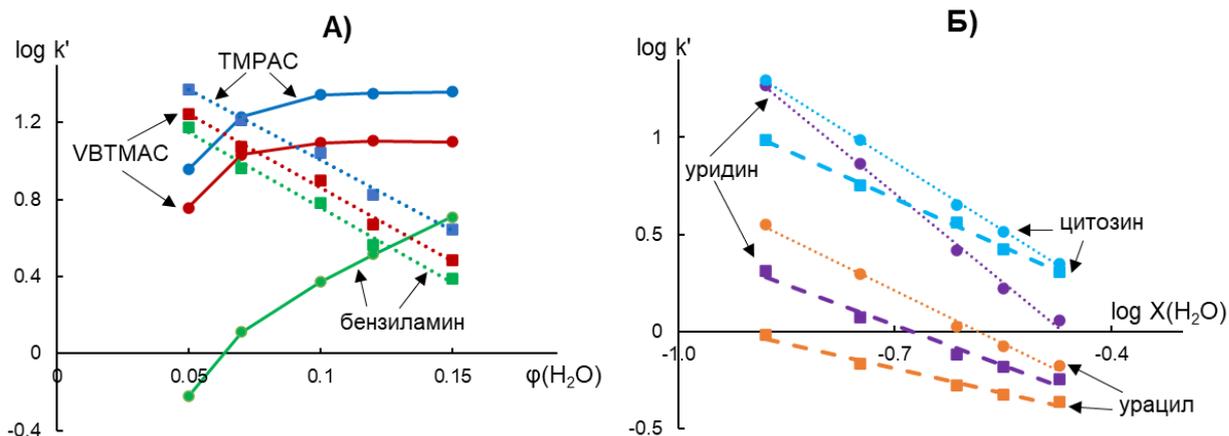


Рис. 22. Влияние доли воды в подвижной фазе на удерживание А) катионов, Б) нейтральных соединений при $w\text{pH}$ 2.85 (квадратные маркеры) и 5.76 (круглые маркеры) на немодифицированном силикагеле С1. Условия: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w\text{pH}$ 2.85 или AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 5.76; диапазон долей воды 5-15 об.% (95-85 об.% ацетонитрила), концентрация Na^+ в элюенте 2.5 мМ.

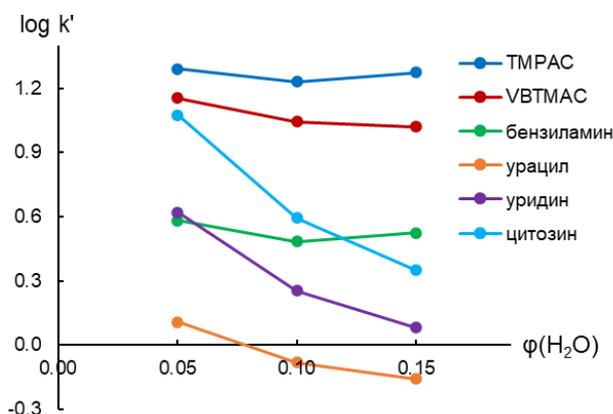


Рис. 23. Влияние доли воды в подвижной фазе на удерживание катионов и нейтральных соединений на силикагеле С1 в присутствии нитрата натрия. Условия: $\text{NaNO}_3/\text{ацетонитрил}$, диапазон долей воды 5-15 об.% (95-85 об.% ацетонитрила), концентрация NaNO_3 в элюенте 2.5 мМ. Предварительное уравнивание колонки буферным раствором AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 5.76.

Однако в присутствии ацетатного буферного раствора $w\text{pH}$ 5.76 факторы удерживания катионов возрастали в 2.5 раза при увеличении объёмной доли воды от 5 до 10 об.% и сохранялись на постоянном уровне при 10-15 об.%. Данный тренд не соблюдался в присутствии нитрата натрия (рис. 23), при использовании которого факторы удерживания катионов при разных содержаниях воды практически совпадали. Из этого можно предположить, что в подвижной фазе, содержащей 93-95 об.% ацетонитрила, диэлектрическая проницаемость которой почти в 2 раза ниже, чем у воды, не обеспечивается достаточная гидратация ионов и происходит процесс образования ионных пар между четвертичными аминами и ацетат-ионами, а также между диссоциированными силанолами и катионами натрия [140]. Поскольку

ионные пары электронейтральны и более гидрофобны, чем ионы, то их удерживание меньше как по механизму распределения, так и ионного обмена. Отсутствие зависимости факторов удерживания катионов от доли воды при 10-15 об.%, по-видимому, следствие преимущественного удерживания за счёт ионного обмена.

Для нейтральных соединений при двух w_pH зависимости факторов удерживания от содержания воды в элюенте имели бóльшие коэффициенты корреляции ($r > 0.988$) в билогарифмических координатах $\log k' - \log X_{H_2O}$, где X_{H_2O} – мольная доля воды (уравнение (12) стр. 22), что показывало преобладание механизма адсорбции (рис. 22Б). Угловой коэффициент соответствовал числу молекул воды на адсорбционном центре, замещаемых аналитом. При увеличении w_pH от 2.85 к 5.76 происходило его удвоение для урацила и уридина и небольшое возрастание для цитозина, что, по-видимому, отражало более существенные изменения в механизме удерживания для первых, особенно при 5 об.% воды в элюенте. Однако для уридина и урацила по методологии Гуо было показано преобладание распределения (табл. 21). Вероятно, расхождения связаны с недостатком подхода установления преобладающего механизма удерживания на основании большего коэффициента корреляции зависимости в координатах $\log k' - \varphi_{H_2O}$ или $\log k' - \log X_{H_2O}$. Так, для уридина и урацила коэффициенты корреляции зависимости $\log k' - \varphi_{H_2O}$ имели значения также достаточно близкие к 1: 0.944-0.947 и 0.969-0.974 при w_pH 2.85 и 5.76, соответственно.

Таким образом, при высокой степени диссоциации силанольных групп варьирование доли ацетонитрила не влияет на удерживание катионов в отсутствие анионов в элюенте, способных к образованию ионных пар. При этом изменение удерживания нейтральных соединений существеннее, чем при более низких значениях pH элюента.

4.1.1.3. Варьирование концентрации элюирующего иона при разных долях ацетонитрила

С целью оценки влияния содержания органического растворителя в подвижной фазе на механизм удерживания тестовых веществ проводили варьирование концентрации элюирующего иона при 85, 90 и 95 об.% ацетонитрила и двух крайних w_pH из рассматриваемого диапазона (2.85 и 5.76) [62]. Зависимости в координатах $k' - 1/[Na^+]$ и $\log k' - \log [Na^+]$, полученные для катиона TMPAC,

представлены на рис. 24, параметры уравнений – в табл. 22. Для подвижных фаз, содержащих 95 об.% ацетонитрила, концентрация элюирующего иона не превышала 3.5 мМ из-за ограниченной растворимости ацетата и формиата натрия.

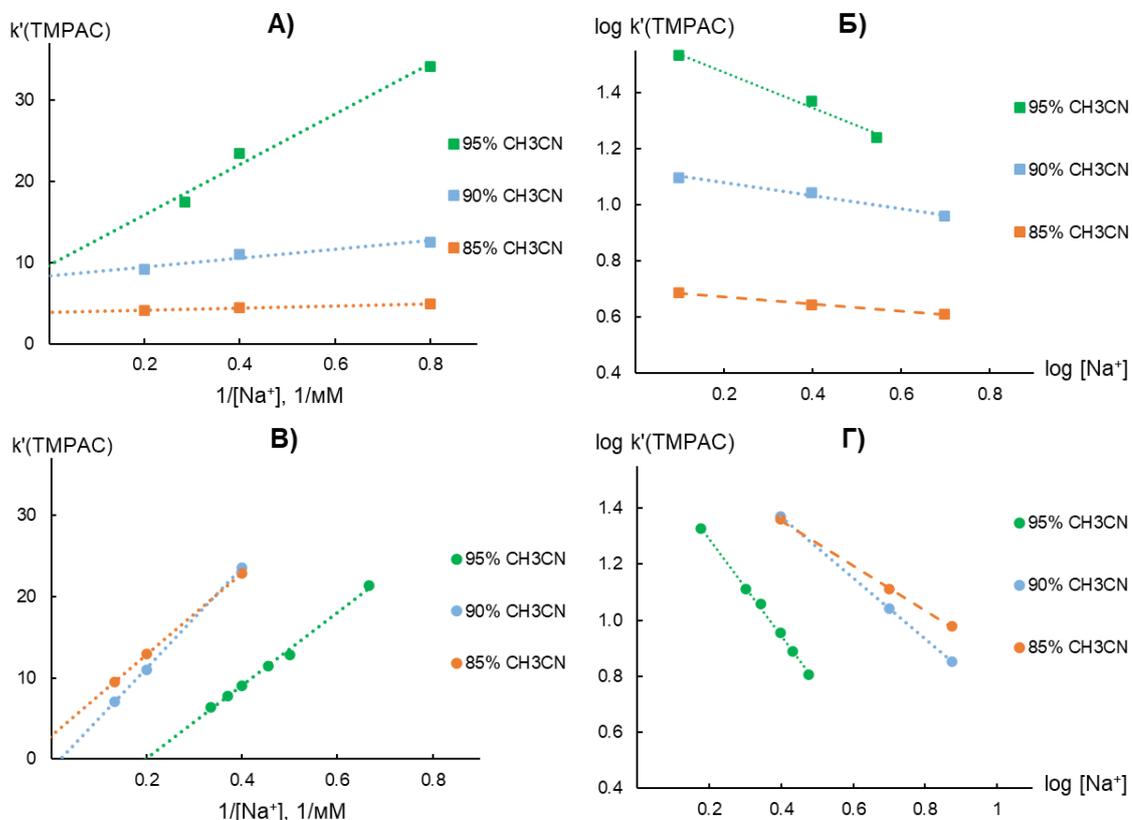


Рис. 24. Зависимости фактора удерживания катиона TMPAC на силикагеле С1 от концентрации элюирующего иона в подвижной фазе в координатах $k'-1/[\text{Na}^+]$ (А, В) и $\log k'-\log [\text{Na}^+]$ (Б, Г) при разных содержаниях ацетонитрила. Условия А), Б): $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w_{\text{pH}} 2.85$ / ацетонитрил 5/95, 10/90 и 15/85 об.%, диапазон концентраций Na^+ в элюенте 1.25-5 мМ. Условия В), Г): AcONa/AcOH $w_{\text{pH}} 5.76$ /ацетонитрил 5/95, 10/90 и 15/85 об.%, диапазон концентраций Na^+ в элюенте 1.5-7.5 мМ.

При $w_{\text{pH}} 2.85$ влияние концентрации $[\text{Na}^+]$ на удерживание катионов возрастало с увеличением содержания ацетонитрила в элюенте. Большие величины угловых коэффициентов зависимостей $k'-1/[\text{Na}^+]$ при 95 об.% ацетонитрила показывали увеличение числа доступных для взаимодействия диссоциированных силанольных групп за счёт меньшей адсорбции воды и более высокого w_{pH} подвижной фазы. Таким образом, увеличение доли ацетонитрила в элюенте оказывает одновременное влияние на механизм распределения и ион-ионного взаимодействия, которые дают эффект, приводящий к возрастанию факторов удерживания катионов.

Таблица 22. Угловые коэффициенты, свободные члены и коэффициенты корреляции (указаны по модулю) зависимостей $k'-1/[Na^+]$ и $\log k'-\log [Na^+]$ для катионов ТМРАС, ВВТМАС и бензиламина на немодифицированном силикагеле С1 при разных содержаниях ацетонитрила и рН элюента. Остальные условия указаны в подписи к рис. 24

Состав водной части элюента	Содержание CH_3CN , об.%	$k' = a/[Na^+] + b$			$\log k' = s \cdot \log [Na^+] + const$			
		a	b	r	s	$const$	r	
		ТМРАС						
HCOONa/HCOOH $w_{pH} 2.85$	85	1.3	3.9	0.995	-0.12	0.7	0.998	
	90	5.4	8.4	0.966	-0.23	1.1	0.993	
	95	31.0	9.6	0.989	-0.64	1.6	0.992	
AcONa/AcOH $w_{pH} 5.76$	85	50.0	2.9	1.000	-0.80	1.7	0.999	
	90	61.8	-1.2	0.999	-1.1	1.8	1.000	
	95	44.8	-8.9	0.998	-1.7	1.6	0.999	
		ВВТМАС						
HCOONa/HCOOH $w_{pH} 2.85$	85	1.3	2.5	0.990	-0.18	0.6	0.999	
	90	4.7	5.6	0.973	-0.27	1.0	0.995	
	95	25.2	6.4	0.990	-0.68	1.5	0.992	
AcONa/AcOH $w_{pH} 5.76$	85	27.4	1.1	0.999	-0.87	1.4	0.999	
	90	45.9	-2.2	0.999	-1.3	1.7	0.998	
	95	32.6	-7.1	0.992	-1.8	1.5	0.998	
		бензиламин						
HCOONa/HCOOH $w_{pH} 2.85$	85	1.3	1.9	0.994	-0.23	0.5	0.999	
	90	3.9	4.2	0.980	-0.30	0.9	0.998	
	95	14.7	8.6	0.993	-0.47	1.4	0.997	
AcONa/AcOH $w_{pH} 5.76$	85	8.7	1.6	0.999	-0.56	0.9	0.999	
	90	2.6	1.0	0.995	-0.38	0.5	0.999	
	95	1.4	0	0.999	-1.0	0.2	0.996	

При $w_{pH} 5.76$ закономерности удерживания отличались. Зависимости $k'-1/[Na^+]$ при 90 и 95 об.% ацетонитрила имели нетипичный вид, т.к. свободные члены были отрицательны. По теории ионного обмена в отсутствие иных взаимодействий зависимость $k'-1/[Na^+]$ должна проходить через 0, в присутствии – отсекает на оси ординат величину, соответствующую удерживанию за счёт других механизмов [62]. В данном случае при конечной величине концентрации ацетата натрия в элюенте катионы перестают удерживаться. Это согласуется с предположением об образовании ионных пар. Угловой коэффициент билогарифмической зависимости $\log k'-\log [Na^+]$ в присутствии 95 об.% ацетонитрила для однозарядных катионов ТМРАС и ВВТМАС близок к -2, что также не соответствует теоретически возможным и получаемым на практике значениям от -1 до 0. Вероятно, уменьшение удерживания значительно больше ожидаемого при увеличении концентрации соли связано с одновременным влиянием катиона

натрия на положение равновесия ионного обмена (уравнение (16) стр. 25) и ацетат-иона на степень связывания аналитов в ионные пары.

Таким образом, кажущиеся изменения в механизме ионного обмена с увеличением содержания ацетонитрила, близкого к 100%, могут быть связаны с образованием ионных пар между аналитом и анионом буферного раствора, а также возрастанием числа доступных для взаимодействия диссоциированных силанольных групп.

4.1.2. Закономерности для слабых оснований и кислот

Информация о возможных типах взаимодействий в исследуемых условиях является основой для интерпретации более сложных закономерностей удерживания соединений, подвергающихся диссоциации. Понимание особенностей их удерживания представляется важным, поскольку многие определяемые в реальных объектах соединения являются слабыми кислотами, основаниями или амфолитами.

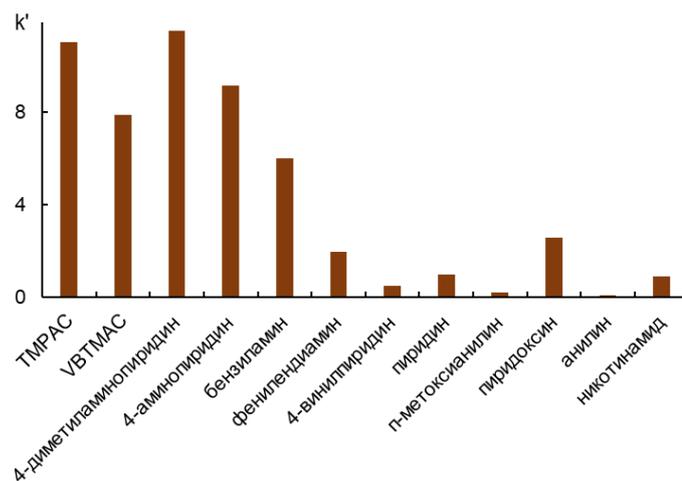


Рис. 25. Факторы удерживания катионов и оснований на немодифицированном силикагеле С1. Условия: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w_p\text{pH}$ 2.85 / ацетонитрил 10/90 об.%. Концентрация элюирующего иона Na^+ в подвижной фазе 2.5 мМ.

Обладая преимущественно катионообменными свойствами, силикагель подходит для разделения соединений, обладающих положительным зарядом, поэтому в первую очередь рассмотрели закономерности удерживания производных пиридина, анилина и бензиламина (табл. 11 стр. 59). Предварительно сравнивая факторы удерживания **оснований** и катионов при наименьшем $w_p\text{pH}$ 2.85 ($s_p\text{pH}$ 5.6, 90 об.% ацетонитрила), когда можно было бы ожидать, что все соединения находятся преимущественно в протонированной форме ($w_pK_a(\text{BH}^+) > 3$), отметили их сходство для оснований с $w_pK_a(\text{BH}^+) > 9$ (4-диметиламинопиридин, 4-аминопиридин и

бензиламин) и значительно меньшие величины для оснований с ${}^w pK_a(\text{BH}^+) < 6$ (рис. 25).

С увеличением ${}^w p\text{H}$ (${}^s p\text{H}$) изменение удерживания для данных двух групп аналитов существенно отличалось. На рис. 26 представлены тренды для отдельных представителей двух групп оснований, для остальных веществ зависимости имели аналогичный вид, отличающийся абсолютными значениями факторов удерживания в соответствии с рис. 25. Для относительно сильных оснований происходил рост факторов удерживания до ${}^s p\text{H}$ 7.0, вызванный увеличением степени диссоциации силанольных групп силикагеля и сменой буферного раствора с формиатного на ацетатный. Дальнейшее увеличение ${}^s p\text{H}$ приводило к существенному снижению удерживания, которого не наблюдали для катионов (рис. 18А). Для более слабых оснований факторы удерживания уменьшались вплоть до 0. Исключением был пиридоксин, характеризующийся наибольшей гидрофильностью ($\log P = -0.83$), удерживание которого увеличивалось с ростом ${}^s p\text{H}$ от 8.3 до 9.2, что напоминало поведение нейтральных соединений (рис. 18Б,В). Снижение факторов удерживания оснований с увеличением $p\text{H}$, несмотря на возрастание отрицательного заряда сорбента, по-видимому, связано с уменьшением доли протонированных молекул, происходящим из-за меньшей силы оснований в присутствии ацетонитрила ${}^s pK_a(\text{BH}^+) < {}^w pK_a(\text{BH}^+)$.

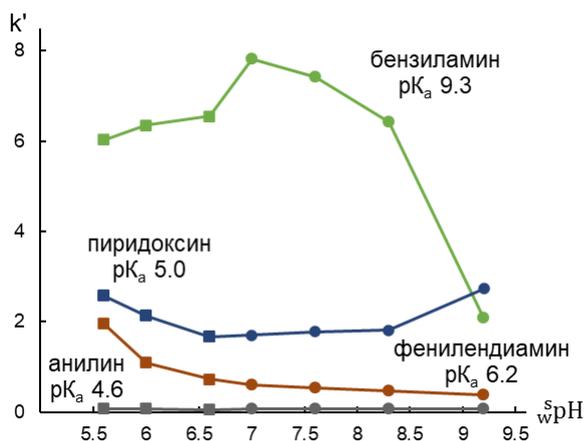


Рис. 26. Зависимости факторов удерживания слабых оснований от ${}^s p\text{H}$ подвижной фазы на немодифицированном силикагеле С1. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%; буферный раствор (форма маркера): $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ (квадрат), AcONa/AcOH (круг), диапазон ${}^w p\text{H}$ 2.85-5.76. Концентрация элюирующего иона Na^+ в подвижной фазе 2.5 мМ; скорость потока 1 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.

Таблица 23. Угловые коэффициенты и коэффициенты корреляции (указаны по модулю) зависимостей $\log k' = s \cdot \log[Na^+] + const$ для слабых оснований на немодифицированном силикагеле С1 при разных рН элюента. Диапазон концентраций Na^+ в элюенте 1.25-7.5 мМ. Условия указаны в подписи к рис. 26

соединение \ w_{pH}	w_{pK_a}	s			r			вклад ионного обмена при 2.5 мМ, %		
		2.85	4.76	5.76	2.85	4.76	5.76	2.85	4.76	5.76
4-диметил-аминопиридин	9.5	-0.21 (0.04)*	-0.42 (0.02)	-0.53 (0.03)	0.989	1.000	1.000	25	45	65
4-аминопиридин	9.3	-0.22 (0.02)	-0.34 (0.002)	-0.35 (0.01)	0.997	1.000	1.000	25	35	47
бензиламин	9.1	-0.30 (0.02)	-0.32 (0.03)	-0.38 (0.02)	0.998	0.999	1.000	30	35	50
фенилендиамин	6.2	-0.05 (0.01)	-0.09 (0.02)	-0.12 (0.002)	0.992	0.991	1.000	5	10	20
пиридин	5.2	-	-	-0.20 (0.009)	-	-	0.999	-	-	27
4-винилпиридин	5.4	-0.07 (0.04)	-0.15 (0.04)	-0.25 (0.04)	0.910	0.980	0.991	8	17	34
4-метоксианилин	5.2	-0.09 (0.003)	-0.06 (0.02)	-0.16 (0.02)	0.999	0.965	0.991	9	7	22
пиридоксин	5.0	-0.04	0	0	0.983	0	0	4	0	0
анилин	4.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
никотинамид	3.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* стандартное отклонение, $n=3$

Для проверки предположения провели варьирование концентрации элюирующего иона при разных рН (табл. 23). Значения углового коэффициента билогарифмической зависимости $\log k' - \log[Na^+]$ при w_{pH} 2.85 (w_{pH} 5.6, 90 об.% ацетонитрила) для оснований с $w_{pK_a} > 9$ были близки к таковым для катионов (табл. 20), демонстрируя сходство механизма удерживания. Тогда как при w_{pH} 4.76 и 5.76 основания имели меньшие по модулю значения s , чем катионы, что подтверждает уменьшение доли протонированной формы в растворе. По-видимому, $s_{pK_a}(BH^+)$ для сопряженных кислот к 4-диметиламинопиридину, 4-аминопиридину и бензиламину в среде, содержащей 90 об.% ацетонитрила, находятся в диапазоне 8-9, что согласуется с данными для других соединений с близкими $w_{pK_a}(BH^+)$ [18]. Для оснований с $w_{pK_a}(BH^+) < 6$ угловые коэффициенты были близки к нулю во всех условиях, что демонстрировало отсутствие вклада ионного обмена. Данное наблюдение подтверждалось установленными в работе [23] $s_{pK_a}(BH^+)$ для пиридина и анилина, равными 3.6 и 2.9, соответственно. Таким образом, стоит ещё

раз подчеркнуть необходимость использования водно-органической шкалы ${}^s\text{pH}$ при работе в условиях с высоким содержанием ацетонитрила.

Влияние pH на зависимости удерживания оснований от доли воды в подвижной фазе рассматривали на примере бензиламина. При ${}^w\text{pH}$ 2.85 полученные закономерности напоминали таковые для катионов: удерживание описывалось в рамках модели распределения, при этом при больших содержаниях ацетонитрила вклад ионного обмена в удерживание был выше (рис. 22А стр. 94, табл. 22). В присутствии ацетатного буферного раствора ${}^w\text{pH}$ 5.76 в элюенте, содержащем более 85 об.% ацетонитрила, в котором бензиламин протонирован частично, были отмечены различия. С увеличением доли воды в подвижной фазе фактор удерживания основания возрастал быстрее, чем для катионов (рис. 22А). Кроме того, угловые коэффициенты зависимостей $k'-1/[Na^+]$ и $\log k' - \log [Na^+]$ для бензиламина изменялись по другому закону (табл. 22). В совокупности данные наблюдения, вероятно, отражают, что увеличение содержания воды приводило к возрастанию доли протонированных молекул основания за счёт роста ${}^s\text{pK}_a(\text{BH}^+)$ и уменьшения ${}^s\text{pH}$ элюента.

Изучили закономерности удерживания **слабых кислот** – производных бензойной кислоты, отличающихся по гидрофильности и силе, а также ксантина (табл. 11 стр. 59). Для 3-амино- и 3,4-диаминобензойной кислот не ожидали протонирования аминогрупп, поскольку их ${}^w\text{pK}_a(\text{BH}^+)$ меньше, чем у анилина.

Вид зависимости фактора удерживания слабой кислоты от ${}^s\text{pH}$ подвижной фазы в первую очередь определялся её силой (рис. 27). Для бензойной кислоты, а также её 4-метил и 4-метокси- производных, зависимость имела возрастающую S-образную форму, подобную полученной в работах [18,23] на цвиттер-ионных колонках (рис. 8 стр. 38). С опорой на уравнение (27) стр. 38 были рассчитаны ${}^s\text{pK}_a$ кислот в среде, содержащей 90 об.% ацетонитрила, которые составили 7.4, 7.5 и 7.1 для 4-метил-, 4-метокси- и бензойной кислоты, что отлично согласуется с литературными данными: ${}^s\text{pK}_a$ 7.1 [18], 6.8 [23] для бензойной кислоты. Для более сильных кислот подобной зависимости не наблюдали, факторы удерживания изменялись в меньшей степени, убывая практически до 0 для 2,4-динитро- и 2-гидроксибензойной кислот. Стоит отметить, что 2-гидроксибензойная кислота ближе по силе к моно-, чем к динитрозамещённым производным бензойной кислоты,

однако для неё получены наименьшие факторы удерживания. Это может быть следствием образования внутримолекулярных водородных связей [21] и её большей гидрофобности. Для более слабых кислот, чем бензойная, был отмечен существенный рост факторов удерживания (рис. 27Б) до значений сопоставимых или превышающих таковые для оснований с $w\text{p}K_a(\text{BH}^+) > 9$ при $w\text{pH}$ 9.2. Возрастание удерживания диссоциирующих кислот с увеличением рН, несмотря на рост отрицательного заряда поверхности сорбента, связано с увеличением их гидрофильности, способствующей распределению между элюентом и адсорбированным водным слоем. Наибольшей гидрофильностью, оцениваемой параметром $\log D$ (табл. 11 стр. 59), характеризуются анионы более слабых 4-амино-, 3,4-диаминобензойной кислот и ксантина.

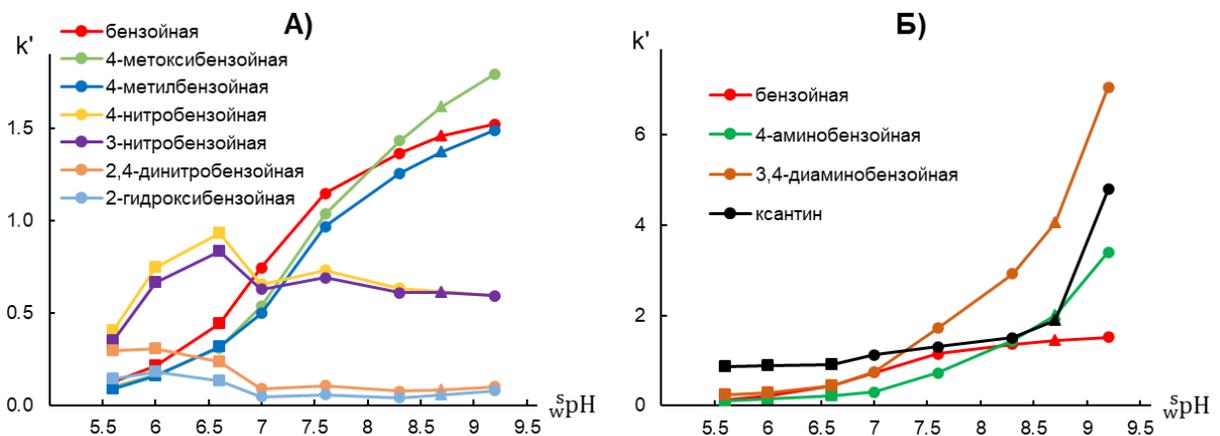


Рис. 27. Зависимости факторов удерживания А) бензойной кислоты и её нитро-, гидрокси-, метил- и метокси- производных, Б) ксантина, бензойной кислоты и её амино- и диамино- производных от $w\text{pH}$ подвижной фазы на немодифицированном силикагеле С1. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%; буферный раствор (форма маркера): $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ (квадрат), AcONa/AcOH (круг), $\text{C}_2\text{H}_5\text{COONa}/\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$ (треугольник), диапазон $w\text{pH}$ 2.85-5.76. Концентрация элюирующего иона Na^+ в подвижной фазе 2.5 мМ; скорость потока 1 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.

Рассматривали влияние концентрации элюирующего иона в подвижной фазе на удерживание кислот. Было показано, что с увеличением концентрации соли в элюенте происходит возрастание факторов удерживания кислот (положительные угловые коэффициенты билигарифмической зависимости $\log k' - \log [\text{Na}^+]$, табл. 24), что подтверждает влияние электростатического отталкивания от силикагеля. При этом с ростом рН изменения факторов удерживания становились существеннее, что, по-видимому, отражало увеличение силы отталкивания от большего числа диссоциированных силанольных групп.

Таблица 24. Угловые коэффициенты и коэффициенты корреляции (указаны по модулю) зависимостей $\log k' = s \cdot \log[Na^+] + const$ для производных бензойной кислоты, ксантина, пиридинкарбоновых кислот и фенилаланина на немодифицированном силикагеле С1 при разных рН элюента. Диапазон концентраций Na^+ в элюенте 1.25-7.5 мМ. Условия указаны в подписи к рис. 27

соединение	w_{pH}	w_{pK_a}	s			r		
			2.85	4.76	5.76	2.85	4.76	5.76
2,4-динитробензойная кислота		1.4	0.36 (0.03)*	**	1.8 (0.2)	0.999	–	0.995
4-гидроксibenзойная кислота		3.0	0.67 (0.02)	**	1.9 (0.3)	1.000	–	0.994
4-нитробензойная кислота		3.4	0	0.71 (0.07)	1.00 (0.05)	0	0.996	0.999
3-нитробензойная кислота		3.5	0	0.66 (0.05)	0.97 (0.05)	0	0.998	0.999
бензойная кислота		4.2	0.32 (0.02)	0.37 (0.02)	0.73 (0.003)	0.998	0.999	1.000
4-метилбензойная кислота		4.4	0.11 (0.03)	0.37 (0.03)	0.71 (0.008)	0.980	0.997	1.000
4-метоксибензойная кислота		4.5	0.15 (0.01)	0.34 (0.03)	0.70 (0.006)	0.999	0.997	1.000
3,4-диаминобензойная кислота		5.2	0	0.32 (0.04)	0.86 (0.08)	0	0.995	0.997
4-аминобензойная кислота		5.0	0	0.27 (0.01)	0.72 (0.04)	0	1.000	0.999
ксантин		7.6	0	0	0.8 (0.1)	0	0	0.996
пиколиновая кислота		1.0 4.7	0.48 (0.08)	0.43 (0.01)	0.58 (0.08)	0.991	1.000	0.997
никотиновая кислота		2.2 4.8	0.15 (0.03)	0.38 (0.02)	0.8 (0.1)	0.992	1.000	0.995
фенилаланин		2.2 9.2	0	0	0.22 (0.01)	0	0	1.000

* стандартное отклонение, $n=3$; ** элюируются до мёртвого времени при 1.25 мМ концентрации ацетата натрия в подвижной фазе.

Для ксантина, несмотря на величину $w_{pK_a} > w_{pH}+2$ и сходства зависимости k' от s_{pH} с таковой для предполагаемого нейтральным гуанозина (рис. 18В), при s_{pH} 9.2 показано существенное влияние концентрации соли на удерживание, аналогично производным бензойной кислоты. Для нейтральных соединений увеличение концентрации соли также приводит к возрастанию удерживания за счёт влияния на толщину водного слоя, однако данный эффект значительно меньше. Такое поведение ксантина, вероятно, является следствием влияния ацетонитрила на его константу кислотности, изменяющуюся в меньшей степени по сравнению с

константой для уксусной кислоты – основы буферного раствора. ${}^s\text{p}K_a$ ксантина при 90 об.% ацетонитрила можно оценить величиной ~ 9 .

При варьировании доли воды в элюенте с разным ${}^w\text{pH}$ на примере бензойной кислоты и ксантина отметили, что зависимости имеют вид, аналогичный таковым для нейтральных соединений (рис. 28А), демонстрируя влияние механизма адсорбции, вероятно, реализующегося путём образования водородных связей. Для ксантина было получено экстремально высокое удерживание $k'=200$ при 5 об.% воды в элюенте с ${}^w\text{pH}$ 5.76 и 3 мМ ацетата натрия, когда водный слой на силикагеле имеет наименьшую толщину, делая поверхность более доступной для непосредственного взаимодействия. Содержание воды также влияло на степень изменения факторов удерживания кислот с концентрацией соли в подвижной фазе (рис. 28Б). Тренды для углового коэффициента зависимости $\log k' - \log [Na^+]$ имели разный вид для бензойной кислоты и ксантина, вероятно, вызванные влиянием разного содержания ацетонитрила на ${}^s\text{p}K_a$ ксантина.

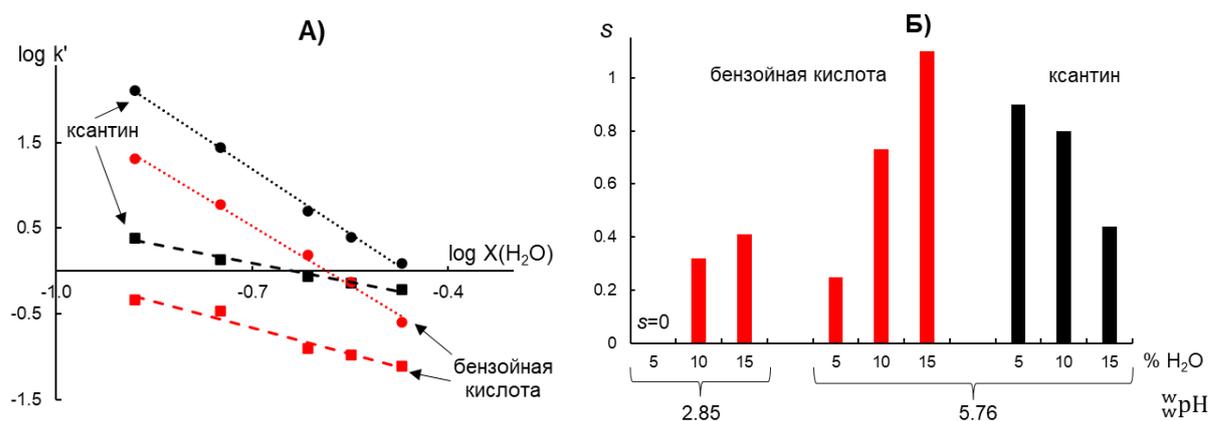


Рис. 28. Влияние доли воды в подвижной фазе А) на удерживание при 2.5 мМ Na^+ в элюенте и Б) силу электростатического отталкивания (угловой коэффициент s зависимости $\log k' - \log [Na^+]$) для бензойной кислоты и ксантина при ${}^w\text{pH}$ 2.85 (квадратные маркеры) и 5.76 (круглые маркеры) на немодифицированном силикагеле С1. Условия: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ ${}^w\text{pH}$ 2.85 или AcONa/AcOH ${}^w\text{pH}$ 5.76; диапазон долей воды 5-15 об.% (95-85 об.% ацетонитрила).

Было рассмотрено влияние pH элюента на удерживание соединений, которые могут находиться в **цвиттер-ионной форме** в условиях эксперимента: пиридинкарбоновых кислот (никотиновой и пиколиновой) и аминокислоты фенилаланина. Вид зависимости фактора удерживания фенилаланина от ${}^s\text{pH}$ был аналогичен таковой для нейтральных соединений (рис. 29). При этом концентрация элюирующего иона практически не влияла на удерживание аналита (табл. 24).

Данные наблюдения в совокупности показывают, что фенилаланин в исследуемых условиях находится в цвиттер-ионной форме, за счёт чего электростатические взаимодействия минимальны. Большие величины факторов удерживания по сравнению с нейтральными аналитами, по-видимому, вызваны большей гидрофильностью соединения за счёт наличия заряда и, следовательно, высокого удерживания за счёт распределения.

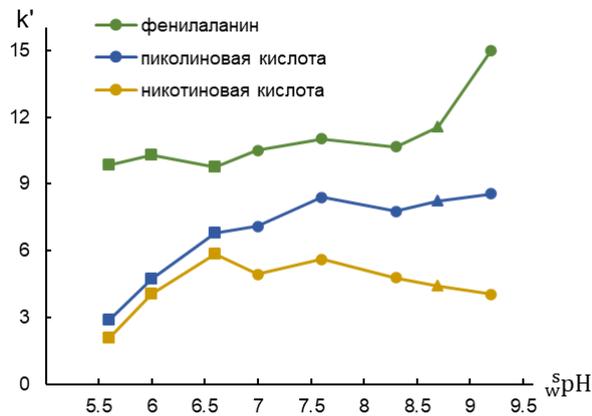


Рис. 29. Зависимости факторов удерживания фенилаланина, пиколиновой и никотиновой кислот от pH_w подвижной фазы на немодифицированном силикагеле С1. Условия приведены в подписи к рис. 27.

Зависимости для структурных изомеров пиколиновой и никотиновой кислот отличались между собой и от фенилаланина. Они обладают более слабыми основными свойствами ($\text{p}K_a(\text{BH}^+) \sim 5$, табл. 11 стр. 59), поэтому для них в большей степени проявляется отталкивание от силикагеля за счёт диссоциированных карбоксильных групп (табл. 24). Тренд для никотиновой кислоты напоминает таковой для 3- и 4-нитробензойных кислот (рис. 27А), но с большими факторами удерживания, что, по-видимому, вызвано её большей гидрофильностью. Для пиколиновой кислоты отличие заключалось в том, что при увеличении pH_w от 6.6 до 9.2 происходило возрастание удерживания до достижения плато, что обеспечивало на данном участке высокую селективность разделения структурных изомеров. Отличие свойств пиколиновой и никотиновой кислот было подробно рассмотрено в работе [141], для первой характерно более высокая растворимость в воде, более широкий диапазон существования цвиттер-ионной формы, а также образование внутримолекулярных водородных связей с образованием 5-членного цикла. Вероятно, сочетание данных характеристик приводит к различиям в хроматографическом поведении.

Таким образом, закономерности удерживания слабых электролитов на силикагеле определяются степенью диссоциации силанольных групп сорбента, константами диссоциации соединений в среде с соответствующим содержанием ацетонитрила, их гидрофильностью и способностью образовывать водородные связи. Из-за этого предсказывать порядок выхода слабых кислот и оснований, опираясь только на гидрофильность соединений, оцениваемую по $\log P$, практически невозможно. При этом полученные тренды могут служить основой для выбора условий разделения подобных соединений.

Рассмотренные закономерности расширяют представление не только о влиянии состава элюента на способность силикагеля обеспечивать удерживание веществ за счёт ионного обмена, распределения и адсорбции, но и о способах воздействия на селективность разделения смесей соединений. Ключевым параметром является рН подвижной фазы, значительно изменяющий селективность разделения диссоциирующих соединений (рис. 26, рис. 27).

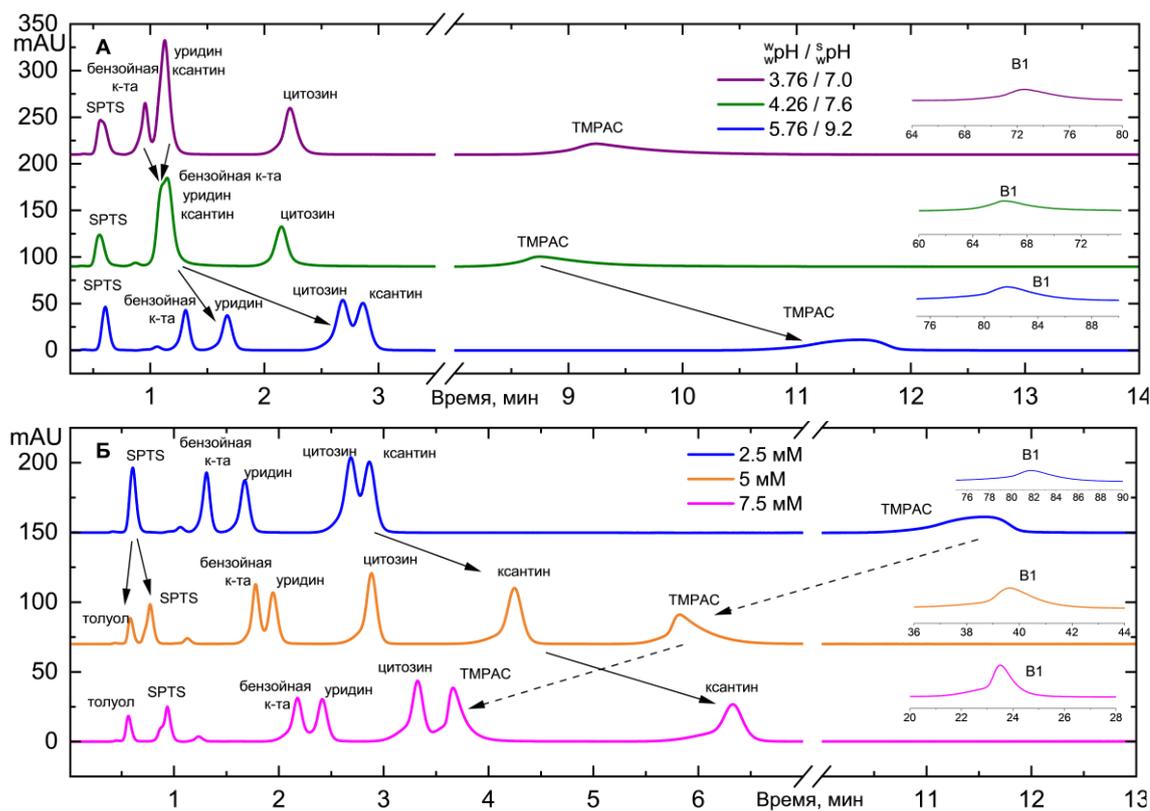


Рис. 30. Хроматограммы модельной смеси, полученные на силикагеле (C1) А) при разных w_pH , концентрация Na^+ 2.5 мМ в элюенте; Б) при разной концентрации Na^+ при w_pH 5.76. Условия: $AcONa/AcOH$ буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%. Размер колонки 100×3 мм; скорость потока 1 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.

Примеры влияния рН, концентрации элюирующего иона и соотношения вода/ацетонитрил на селективность разделения модельной смеси аналитов различных кислотно-основных свойств представлены на рис. 30 и в Приложении 3. Так, при увеличении $w_p\text{pH}$ от 3.76 до 5.76 удаётся разделить тройку веществ уридин-ксантин-бензойная кислота за счёт диссоциации ксантина, приводящей к возрастанию его удерживания, и силанольных групп, которые обеспечивают большую адсорбцию воды на поверхности неподвижной фазы, существенно влияющего на удерживание уридина. При дальнейшем увеличении концентрации элюирующего иона при $w_p\text{pH}$ 5.76 возможно, с одной стороны, сократить время анализа за счёт подавления электростатических взаимодействий, с другой, обеспечить удерживание отрицательно заряженных соединений (SPTS, ксантин).

4.2. Силикагель, модифицированный эремомицином

Неподвижные фазы на основе силикагеля с привитыми макромолекулами перспективны для обеспечения уникальной селективности разделения в ГИХ за счёт наличия в структуре слоя различных функциональных групп. К ним относятся сорбенты с ковалентно закреплённым эремомицином. Однако информация о механизме удерживания аналитов на подобных неподвижных фазах в условиях гидрофильной хроматографии практически отсутствует. Эремомицин является амфолитом за счёт карбоксильной (w_pK_a 3.1), amino (w_pK_a 6.9, 7.9, 9.0) и фенольных гидроксильных (w_pK_a 9.7, 10.4, 11.35) групп (рис. 31) [142]. Изoeлектрическая точка эремомицина $pI=7.6$, т.е. при $pH < 7.6$ преобладает положительный заряд [143].

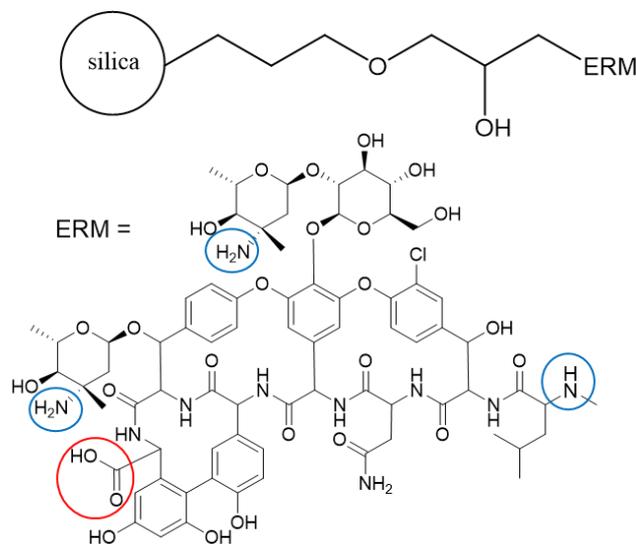


Рис. 31. Структура неподвижной фазы С2 – силикагеля, модифицированного эремомицином (Диафер-110-Еге).

В ряде исследований предполагают, что за счёт большого размера макромолекула существенно экранирует и гидрофилизует матрицу [117,119]. Так, силикагель, модифицированный эремомицином (фаза С2), по данным теста Танака имеет относительно высокую гидрофильность ($k'(U)=3.28$) и низкую катионообменную селективность ($\alpha(CX)=1.09$), которая по величине значительно меньше, чем у немодифицированного силикагеля. Анионообменная селективность также невысока ($\alpha(AX)=0.83$), что, вероятно, вызвано скомпенсированным зарядом на поверхности фазы. Однако данный тест, проводимый в фиксированных условиях, не позволяет описывать весь спектр свойств неподвижной фазы из-за наличия в структуре макромолекулы нескольких групп, способных к диссоциации. Поэтому проводили независимое варьирование рН элюента и концентрации элюирующего иона при разных содержаниях ацетонитрила.

4.2.1. Закономерности удерживания тестовых веществ в присутствии 90 об.% ацетонитрила

Перед интерпретацией зависимостей факторов удерживания веществ от ^spH элюента необходимо обратиться к свойствам используемых буферных растворов. Анионы по сродству к данной неподвижной фазе соотносятся следующим образом: монохлорацетат (1) < формиат (1.6) < пропионат (1.8) < ацетат (2.2) (табл. 19 стр. 82). Из этого следует, что монохлорацетат ожидаемо будет существенно влиять на удерживание тестовых веществ. Действительно, фактор удерживания аниона SPTS, полученный в присутствии монохлорацетата, в 2 раза больше, чем в случае формиата при ^spH 5.6 (рис. 32А) из-за меньшей элюирующей силы первого. Фактор удерживания SPTS, полученный в ацетатном буферном растворе ^spH 7.1, наоборот, имеет заниженное значение по сравнению с формиатным, однако это не влияет на тренд изменения удерживания с рН. В случае катионов выпадающие точки (незакрашенные маркеры), по-видимому, связаны с образованием ионных пар четвертичных аминов с монохлорацетатом и пропионатом, как было отмечено при рассмотрении трендов на силикагеле.

С учётом влияния природы буферного раствора при увеличении ^spH происходило возрастание факторов удерживания катионов и снижение для анионов (рис. 32А), которое отражало соответствующее изменение ионообменной селективности сорбента (рис. 32Б). Для катиона тиамин полученный тренд был

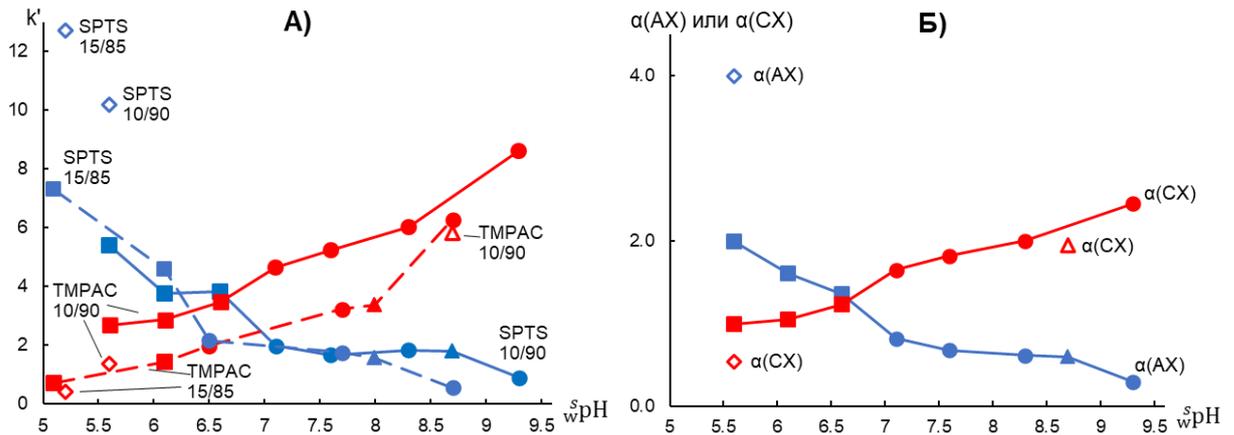


Рис. 32. Влияние s_{pH} элюента на А) удерживание катиона ТМРАС и аниона SPTS, Б) катионо- $\alpha(\text{CX})=k'(\text{ТМРАС})/k'(\text{U})$ и анионообменную селективность $\alpha(\text{AX})=k'(\text{SPTS})/k'(\text{U})$ из теста Танака при постоянной концентрации элюирующего иона 2.5 мМ в подвижной фазе на сорбенте С2. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.% (сплошная линия) или 15/85 об.% (пунктирная линия), остальные условия указаны в подписи к рис. 27.

аналогичен таковому для ТМРАС, но абсолютные факторы удерживания были выше в соответствии с его большей гидрофильностью (табл. 11 стр. 59).

Варьированием концентрации соли в подвижной фазе были оценены вклады электростатических взаимодействий в удерживание ионов при разных s_{pH} . Вывод о характере ионообменных свойств сорбента делали на основании знаков угловых коэффициентов s зависимости $\log k' - \log [M]$, где $[M]$ – концентрация соли (элюирующего иона) в подвижной фазе: отрицательный свидетельствовал о реализации ионного обмена (притяжения), положительный – электростатического отталкивания иона-аналита. Поскольку эремоцин содержит кислотные и основные группы, то в зависимости от условий роль элюирующего иона может играть как катион Na^+ , так и карбоксилат-ион буферного раствора, концентрации которых эквивалентны. Было показано, что рассматриваемый диапазон s_{pH} элюента можно условно разделить на три части (рис. 33А): при $s_{\text{pH}} < 6.6$ ($s_{\text{pH}} < 3.75$) реализуется отталкивание катионов и притяжение анионов; при $6.6 < s_{\text{pH}} < 8.3$ ($3.75 < s_{\text{pH}} < 4.76$) притяжение катионов и анионов; при $s_{\text{pH}} > 8.3$ ($s_{\text{pH}} > 4.76$) отталкивание анионов и притяжение катионов. При низких s_{pH} протонированные аминогруппы эремоцина обеспечивают анионообменные свойства неподвижной фазы. При увеличении s_{pH} , по-видимому, происходит депротонирование amino- и диссоциация карбоксильных групп в функциональном слое [143] и, возможно, остаточных силанольных групп, что приводит к возрастанию отрицательного заряда

сорбента. Наиболее вероятно, что диссоциация фенольных гидроксильных групп эремомицина не происходит по аналогии с фенолом в условиях ГИХ [18]. В диапазоне $6.6 < \text{pH} < 8.3$ неподвижная фаза проявляет цвиттер-ионный характер свойств. Таким образом, с увеличением pH элюента, содержащего 90 об.% ацетонитрила, от 5.6 до 9.2 (pH 2.85-5.76) происходит изменение свойств сорбента с анионо- на катионообменные, что невозможно предсказать, основываясь на данных о изоэлектрической точке эремомицина.

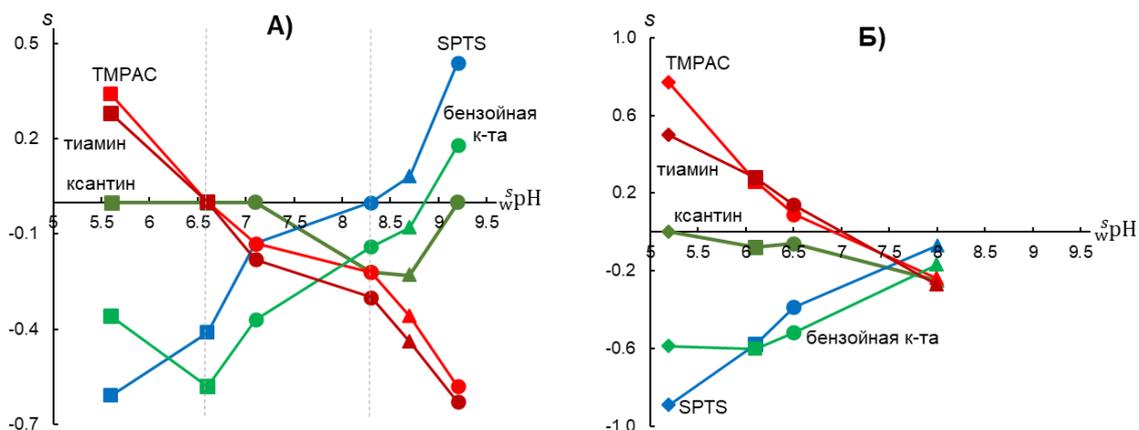


Рис. 33. Влияние pH элюента на вклады электростатических взаимодействий (угловой коэффициент s зависимости $\log k' - \log [M]$) в удерживание катионов, анионов и слабых кислот А) буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%; Б) буферный раствор / ацетонитрил 15/85 об.%, остальные условия указаны в подписи к рис. 27.

Удерживание нейтральных соединений урацила и уридина незначительно изменялось при увеличении pH подвижной фазы (рис. 34). Данный тренд согласовался с малым изменением соотношения объемов фаз $\frac{V_W}{V_M}$ в диапазоне от 0.25 до 0.27. Выпадающая точка была получена в присутствии монохлорацетата, который, вероятно, обеспечивал меньшую толщину водного слоя на поверхности сорбента. Увеличение концентрации соли в элюенте приводило к возрастанию факторов удерживания урацила и уридина, что характерно в случае реализации механизма распределения для нейтральных соединений. Зависимости фактора удерживания цитозина от pH и концентрации элюирующего иона в подвижной фазе отличалась от таковых для урацила и уридина. Как было рассмотрено в разделе 3.4.2, цитозин не протонируется в условиях эксперимента, несмотря на $\text{pK}_a(\text{BH}^+) > \text{pH}$, а, по-видимому, удерживается преимущественно за счёт водородных связей. Наличие специфических взаимодействий между цитозином и неподвижной фазой

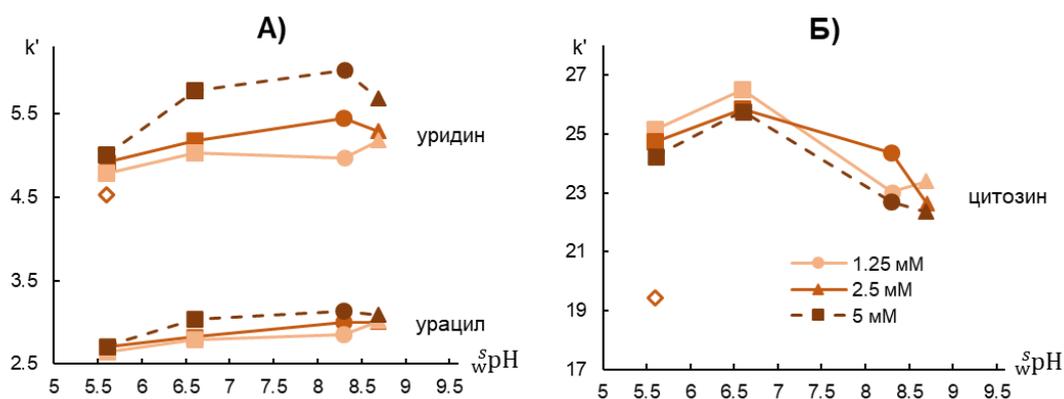


Рис. 34. Зависимости факторов удерживания А) урацила и уридина, Б) цитозина от pH_w на трёх уровнях концентраций элюирующего иона в подвижной фазе на сорбенте С2. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%; буферный раствор (форма маркера): $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ (квадрат), AcONa/AcOH (круг), MCANa/MCAA (ромб), $\text{C}_2\text{H}_5\text{COONa}/\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$ (треугольник), диапазон pH_w 2.85-4.88. Скорость потока 0.5 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.

также подтверждается на основании его высокого относительного удерживания (цитозин/урацил или цитозин/уридин) по сравнению с сорбентами с более простыми функциональными слоями (см. раздел 4.3).

Зависимость удерживания ксантина и бензойной кислоты от pH_w имела аналогичный вид, как немодифицированном силикагеле (рис. 35), вытекающий из одновременного увеличения доли диссоциированной формы кислоты, приводящей к лучшему распределению в приповерхностный водный слой, и отрицательного заряда неподвижной фазы, обеспечивающего электростатическое отталкивание аналита. С увеличением pH_w , действительно, происходило изменение степени влияния концентрации соли в элюенте на удерживание кислот (рис. 33А), показывающее изменение механизма удерживания.

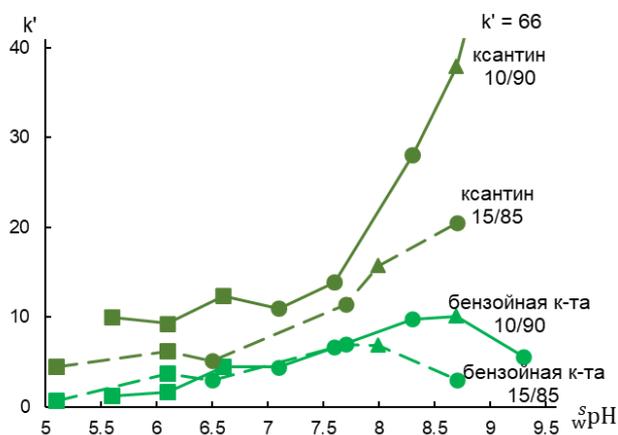


Рис. 35. Влияние pH_w элюента на удерживание бензойной кислоты и ксантина при постоянной концентрации элюирующего иона 2.5 мМ в подвижной фазе на сорбенте С2. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.% (сплошная линия) или 15/85 об.% (пунктирная линия), остальные условия указаны в подписи к рис. 27.

Однако вплоть до $\overset{s}{w}pH$ 8.7 для бензойной кислоты угловой коэффициент зависимости $\log k' - \log [M]$ был меньше 0, как в случае ионного обмена (рис. 33А). При этом в данных условиях для аниона SPTS имело место положительное влияние концентрации на удерживание. Эти условия, по-видимому, являются переходными, когда отрицательный заряд сорбента в небольшой степени преобладает над положительным, что обуславливает наблюдаемую разницу. При $\overset{s}{w}pH$ 9.2, когда бензойная кислота находится в анионной форме согласно $\overset{s}{w}pK_a$ 7.1, имеет место её отталкивание от неподвижной фазы, приводящей к снижению фактора удерживания, аналогично SPTS. Стоит отметить, что в этих условиях бензоат-ион имеет бóльшие факторы удерживания, чем SPTS, несмотря на меньшую гидрофильность, оцениваемую параметром $\log D$ (табл. 11 стр. 59). Возможно, это связано с влиянием специфических взаимодействий в случае первого. Однако проблема может заключаться в неточной оценке гидрофильности, что требует дополнительного исследования, включающего экспериментальную оценку параметра $\log D$, например, как предложено в работе [144]. Также стоит отметить, что ионный обмен обнаруживается для бензойной кислоты при $\overset{s}{w}pH$ 5.6 ($\overset{w}{p}H$ 2.85), при котором доля бензоат-ионов составляет ~4% по расчёту с опорой на распределительную диаграмму. Вероятно, это связано с тем, что нейтральная форма кислоты гидрофобна и практически не удерживается, а фактор удерживания при определённом pH – средневзвешенное факторов удерживания двух форм (уравнение (27) стр. 38).

Для ксантина влияние концентрации на удерживание было показано только при $\overset{s}{w}pH$ 8.3 и 8.7, когда молекула диссоциирует согласно оценке $\overset{s}{w}pK_a \sim 9$. При наибольшем $\overset{s}{w}pH$ 9.2 для ксантина $k' = 66$, что превышает значение для гидрофильного катиона тиамин ($k' = 59$), удерживающегося в том числе за счёт ионного обмена. Такая селективность, вероятно, вызвана специфическими взаимодействиями отрицательно заряженной формы ксантина с неподвижной фазой.

4.2.2. Влияние доли ацетонитрила на закономерности удерживания тестовых веществ

Сравнили закономерности удерживания тестовых веществ при использовании подвижных фаз, содержащих 85 и 90 об.% ацетонитрила. Полученные зависимости факторов удерживания и вкладов электростатических взаимодействий от $\overset{s}{w}pH$ в обоих случаях имели схожий вид (рис. 32А, 33, 35). Однако стоит отметить несколько

различий. Во-первых, профили удерживания при 85 об.% ацетонитрила были смещены в область меньших значений s_pH на 0.4-0.7 единиц по сравнению с 90 об.% ацетонитрила, несмотря на использование буферных растворов в идентичном диапазоне w_pH 2.85-5.76. Данное различие было вызвано влиянием содержания ацетонитрила на константы диссоциации слабых кислот-основ буферных растворов. Для бензойной кислоты и ксантина аналогичное изменение также имело место, s_pK_a при 85 об.% ацетонитрила для них оценили величинами ~ 6.5 и ~ 8.5 , соответственно. Во-вторых, факторы удерживания тестовых веществ были ниже при большей доле воды в элюенте при постоянных остальных параметрах, что типично для режима гидрофильной хроматографии и, по-видимому, отражает влияние механизмов распределения и/или адсорбции на удерживание аналитов. Однако факторы удерживания аниона SPTS практически не изменялись и даже увеличивались при w_pH 2.85 и 3.75 (рис. 32А), что, вероятно, связано с наличием в структуре соединения гидрофобного ароматического заместителя толуола, за счёт которого оно может удерживаться на гидрофобных фрагментах эремомицина.

При 85 об.% неподвижная фаза проявляла преимущественно анионообменные свойства при $^s_pH < 6.5$ ($^w_pH < 3.76$), а также в присутствии ацетатного буферного раствора w_pH 3.76, в котором при 90 об.% ацетонитрила были отмечены цвиттер-ионные свойства сорбента (рис. 33Б). При w_pH 2.85 показано увеличение притяжения анионов и отталкивания катионов с возрастанием содержания воды в элюенте. Данные наблюдения демонстрируют влияние ацетонитрила на поведение неподвижной фазы.

На основании полученных закономерностей можно сделать вывод о том, что силикагель, модифицированный эремомицином, может проявлять катионо-, анионообменные и цвиттер-ионные свойства в режиме гидрофильной хроматографии в зависимости от s_pH элюента. Последние реализуются при $^w_pH \sim 4$ водной части подвижной фазы, содержащей 85-90 об.% ацетонитрила. Кроме того, неподвижная фаза имеет выраженную способность к образованию водородных связей и адсорбирует большее количество воды на поверхности, чем силикагель. Информация о механизмах удерживания даёт понимание о способах воздействия на удерживание и селективность.

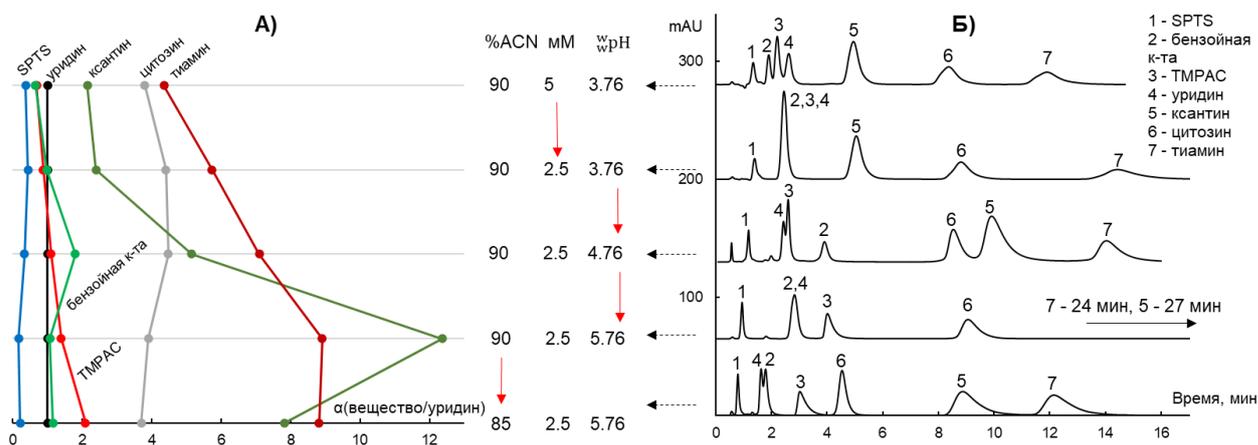


Рис. 36. Влияние pH, концентрации элюирующего иона и содержания ацетонитрила на селективность на сорбенте С2 (размер колонки 50×3 мм). А) Коэффициенты селективности по отношению к уридину; Б) хроматограммы модельной смеси. Условия: натрий ацетатный буферный раствор AcONa/AcOH; w_pH , концентрация ацетата натрия (элюирующего иона) и содержание ацетонитрила в об.% указаны на рисунке. Скорость потока 0.5 мл/мин, УФ детектирование при 254 нм.

На рис. 36 представлены примеры влияния pH, концентрации элюирующего иона и содержания ацетонитрила на селективность разделения модельной смеси веществ. При использовании подвижной фазы w_pH 3.76, содержащей 90 об.% ацетонитрила и 2.5 мМ концентрации соли, пики катиона, слабой кислоты и нейтрального соединения (ТМРАС, бензойной кислоты и уридина) не разрешены. Для увеличения селективности разделения наилучшим вариантом является изменение концентрации соли, влияющей в основном на удерживание аналитов, имеющих заряд. При w_pH , близком к 4, увеличение концентрации приводит к уменьшению удерживания как катиона, так и кислоты, но в разной степени, что приводит к разрешению пиков данных веществ. Варьированием pH и доли ацетонитрила можно достичь разделение двух веществ из трёх.

4.3. Влияние типа функциональных групп сорбента на закономерности удерживания тестовых веществ

Поскольку было отмечено сохранение закономерностей удерживания кислот с $w_pK_a > 4$ и катионов при варьировании pH после модифицирования силикагеля эремоницином, то предположили, что они будут иметь аналогичный вид и для сорбентов с другими функциональными слоями. Для проверки гипотезы провели изучение четырёх неподвижных фаз, включающих коммерчески доступные (диол, аминопропилсиликагель, полиамин) и разработанную в лаборатории хроматографии МГУ с гиперразветвлённым цвиттер-ионным слоем. Структура сорбентов и

характеристики колонок представлены в табл. 9 на стр. 55. Для сокращения времени, требуемого для описания одной колонки, характеризацию её свойств проводили с использованием 11 веществ-представителей разных групп аналитов (выделены зелёным в табл. 11 на стр. 59) при трёх $w\text{pH}$ 2.85, 4.26, 5.76 и варьировании концентрации соли при $w\text{pH}$ 2.85 и 5.76 в элюенте, содержащем 90 об.% ацетонитрила. Поскольку $w\text{pH}$ 2.85 создавали с помощью формиатного буферного раствора, а $w\text{pH}$ 4.26 и 5.76 – ацетатного, то возможно наложение влияния природы буферного раствора на эффекты, возникающие при варьировании pH. Оценка сродства карбоксилат-ионов представлена в табл. 19 на стр. 82. В случае полиамина (С5) и цвиттер-ионной фазы (С6) формиат и ацетат имеют схожие характеристики, в остальных случаях ацетат имеет большее сродство к неподвижной фазе, что может приводить к занижению факторов удерживания анионов на анионообменниках и завышению для катионов на катионообменниках. Для контроля данного эффекта служит измерение факторов удерживания при промежуточном значении $w\text{pH}$ 4.26. При переходе от $w\text{pH}$ 4.26 к 5.76 природа буферного раствора не меняется, что позволяет наблюдать только эффект pH.

Для проверки влияния ацетата на ионный обмен на аминопропилсиликагеле провели варьирование его концентрации при $w\text{pH}$ 4.76, а затем нитрата натрия. Нитрат удерживается на сорбентах в условиях ГИХ значительно хуже ацетата (табл. 19 стр. 82), из чего можно предположить, что, будучи компонентом подвижной

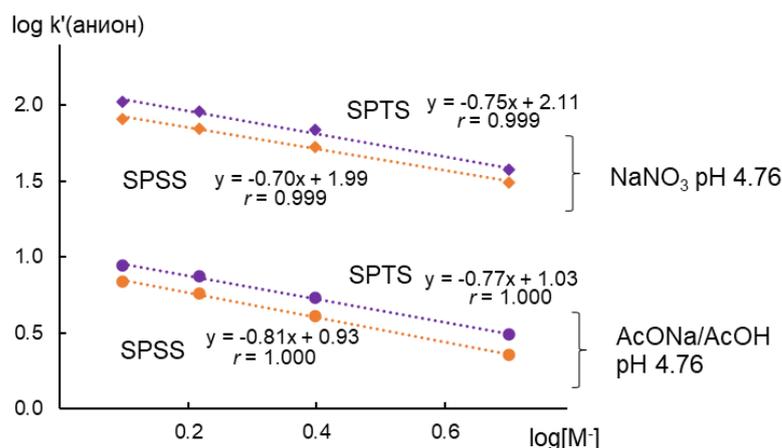
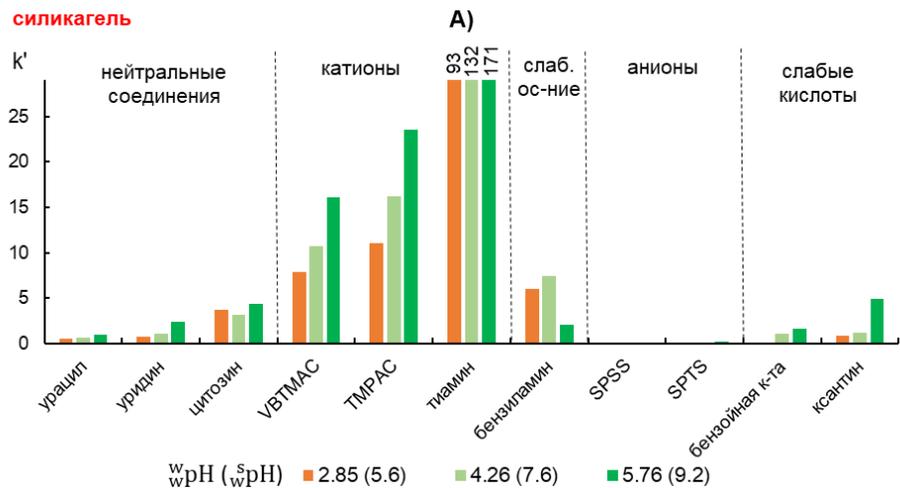


Рис. 37. Зависимости факторов удерживания анионов п-толуолсульфоната SPTS и п-стиролсульфоната SPSS от концентрации элюирующего аниона в подвижной фазе на аминопропилсиликагеле С4. Условия: AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 4.76 / ацетонитрил 10/90 об.% (круглый маркер), $\text{NaNO}_3/\text{ацетонитрил}$ 10/90 об.% после уравнивания колонки составом AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 4.76 / ацетонитрил 10/90 об.% (ромб); диапазон концентраций соли в элюенте 1.25-5 мМ.

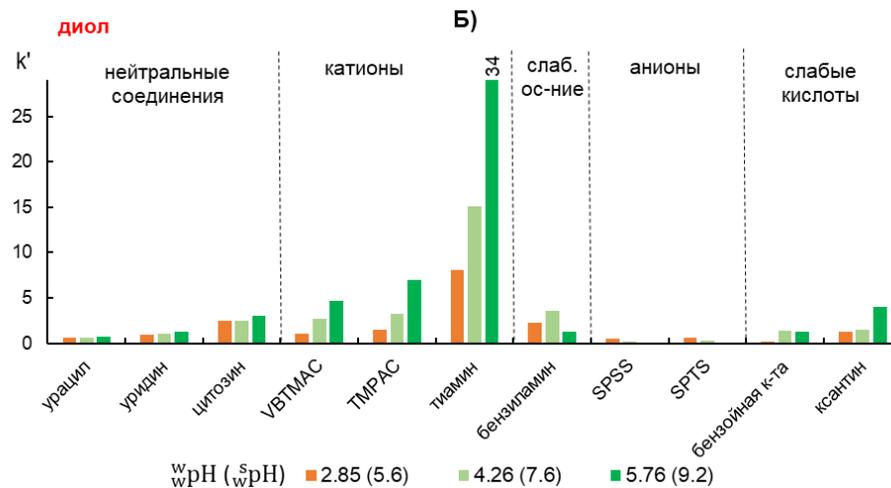
фазы, он участвует только в процессе ионного обмена. В присутствии нитрата анионы имели бóльшие факторы удерживания на аминофазе (рис. 37), что согласуется с его меньшим сродством и, следовательно, элюирующей силой. При этом угловые коэффициенты билигарифмической зависимости $\log k' - \log [M^-]$ анионов практически совпадали в случае нитрата и ацетата. Таким образом, концентрирование ацетата в водном слое сорбента не оказывает влияния на процесс ионного обмена, что позволяет использовать угловые коэффициенты подобных зависимостей для оценки вклада ионного обмена.

Как видно из рис. 38, закономерности удерживания тестовых веществ с увеличением рН на разных неподвижных фазах имели одинаковый вид: удерживание катионов и ксантина – возрастало, анионов – уменьшалось, бензиламина – проходило через максимум. Для бензойной кислоты наблюдали расхождения в трендах при переходе от ^wpH 4.26 к 5.76, однако от ^wpH 2.85 к 4.26 или 5.76 удерживание возрастало во всех случаях. Удерживание нейтральных соединений изменялось в меньшей степени. Одинаковый вид зависимостей связан с изменением заряда сорбентов при возрастании рН. Увеличение отрицательного заряда неподвижной фазы за счёт диссоциации кислотных групп, включая силанольные, равноценно уменьшению положительного из-за депротонирования аминогрупп. При этом более сложные закономерности для слабых кислот и оснований, константы диссоциации $^s\text{p}K_a$ которых входят в рассматриваемый диапазон ^spH , в первую очередь вытекают из изменения собственной степени диссоциации, которая определяет их гидрофильность. Также необходимо обратить внимание на относительные факторы удерживания веществ одного заряда. Для катионов и анионов наблюдали следующие порядки элюирования на всех неподвижных фазах: VBTMAC < TMPAC < тиамин и SPSS < SPTS, что в первом случае согласуется с гидрофильностью ионов, а во втором – нет. Бóльшее удерживание также имеют менее гидрофильные бензоат и ксантин по сравнению с п-толуолсульфонатом (SPTS) при ^wpH 5.76, что было отмечено в разделе 4.2.1. Порядок выхода нейтральных соединений в большинстве случаев сохранялся: урацил < уридин < цитозин. Однако на аминопропилсиликагеле и полиамине при ^wpH 5.76 цитозин элюировался до уридина, что, связано с различиями в механизме удерживания соединений.

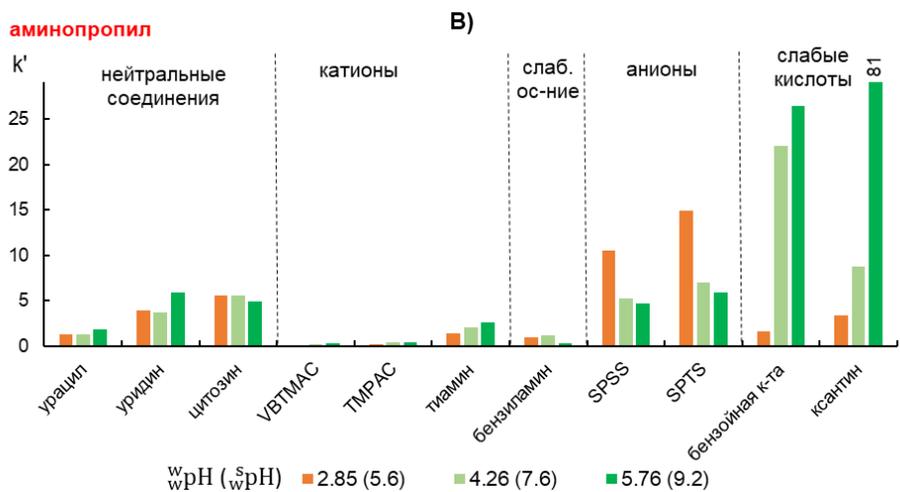
силикагель



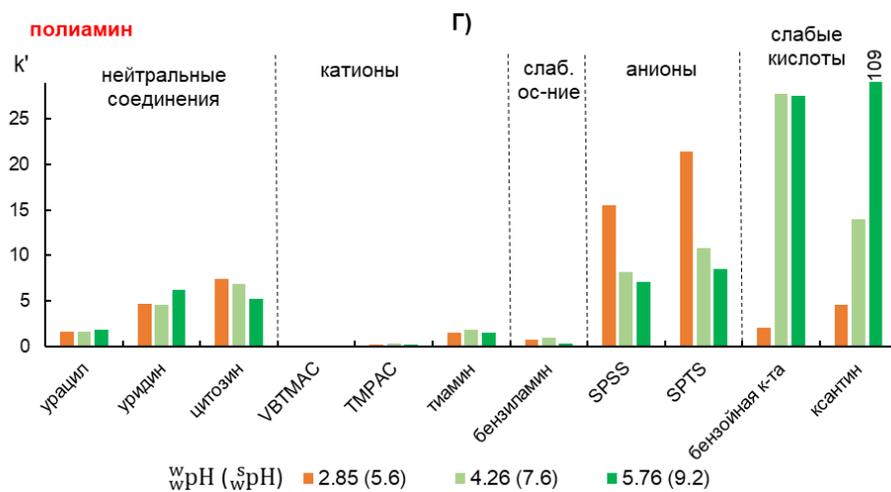
диол



аминопропил



полиамин



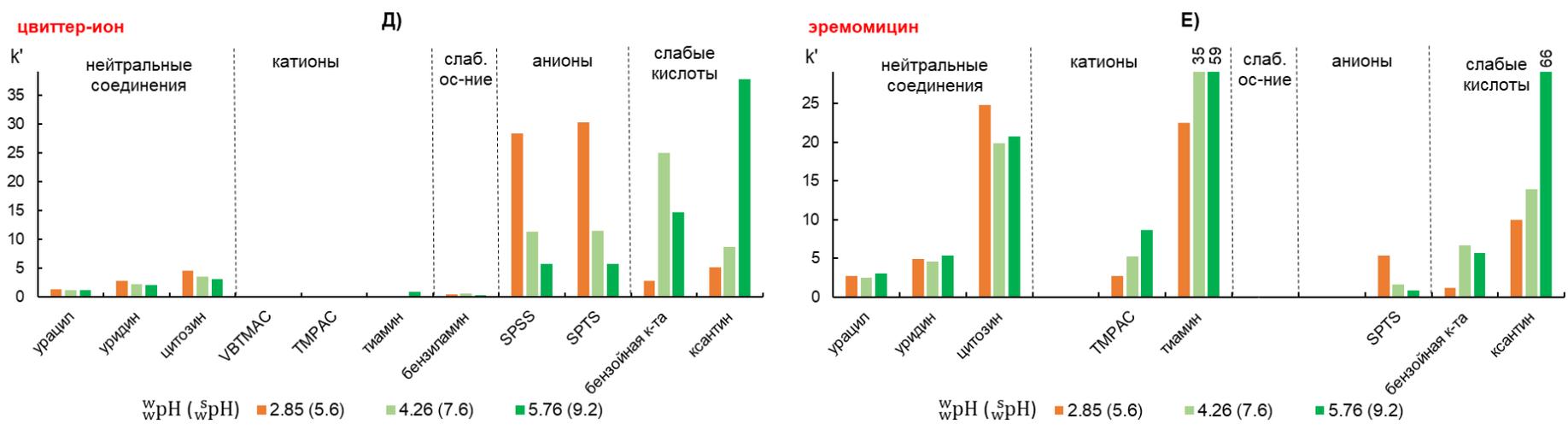


Рис. 38. Влияние рН элюента на удерживание катионов, анионов, слабых кислот, оснований и нейтральных соединений при 2.5 мМ концентрации соли (формиата или ацетата натрия) в подвижной фазе на А) силикагеле С1, Б) диоле С3, В) аминопропилсиликагеле С4, Г) полиамине С5, Д) цвиттер-ионном сорбенте С6, Е) силикагеле, модифицированном эремомоцином С2. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%, буферные раствор: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ w_{pH} 2.85, AcONa/AcOH w_{pH} 4.26, AcONa/AcOH w_{pH} 5.76.

Таблица 25. Угловые коэффициенты зависимостей $\log k' = s \cdot \log[M] + const$ для тестовых веществ на силикагеле, диоле, аминопропилсиликагеле, полиамине, цвиттер-ионном сорбенте и силикагеле, модифицированном эремомицином, при разных рН элюента. Зеленый цвет – $s < 0$ (ионный обмен), оранжевый – $s > 0$ (отталкивание). Диапазон концентраций соли в элюенте 1.25-7.5 мМ. Условия указаны в подписи к рис. 38

Неподвижная фаза	w_{pH}	VBTMAC	TMPAC	тиамин	бензиламин	SPSS	SPTS	бензойная кислота	ксантин
силикагель С1	2.85	-0.27	-0.23	-0.1	-0.30	*	*	0.32	0
	5.76	-1.3	-1.1	-1.1	-0.38	*	1.2	0.73	0.8
диол С3	2.85	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.76	-0.73	-0.72	-0.77	-0.2	*	1.6	0.58	0.48
аминопропил-силикагель С4	2.85	*	*	0.81	0.44	-0.91	-0.94	-0.83	0
	5.76	0.8	0.65	0.57	0.36	-0.82	-0.75	-0.78	-0.4
полиамин С5	2.85	*	*	1.0	0.73	-0.97	-0.96	-0.83	0
	5.76	1.7	1.2	0.81	0.46	-0.80	-0.74	-0.66	-0.4
цвиттер-ионный С6	2.85	*	*	*	0.58	-0.90	-0.90	-0.62	0
	5.76	*	*	0.2	0.2	-0.52	-0.52	-0.43	-0.4
силикагель, модифицированный эремомицином С2	2.85	**	0.30	0.28	**	**	-0.75	-0.59	0
	5.76	**	-0.58	-0.63	**	**	0.44	0.18	0

* не удерживается при низких концентрациях; ** не тестировали.

Различия закономерностей заключались в абсолютных величинах факторов удерживания веществ. Во-первых, в зависимости от кислотно-основных свойств модификаторов силикагеля на удерживание заряженных аналитов влияло электростатическое притяжение или отталкивание (табл. 25). В случае диольной фазы закреплённые на матрице радикалы нейтральны, проявление катионообменных свойств связано с остаточными силанольными группами. Однако по сравнению с силикагелем влияние концентрации соли в элюенте на удерживание заряженных веществ на диоле при w_{pH} 2.85 отсутствует, а при w_{pH} 5.76 меньше (табл. 25). На диоле при w_{pH} 2.85 факторы удерживания анионов сульфокислот ($k' = 0.5-0.6$) сопоставимы с таковыми для катионов TMPAC и VBTMAC ($k' = 1.1-1.5$), что соответствует практически нейтральному заряду сорбента.

Разработанный сорбент С6, в структуре которого предполагаемо содержатся аминогруппы разной степени замещённости, цвиттер-ионные таурин и иминодиуксусная кислоты (табл. 9 стр. 55), имел преобладающие анионообменные свойства. Это определяло практически нулевое удерживание катионов и

существенное для анионов аналогично аминопропилсиликагелю и полиамину. Возможно, за счёт кислотных карбоксильных и сульфогрупп в структуре функционального слоя сорбента, вклад ионного обмена в удерживание анионов SPTS и SPSS, а также бензоат-иона при $w\text{pH}$ 5.76 был ниже, чем на аминофазах.

Как было отмечено при подробном рассмотрении трендов удерживание на силикагеле с привитым эремомицином на удерживание бензойной кислоты, предпологаемо находящейся преимущественно в молекулярной форме при $w\text{pH}$ 2.85, существенно влияет концентрация элюирующего иона. Данная закономерность была также обнаружена и на других неподвижных фазах, содержащих аминогруппы. Благодаря данному эффекту варьирование концентрации соли при низких рН является дополнительным параметром влияния на удерживание слабых кислот, нейтральные формы которых гидрофобны.

Во-вторых, на неподвижных фазах адсорбируется разное количество воды, влияя на вклад механизма распределения. Предполагают, что данный механизм реализуется для всех полярных и заряженных соединений в условиях гидрофильной хроматографии. По соотношению объёмов фаз сорбенты соотносились следующим образом: силикагель (C1) < диол (C3) < цвиттер-ионный (C6) \approx аминопропилсиликагель (C4) < силикагель, модифицированный эремомицином (C2) < полиамин (C5), от силикагеля до полиамина увеличиваясь в ~ 3 раза. В-третьих, на факторы удерживания влияет средний размер пор [70]. В случае диола он составляет 300 Å, что примерно в 3 раза больше, чем у остальных сорбентов. Чем больше размер пор, тем ниже удерживание. Следовательно, меньшие факторы удерживания катионов и бензиламина на диоле по сравнению с силикагелем, вероятно, связаны не только с уменьшением вклада ионного обмена, но и увеличением диаметра пор.

Таким образом, увеличение рН элюента даёт качественно схожий эффект на удерживание ионизируемого соединения вне зависимости от структуры модификаторов силикагеля. Это делает данный параметр подвижной фазы удобным инструментом для изменения удерживания аналитов в заранее известном направлении. Полученные профили удерживания веществ разных кислотно-основных свойств в перспективе позволят выявлять состав элюента и подходящую неподвижную фазу, обеспечивающие селективное разделение смесей, что может служить основой для выбора условий анализа компонентов конкретных реальных

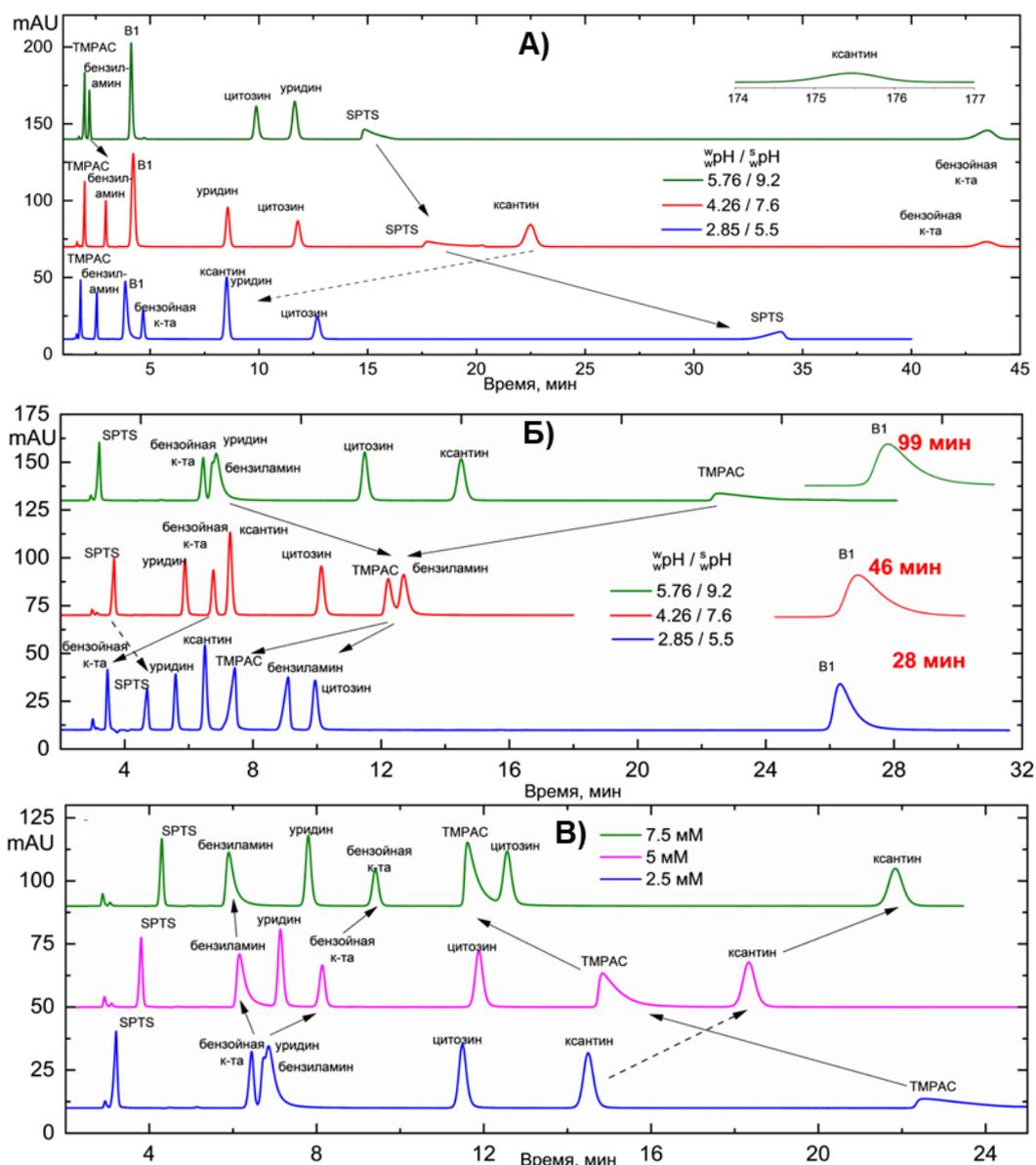


Рис. 39. Хроматограммы модельной смеси (табл. 13 стр. 64), полученные на А) полиамине С5 и Б) диоле С3 при разных w_{pH} / s_{pH} , концентрация соли 2.5 мМ в элюенте; В) на диоле С3 при разной концентрации Na^+ при w_{pH} / s_{pH} 5.76. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%, буферный раствор: $HCOONa/HCOOH$ w_{pH} / s_{pH} 2.85, $AcONa/AcOH$ w_{pH} / s_{pH} 4.26, $AcONa/AcOH$ w_{pH} / s_{pH} 5.76. Размеры колонок: полиамин (150×4.6 мм), диол (250×4.6 мм); скорость потока 1 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.

объектов. Примеры влияния pH подвижной фазы на селективность разделения модельных смесей представлены на рис. 39 и в Приложении 4 и 5. Увеличение концентрации элюирующего иона позволяет не только улучшать селективность отличающихся по заряду пар веществ, но и повышать эффективность и сокращать время анализа (рис. 39В). При этом изменение удерживания в сторону увеличения или уменьшения зависит от того, какие свойства, катионо- или анионообменные, преобладают для конкретной неподвижной фазы.

4.4. Установление связи термодинамических параметров и механизма удерживания

По зависимости $\ln k' - 1/T$ (уравнение Вант-Гоффа (24) стр. 29) могут быть установлены термодинамические параметры удерживания. Они дают ценную информацию о механизме удерживания аналита. Однако в условиях гидрофильной хроматографии мало данных о связи энтальпии удерживания и поведения веществ в системе, установленного варьированием других параметров (концентрации элюирующего иона, доли воды, pH).

Для получения зависимостей $\ln k' - 1/T$ для тестовых аналитов на немодифицированном силикагеле (С1) и аминопропилсиликагеле (С4) варьировали температуру колонки в диапазоне 25-55°C в пределах термической стабильности фаз (рис. 40, рис. 41). Эксперимент проводили при двух w_pH и концентрациях элюирующего иона. Перечень тестовых ионов был дополнен структурно похожими соединениями для выяснения влияния тех или иных фрагментов на удерживание веществ: четвертичные амины с различными заместителями – ТМРАС, ВТМАС, ВВТМАС, ВТЕАС, тиамин; сульфонаты – SBS, SPTS, SPSS (табл. 11 стр. 59).

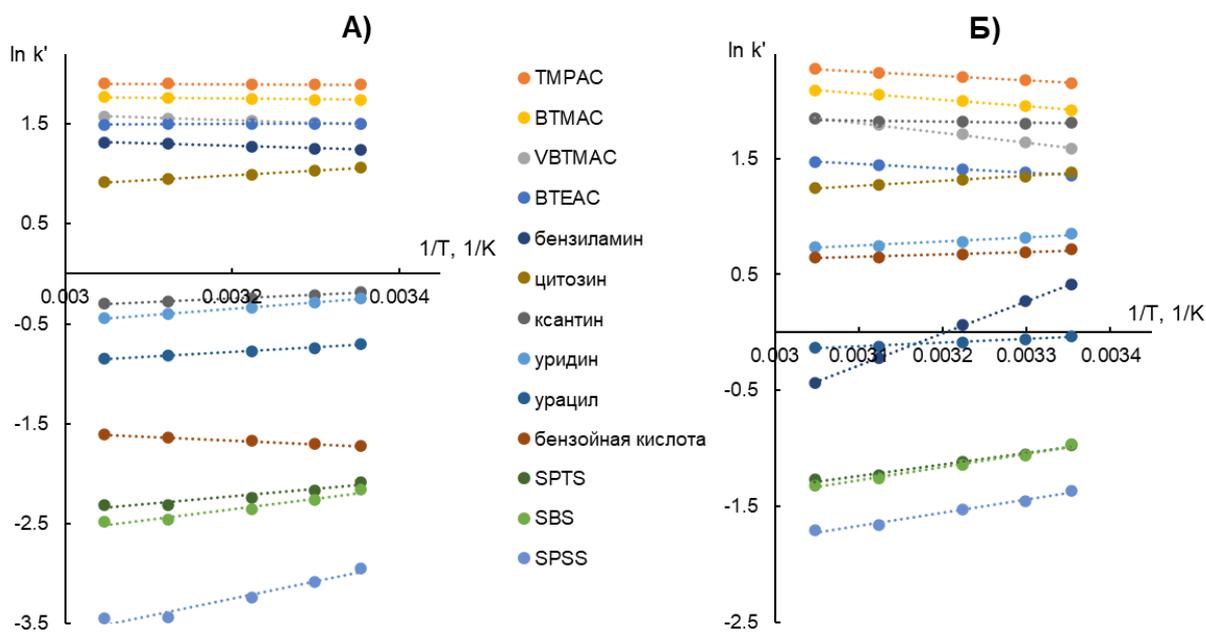


Рис. 40. Зависимости факторов удерживания тестовых веществ на силикагеле С1 от температуры колонки при А) w_pH 2.85 и Б) w_pH 5.76. Условия: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ w_pH 2.85 или AcONa/AcOH w_pH 5.76 / ацетонитрил 10/90 об.%, концентрация соли в элюенте 5 мМ. Диапазон варьирования температуры колонки 25-55°C.

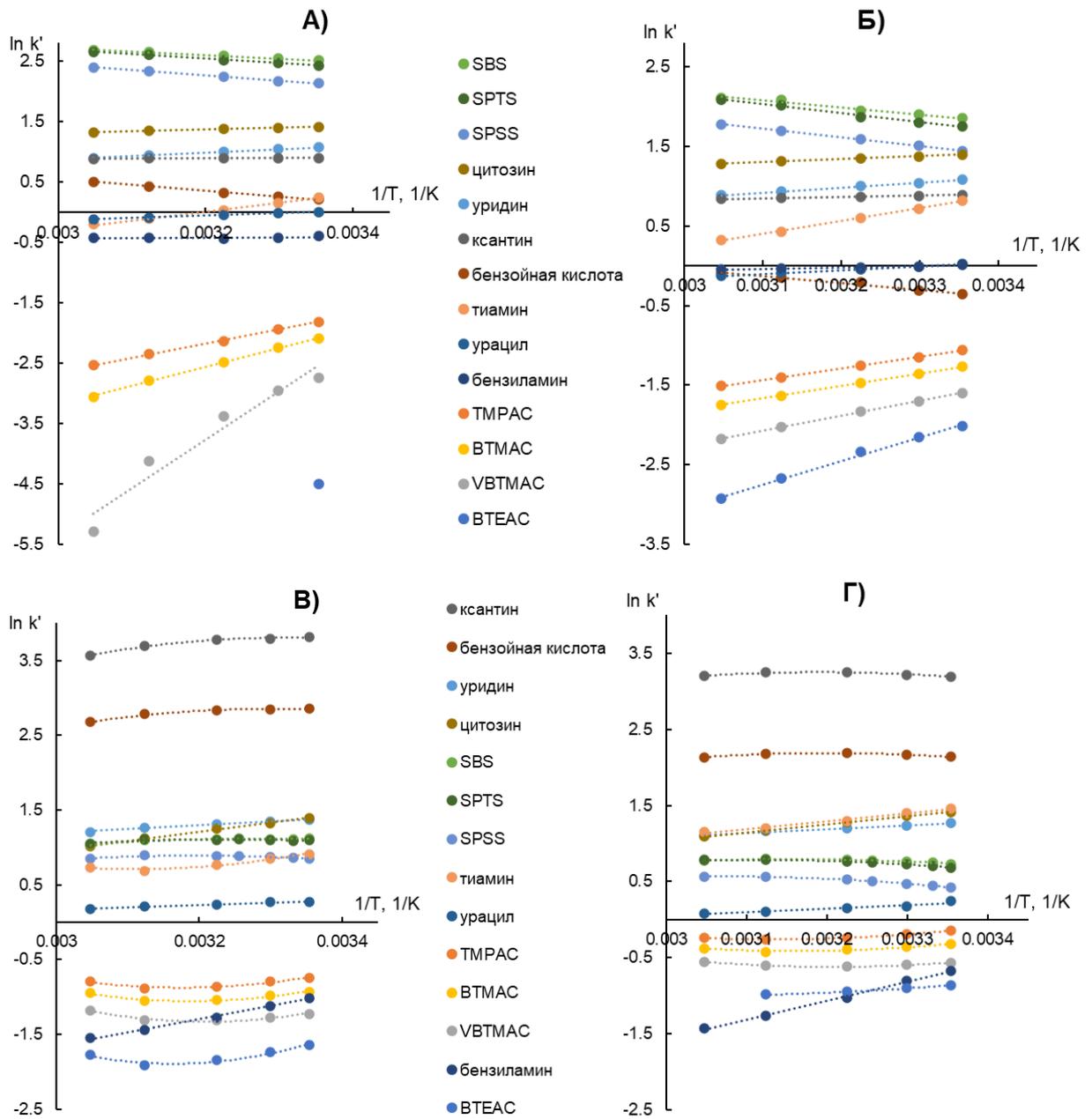


Рис. 41. Зависимости факторов удерживания тестовых веществ на аминоприсиликагеле С4 от температуры колонки при А) $w_{\text{pH}} 2.85$, 2.5 мМ соли в элюенте, Б) $w_{\text{pH}} 2.85$, 5 мМ соли, В) $w_{\text{pH}} 5.76$, 2.5 мМ соли, Г) $w_{\text{pH}} 5.76$, 5 мМ соли. Условия: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w_{\text{pH}} 2.85$ или AcONa/AcOH $w_{\text{pH}} 5.76$ / ацетонитрил 10/90 об.%. Диапазон варьирования температуры колонки 25-55°C.

На силикагеле полученные зависимости $\ln k' - 1/T$ при двух w_{pH} были линейны для большинства тестовых веществ (рис. 40), из угловых коэффициентов которых были рассчитаны энтальпии удерживания, а по свободному члену судили о знаке энтропии (табл. 26). Для всех четвертичных аминов (TMPAC, BTMAC, VBTMAC, BTEAC) энтальпия удерживания возрастала с увеличением pH одновременно с увеличением их факторов удерживания преимущественно за счёт диссоциации силанольных групп. При $w_{\text{pH}} 5.76$ энтальпии катионов удерживания были

положительны. Следовательно, их удерживание в данных условиях на силикагеле являлось эндотермическим энтропийно-контролируемым процессом ($\Delta H^\circ > 0$, $\Delta S^\circ > 0$). При этом энтальпия уменьшалась с ростом гидрофильности $(\text{CH}_3)_3\text{RN}^+$, для R: винилбензил- (VBTMAC) > бензил- (BTMAC) > фенил- (TMPAC). Для слабого основания бензиламина было показано, что его удерживание при $w_{\text{pH}} 2.85$ также являлось эндотермическим процессом, тогда как при $w_{\text{pH}} 5.76$ – экзотермическим ($\Delta H^\circ < 0$, $\Delta S^\circ < 0$), что подтверждало отличие его механизма удерживания в данных условиях от такового, реализующегося для катионов. Для нейтральных соединений, слабых кислот и анионов энтальпия удерживания имела отрицательные значения. Для сульфонатов SBS, SPTS, SPSS энтропия удерживания также была меньше нуля. Вероятно, $\Delta H^\circ < 0$ свидетельствует о существенном вкладе распределения в удерживание, а $\Delta S^\circ < 0$ – о влиянии электростатического отталкивания.

Таблица 26. Энтальпии удерживания тестовых веществ (кДж/моль) на силикагеле и аминопропилсиликагеле при двух w_{pH} и концентрациях элюирующего иона в подвижной фазе, рассчитанные по уравнению Вант-Гоффа. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%, буферный раствор: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w_{\text{pH}} 2.85$, AcONa/AcOH $w_{\text{pH}} 5.76$. Диапазон варьирования температуры колонки 25-55°C. $n=5$, $R=0.95$. Зеленый цвет – $\Delta S^\circ > 0$, оранжевый – $\Delta S^\circ < 0$, не окрашено – знак зависит от величины соотношения фаз

Вещество	Силикагель С1		Аминопропилсиликагель С4			
	$w_{\text{pH}} 2.85$	$w_{\text{pH}} 5.76$	$w_{\text{pH}} 2.85$		$w_{\text{pH}} 5.76$	
	5 мМ	5 мМ	2.5 мМ	5 мМ	2.5 мМ	5 мМ
Урацил	-3.7±0.5	-3±1	-3.4±0.3	-3.9±0.2	-2.8±0.5	-4±2
Уридин	-5.4±0.8	-3±1	-4.7±0.3	-5.3±0.3	-4.2±0.8	-4±1
Цитозин	-3.8±0.4	-3.5±0.7	-2.5±0.4	-3.0±0.2	-10±1	-8.9±0.6
TMPAC	0.3±0.2	3.3±0.3	-19±1	-12.3±0.5	н/л*	н/л
BTMAC	0.8±0.1	4.6±0.5	-26±1	-13.0±0.5	н/л	н/л
VBTMAC	2.1±0.2	7.0±0.9	-70±30	-16±1	н/л	н/л
BTEAC	-0.14±0.09	3.2±0.5	**	-25±3	н/л	н/л
Тиамин	–	–	-12±1	-14±1	н/л	-8±2
Бензиламин	2.0±0.1	-23.0±0.9	0	-1.8±0.5	-15±2	-21±2
SBS	-9±4	-10±2	4.7±0.4	7±3	н/л	н/л 3±2***
SPTS	-6±4	-8±2	6.3±0.3	9±2	н/л	н/л 5±1***
SPSS	-14±6	-9±2	7.3±0.5	9±0.1	н/л 2.1±0.6***	н/л 6±1***
Бензойная кислота	3.1±0.5	-1.9±0.9	8±1	7±2	н/л	н/л
Ксантин	-3.2±0.6	н/л	0	-1.3±0.2	н/л	н/л

* н/л – нелинейная зависимость $\ln k' - 1/T$; ** не удерживается; *** в диапазоне температур 25-37°C.

На аминопропилсиликагеле зависимости Вант-Гоффа были линейны для большинства тестовых соединений при $w\text{pH}$ 2.85 в отличие от 5.76 (рис. 41). По-видимому, при $w\text{pH}$ 5.76 аминогруппы протонированы частично (pK_a аминогрупп ~ 7.3 [145]), а увеличение температуры влияет на константу их диссоциации, изменяя долю заряженных центров. При этом для термодинамических параметров сульфонат-анионов при $w\text{pH}$ 2.85 соблюдались закономерности, полученные на силикагеле для катионов: $\Delta H^\circ > 0$, $\Delta S^\circ > 0$, энтальпия уменьшалась с ростом гидрофильности заместителя p -стирол- $>$ p -толуол- $>$ бензолсульфонат. Бензойная кислота имела близкую к анионам величину энтальпии и положительную энтропию, что подтверждало сходство их механизмов удерживания в данных условиях. Для четвертичных аминов, отталкивающихся от аминофазы, термодинамические параметры имели отрицательные значения ($\Delta H^\circ < 0$, $\Delta S^\circ < 0$) по аналогии с анионами на силикагеле. Увеличение концентрации элюирующего иона при $w\text{pH}$ 2.85 приводило к возрастанию энтальпии удерживания анионов и снижению для катионов с гидрофобными заместителями, что, вероятно, связано с подавлением электростатических взаимодействий. Для урацила, уридина и цитозина энтальпии имели отрицательные значения, схожие по величине с таковыми на силикагеле, кроме более низкой величины у цитозина на аминопропилсиликагеле при $w\text{pH}$ 5.76. Вывод о сходстве или различии механизмов удерживания сделать затруднительно, поскольку необходима информация об энтропии, величина которой зависит от соотношения объёмов фаз.

Таким образом, показано влияние условий (pH , концентрации элюирующего иона и природы неподвижной фазы) на термодинамические параметры удерживания тестовых веществ. Было установлено, что удерживание ионов с гидрофобными заместителями на противоположно заряженных фазах является энтропийно-контролируемым процессом ($\Delta H^\circ > 0$, $\Delta S^\circ > 0$), тогда как на одноименно заряженных – энтальпийно-контролируемым ($\Delta H^\circ < 0$, $\Delta S^\circ < 0$).

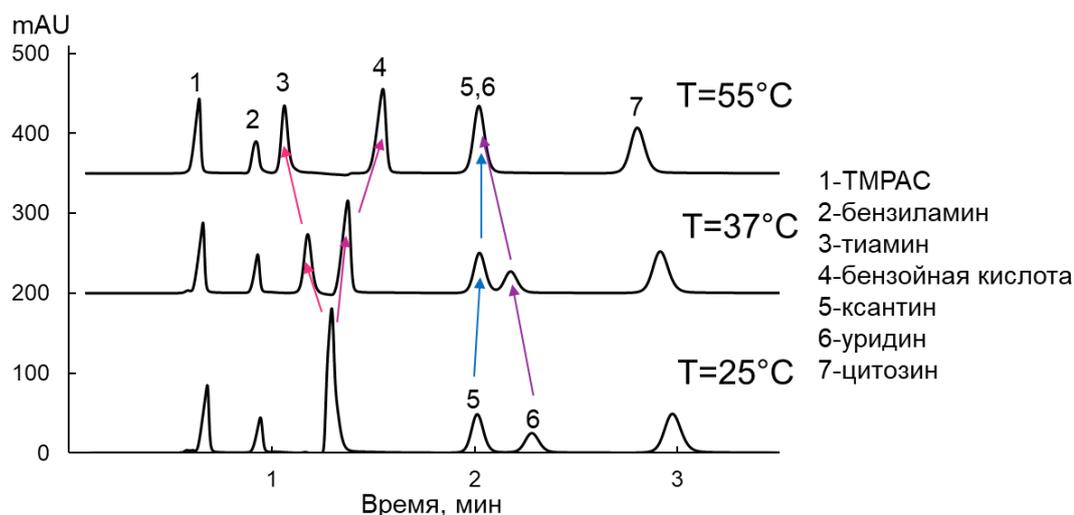


Рис. 42. Хроматограммы разделения модельной смеси веществ разных кислотно-основных свойств на аминопропилсиликагеле C4 (размер колонки 100×3 мм) при термостатировании колонки при 25, 37 и 55°C. Условия: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ w/w pH 2.85/ацетонитрил 10/90 об.%, концентрация соли – 2.5 мМ; скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование при 254 нм.

Приведенные на рис. 40 и рис. 41 зависимости иллюстрируют возможности изменения селективности разделения веществ за счёт варьирования температуры колонки. Несмотря на то, что в большинстве случаев времена удерживания веществ с увеличением температуры изменяются незначительно, однако в совокупности с возрастанием эффективности этого может быть достаточно для разделения критических пар соединений (рис. 42).

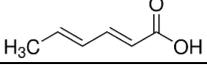
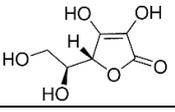
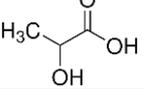
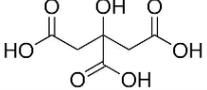
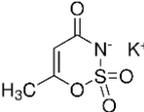
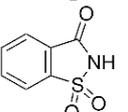
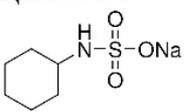
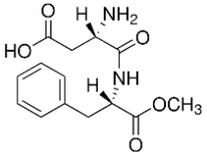
4.5. Пример выбора условий разделения компонентов реального объекта

Отталкиваясь от кислотно-основных свойств и информации о гидрофильно-гидрофобном балансе молекулярной структуры анализов ($\log P$) и имея углубленное понимание о свойствах неподвижных фаз, можно выбирать начальные условия разделения смесей. А основываясь на закономерностях удерживания, можно в дальнейшем улучшать разрешение пиков.

В качестве примера конкретной многокомпонентной смеси использовали негазированный спортивный напиток «ISOCARB» (Sport Technology Nutrition, Россия), который по информации производителя содержал полярные органические компоненты – водорастворимые витамины, искусственные подсластители, регуляторы кислотности и консерванты. Круг анализов, которые потенциально можно определить с применением широкодоступного хроматографического оборудования со спектрофотометрическим детектированием, был ограничен 12

соединениями. Используя программный пакет ACD/Labs, предварительно рассчитывали их $\log P$, $\log D$, pK_a (табл. 27). Аналиты характеризовались различными кислотно-основными свойствами: слабые основания и кислоты, положительно и отрицательно заряженные, цвиттер-ион.

Таблица 27. Полярные органические компоненты напитка «ISOCARB» и их свойства

Аналит	Тип	pK_a	$\log P$	$\log D$	Максимум поглощения, нм
Бензойная кислота	HA	4.2	1.6	-1.6	198, 230
Сорбиновая кислота 	HA	4.8	1.3	-2.5	259
Аскорбиновая кислота 	HA	4.1	-2.8	-6.2	244, 190
Молочная кислота 	HA	3.9	-0.9	-4.6	190, 211
Лимонная кислота 	HA	3.1 4.8 6.4	-1.2	-7.00 трёхзарядный анион	190
Ацесульфам 	A ⁻	-0.3	-	-2.9	230
Сахарин 	A ⁻	1.6	0.9	-1.1	200
Цикламат 	A ⁻	1.5	1.0	-2.5	190
Никотинамид (витамин B3)	BH ⁺	3.5	0.4	-2.8	190, 215, 262
Пиридоксин (витамин B6)	BH ⁺	5.0 9.6	-0.8	-3.3	195, 290
Тиамин (витамин B1)	B ⁺	BH ⁺⁺ 4.8	-	-4.4	192, 234, 267
Аспартам 	HA BH ⁺	3.7 7.6	-	-1.7 цвиттер-ион	200

При выборе начальных условий разделения, которые позволили бы достичь высокой селективности, эффективности и экспрессности, принимали во внимание:

- преобладание числа кислотных соединений над остальными;
- уменьшение силы оснований в водно-ацетонитрильной среде по сравнению с водной, приводящее к малой степени протонирования в рабочем диапазоне рН для неподвижных фаз на основе силикагеля;
- высокую гидрофильность катиона тиамин, а также анионов аскорбиновой и лимонной кислот ($\log D < -4$);
- возможное влияние концентрации элюирующего иона на удерживание слабо диссоциированных относительно гидрофобных соединений, таких как бензойная и сорбиновая кислоты.

Для обеспечения удерживания кислот и анионов предпочтительнее использовать неподвижную фазу с преобладающими анионообменными свойствами, на которой может удерживаться высокогидрофильный тиамин за счёт распределения, особенно при более высоких концентрациях соли в элюенте, а также практически нейтральные никотинамид и пиридоксин. Диссоциация аскорбиновой и лимонной кислот может привести к высоким временам удерживания, что делает предпочтительным использование элюентов с низким рН. Таким образом, в качестве неподвижной фазы был выбран силикагель, модифицированный полиамином (УМС-Pack Polyamine II), с преобладающими анионообменными свойствами и наибольшим водным слоем, обеспечивающим распределение (см. раздел 4.3). Предложили элюент с низким $w_p \text{pH} \sim 3$ и относительно высокой концентрацией элюирующего иона (50 мМ в водной части). Использование подвижной фазы 0.45 М $\text{HCOOH}/\text{HCOONa}$ $w_p \text{pH} 2.85$ / ацетонитрил 10/90 об.% позволило без дополнительных экспериментов разделить 8 аналитов (рис. 43). Время анализа составило 11 минут при скорости потока 1.8 мл/мин (1.4 мм/с), которая примерно эквивалентна 1 мл/мин на колонках 3 мм диаметра. В образце напитка удалось обнаружить 5 соединений. Однако форматный буферный раствор поглощает УФ излучение при 200 нм и ниже, что влияет на чувствительность и делает невозможным определение аскорбиновой, лимонной, молочной кислот и цикламата. Дальнейшие пути выбора условий разделения связаны в первую очередь с заменой буферного раствора, эффект от которого на удерживание аналитов предсказать практически невозможно.

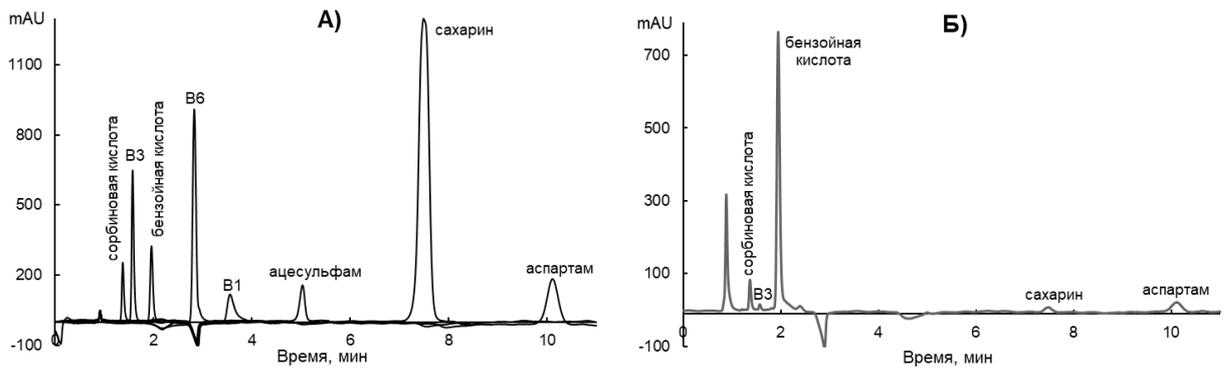


Рис. 43. Хроматограммы А) стандартных растворов: сорбиновая кислота – 50 мг/л, В3 – 50 мг/л, бензойная кислота – 10 мг/л, В6 – 100 мг/л, В1 – 50 мг/л, ацесульфам – 1000 мг/л, сахарин – 100 мг/л, аспартам – 200 мг/л; Б) спортивного напитка. Условия: полиамин С5 (размер колонки 150×4.6мм), 0.45 М НСООН/НСООНa w_{pH} 2.85 / ацетонитрил 10/90 об.%, скорость потока 1.8 мл/мин, УФ-детектирование при 200 нм.

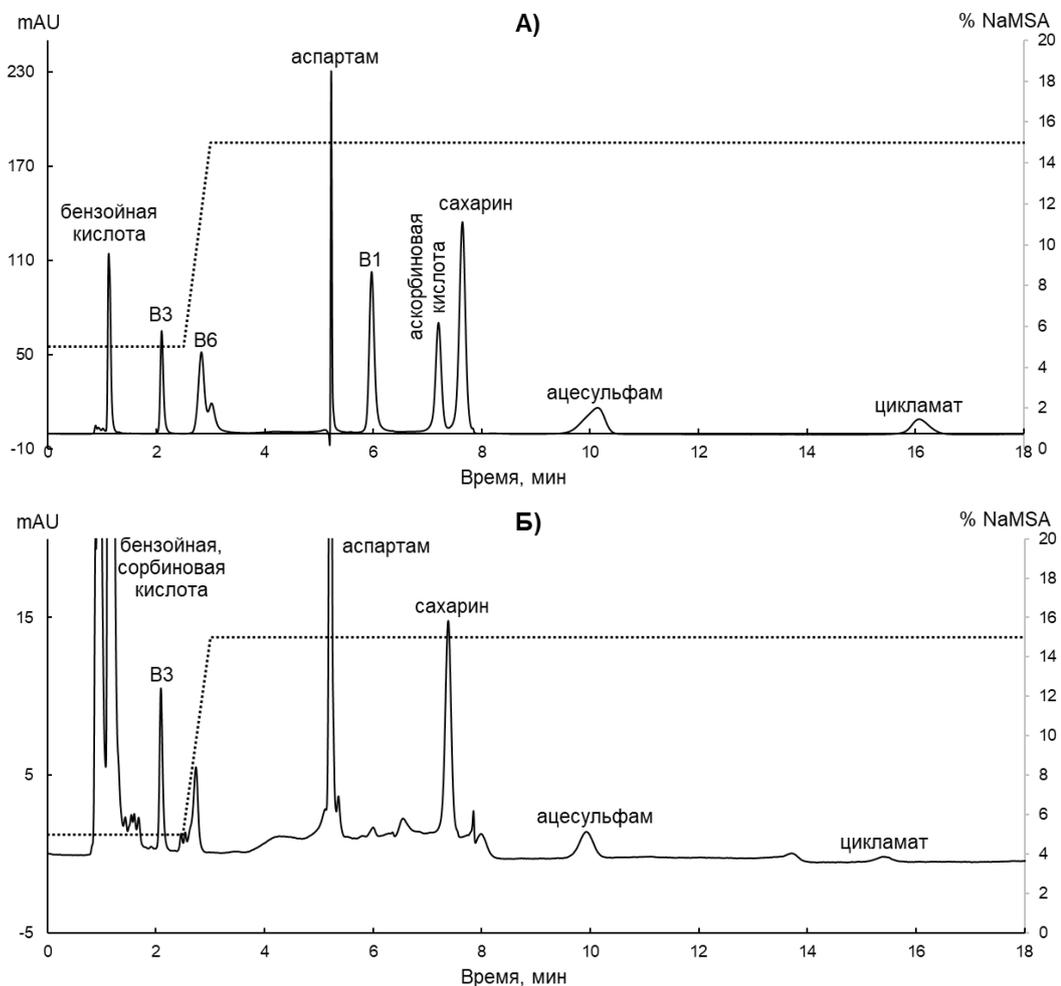


Рис. 44. Хроматограммы А) модельной смеси: бензойная кислота – 2 мг/л, В3 – 7 мг/л, В6 – 7 мг/л, аспартам – 13 мг/л, В1 – 33 мг/л, аскорбиновая кислота – 66 мг/л, сахарин – 33 мг/л, ацесульфам – 330 мг/л, цикламат – 330 мг/л, Б) спортивного напитка. Условия: полиамин С5 (размер колонки 4.6×150 мм), градиентное элюирование: 50 мМ метансульфонат натрия NaMSA w_{pH} 3.0 / ацетонитрил 5/95 об.% (0-2.5 мин) – 15/85 об.% (3-18 мин), скорость потока 1.8 мл/мин, УФ-детектирование при 200 нм.

Замена формиатного буферного раствора на фосфатный (80 об.% ацетонитрила) привела к увеличению чувствительности и обращению порядка элюирования веществ: тиамин и пиридоксин имели высокие времена удерживания, тогда как бензойная, сорбиновая, молочная кислоты, ацесульфам и сахарин не удерживались. В качестве альтернативной добавки к подвижной фазе, слабо поглощающей при 190-200 нм и имеющей хорошую растворимость в присутствии ацетонитрила, протестировали метансульфонат [95]. В результате с использованием градиентного элюирования удалось разделить 9 соединений за 18 минут, в напитке были обнаружены 7 соединений (рис. 44). Для молочной и лимонной кислот получены высокие пределы обнаружения (90 мг/л). Кроме того, практически нулевая буферная ёмкость элюента приводила к флуктуации времен удерживания веществ, что ограничивало использование данных условий для проведения количественного анализа.

Рекомендациями по дальнейшему улучшению условий могут быть, во-первых, использование смеси добавок для достижения стабильного рН подвижной фазы. Во-вторых, альтернативным решением может быть использование хроматографической системы с испарительным детектором по светорассеянию с элюентом, содержащим летучий аммонийно-формиатный буферный раствор в первоначальных условиях или с небольшой их корректировкой.

Таким образом, на основании полученных закономерностей и информации о механизмах удерживания успешно выбрана неподвижная фаза, а также состав элюента, позволившие без дополнительных экспериментов сразу разделить большую часть компонентов реальной смеси. Дальнейшая доработка условий в первую очередь связана с выбором условий детектирования для повышения чувствительности.

Заключение из главы 4

Поскольку для изучения свойств неподвижных фаз были использованы вещества различных кислотно-основных свойств, это позволило не только получить подробную информацию о поведении фаз, но и самих аналитов, что является важным для развития метода гидрофильной хроматографии. В результате проведенного исследования установлены закономерности удерживания катионов, анионов, слабых кислот, оснований, цвиттер-ионных и нейтральных соединений на

немодифицированном силикагеле при варьировании рН, концентрации элюирующего иона и доли воды в подвижной фазе. Показано, как состав элюента влияет на вклад ионного обмена, распределения и адсорбции в удерживание тестовых веществ, что отражает изменение свойств неподвижной фазы. Показано влияние условий и заместителей в молекулах аналитов на термодинамические параметры их удерживания.

Установлено, что силикагель, модифицированный эремомицином, может проявлять катионо-, анионообменные и цвиттер-ионные свойства в режиме ГИХ в зависимости от ${}^s_p\text{pH}$ элюента. Последние реализуются при ${}^w_p\text{pH} \sim 4$ водной части подвижной фазы, содержащей 85-90 об.% ацетонитрила. Кроме того, неподвижная фаза имеет выраженную способность к образованию водородных связей и адсорбирует в одинаковых условиях большее количество воды на поверхности, чем силикагель.

Установлено, что увеличение рН даёт качественно схожий эффект на удерживание кислот и оснований вне зависимости от структуры модификаторов силикагеля, несмотря на различие в ионообменных свойствах неподвижных фаз. Это делает данный параметр подвижной фазы удобным инструментом для изменения удерживания аналитов в заранее известном направлении.

Оценены константы диссоциации s_pK_a в присутствии 90 об.% ацетонитрила для 4-метилбензойной кислоты (7.4), 4-метоксибензойной кислоты (7.5), бензойной кислоты (7.1), ксантина (~9), 4-диметиламинопиридина, 4-аминопиридина, бензиламина (~8-9) и цитозина (~4), в присутствии 85 об.% ацетонитрила – бензойная кислота (~6.5), ксантина (~8.5).

Полученные данные о поведении неподвижных фаз и широкого круга веществ в условиях ГИХ позволили спрогнозировать условия разделения компонентов безалкогольного негазированного напитка «ISOCARB». Также опирались на рассчитанные значения $\log P$, $\log D$ и констант диссоциации аналитов. Предложены рекомендации по дальнейшей доработке условий разделения и детектирования для проведения одновременного определения водорастворимых витаминов, искусственных подсластителей, регуляторов кислотности и консервантов.

ГЛАВА 5. Применение хемометрических подходов для сравнения селективности неподвижных фаз³

Сравнение неподвижных фаз с опорой на факторы удерживания и селективности разделения широкого круга тестовых веществ из разных классов обеспечивает более полную информацию об их свойствах, чем в случае использования ограниченного набора соединений, не отражающего все возможные механизмы удерживания. Однако тестирование большого количества веществ на разных сорбентах приводит к двум проблемам: необходимости сравнения больших объёмов данных и использования разных составов подвижной фазы для каждого класса аналитов, приводящего к проведению длительной стадии переуравновешивания колонок. Поэтому для обработки многомерных хроматографических данных привлекают хемометрические подходы. В данной работе впервые для установления сходств и различий в свойствах гидрофильных неподвижных фаз использовали сочетание метода главных компонент, иерархической кластеризации, метода K-средних, а также индекс Рэнда для сравнения результатов кластеризации (см. раздел 2.8). Применение двух подходов для кластеризации позволило увеличить надежность выводов. В случае хорошо разрешённых кластеров их состав должен совпадать (индекс Рэнда равен 1). Сорбенты, входящие в один кластер, т.е. находящиеся близко друг к другу в пространстве главных компонент, проявляют схожие свойства.

Матрица исходных данных включала факторы удерживания 33 соединений из 4 классов биологически активных веществ (табл. 28), измеренные на аминопропилсиликагеле (фаза C4_1, табл. 9 стр. 55) и 27 неподвижных фазах, полученных на его основе [118,119,123]. Для каждого класса веществ был использован определённый состав подвижной фазы в соответствии с их кислотно-основными свойствами и гидрофильностью, обеспечивающий приемлемые времена удерживания (в большинстве случаев менее 15 мин) и форму пиков. Азотистые основания и нуклеозиды тестировали в одних условиях, тогда как водорастворимые

³ 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:

Shemiakina A., Khrisanfov M., Chikurova N., Samokhin A., Chernobrovkina A. Getting insights into chromatographic properties of HILIC and mixed-mode homemade stationary phases using principal component and cluster analyses // *Journal of Chemometrics*. 2025. V. 39. №3. e70019. EDN: OHMPBD.

Таблица 28. Хроматографические условия тестирования неподвижных фаз

Группа веществ	Тестовые вещества (параметры)	Подвижная фаза*, детектирование
Параметры теста Танака	$k'(U)$, $\alpha(CH_2)$, $\alpha(OH)$, $\alpha(V/A)$, $\alpha(CX)$, $\alpha(AX)$, $\alpha(Tb/Tr)$	20 мМ ААБ** рН 4.7 / CH_3CN 10/90 об.%; УФ 254 нм
Нуклеозиды, азотистые основания	Тимин (Thy), урацил (Ura), аденин (Ade), цитозин (Cyt), гуанин (Gua), уридин (Urd), 2'-дезоксиринидин (dUrd), ксантин (Xan), аденозин (Ado), цитидин (Cyd), гуанозин (Guo)	
Углеводы	Фруктоза (Fru), глюкоза (Glu), сахароза (Suc), мальтоза (Malt), лактоза (Lact)	H_2O / CH_3CN 15/85 об.%; Рефрактометрическое RID
Карбоновые кислоты	пировиноградная, молочная, уксусная, гликолевая, аскорбиновая, фумаровая, глутаровая, янтарная, винная, щавелевая	10 мМ фосфатный буферный раствор рН 7.0 / CH_3CN 20/80 об.%; УФ 200 нм
Водо-растворимые витамины	B_3 амид, B_6 , B_2 , B_1 (слабоудерживаемые витамины)	100 мМ ААБ рН 5.4 / CH_3CN 10/90 об.%; УФ 270 нм
	B_3 кислота, B_{12} , C (сильноудерживаемые витамины)	100 мМ ААБ рН 5.4 / CH_3CN 20/80 об.%; УФ 270 нм

* Скорость потока 1 мл/мин, в тесте Танака – 0.5 мл/мин. Температура колонки 25°C.

** ААБ – аммонийно-ацетатный буферный раствор.

витамины были разделены на две группы (слабо и сильноудерживаемые витамины), для каждой из которых использовали свой состав элюента.

Условия синтеза сорбентов подробно представлены работах [119,123,146] и кратко в табл. 10 на стр. 56. Он заключался в модифицировании 3-аминопропилсиликагеля по реакции Уги с использованием различных исходных реагентов: изоцианида, карбонильного соединения и низкомолекулярной или полимерной кислоты (рис. 45). Данный способ закрепления функциональных групп на силикагеле используют для варьирования свойств создаваемых неподвижных фаз [108,147]. При этом предполагают, что модифицирование матрицы полимерами должно приводить к более существенному изменению её свойств по сравнению с низкомолекулярными структурными фрагментами. Сравнение свойств серии сорбентов, полученных на основе одной матрицы, позволяет связывать различия со

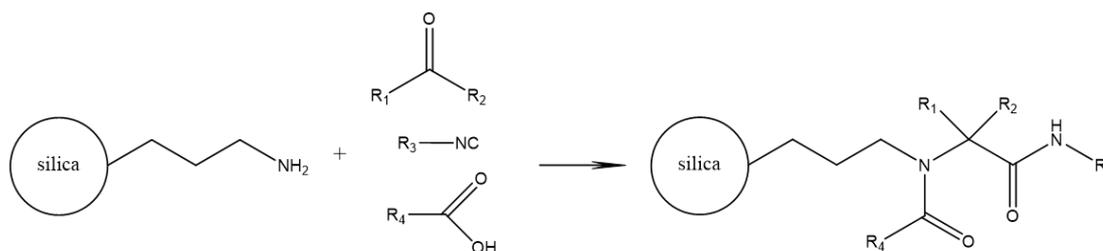


Рис. 45. Схема синтеза сорбентов по реакции Уги и их предполагаемая структура.

структурой функционального слоя, поскольку влияние разницы в размерах пор и удельной площади поверхности минимально.

Предварительно для 28 исследуемых сорбентов был проведён теста Танака, используемый для экспрессной характеристики свойств колонок в фиксированных условиях (табл. 28). Оценивали их гидрофильность $k'(U)$, метиленовую $\alpha(CH_2)$, гидроксильную $\alpha(OH)$, конфигурационную $\alpha(V/A)$, ионообменную селективность $\alpha(AH)$, $\alpha(CH)$ и рН поверхности сорбента $\alpha(Tb/Tr)$.

5.1. Кластеризация сорбентов по данным теста Танака

К матрице из 28 неподвижных фаз (строки) и 7 параметров теста Танака для каждой из фаз (столбцы) применили метод главных компонент, предварительно проведя автошкалирование данных (центрирование и приведение к единичной дисперсии). На графике счетов ГК1-ГК2 чёткого разделения неподвижных фаз по свойствам не наблюдали (рис. 46А), что делало необходимым рассмотрение старших главных компонент. По графику каменистой осыпи (scree plot, elbow method) выбрали 4 главные компоненты, которые суммарно описывают более 90 % дисперсии данных (рис. 47). Исходными данными для кластеризации (иерархической и по методу К-средних) служили счета – координаты точек в пространстве четырёх главных компонент. С использованием метрик: индекса силуэта, Калински-Харабаш и Дэвиса-Булдина (Приложение 6), и участка дендрограммы, соответствующего 33 % порогу дисперсии (рис. 46Б), было обнаружено, что неподвижные фазы образуют 6 кластеров. Однако их состав отличался для двух методов кластерного анализа (индекс Рэнда равен 0.87) из-за близости внутри- и межкластерных расстояний.

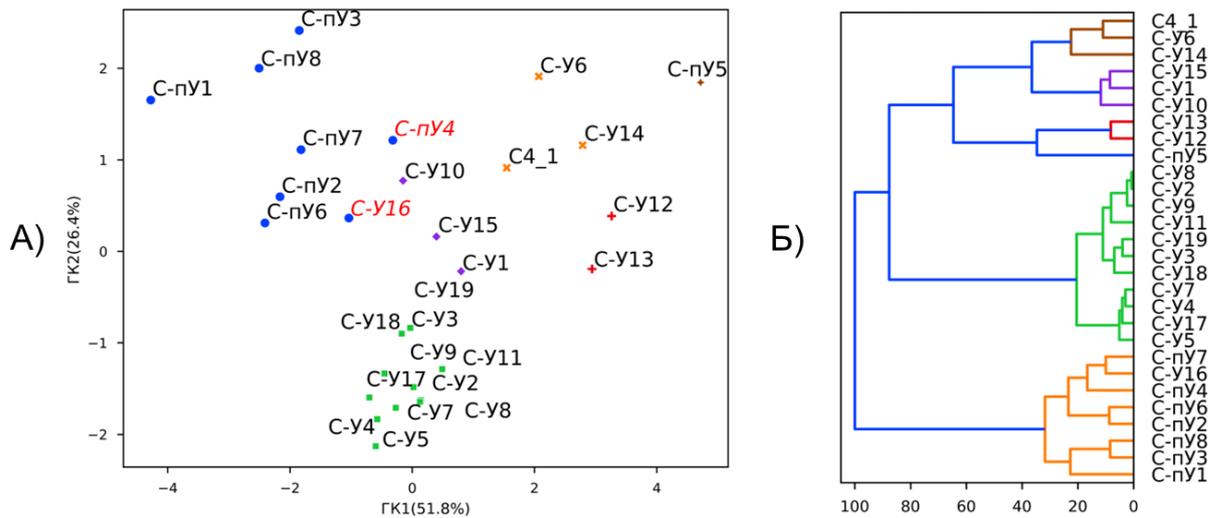


Рис. 46. Результаты хемометрической обработки данных для 28 неподвижных фаз при использовании 7 параметров теста Танака. А) График счетов ГК1-ГК2. Неподвижные фазы, выделенные красным курсивом, входят в разные кластеры, полученные методом К-средних и иерархической кластеризации. Б) Иерархическая кластеризация с использованием ГК 1-4. Кластеры окрашены в соответствии с 33 % порогом дисперсии.

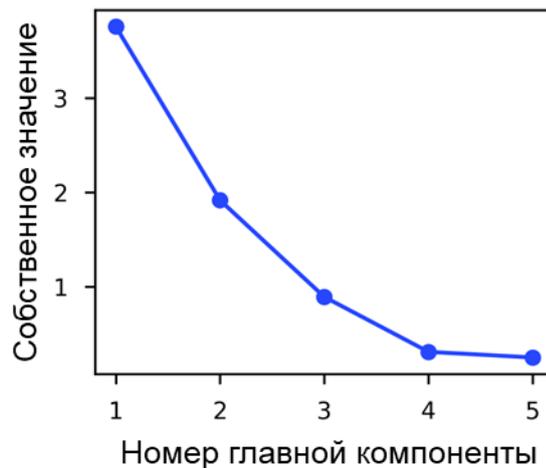


Рис. 47. Зависимость собственного значения от номера главной компоненты для данных 28 неподвижных фаз при использовании 7 параметров теста Танака (график каменистой осыпи).

Два больших кластера сорбентов на графике счетов ГК1-ГК2 расположены на существенном расстоянии от аминопропилсиликагеля (C4_1), на основе которого они были получены. Первая группа, отмеченная синим на рис. 46А, включает неподвижные фазы, полученные с использованием полимерных кислот в синтезе («С-пУ» фазы). Данное наблюдение согласуется с предположением о существенном изменении свойств сорбента при его модифицировании полимером. Однако они находятся близко к другим неподвижным фазам. Сорбент С-пУ5, выделенный в

отдельный кластер из одного объекта, отличается по свойствам от аминопропилсиликагеля и других «С-пУ» фаз.

Вторая группа, отмеченная зелёным на рис. 46А, состоит из сорбентов с низкомолекулярным функциональным слоем («С-У» фазы). Можно предположить, что они должны обеспечивать иную селективность разделения целевых аналитов в гидрофильной хроматографии – биологически активных соединений, по сравнению с аминопропилсиликагелем, в то время как фазы С-У6 и С-У14 (отмечены оранжевым на рис. 46А) – наоборот, схожую. Однако кластеризация неподвижных фаз по данным удерживания 33 соединений даёт другие результаты (см. раздел 5.2). Таким образом, характеристика сорбентов по тесту Танака, предназначенная для сравнения и выбора колонок для анализа реальных объектов на основании их селективности, имеет существенные ограничения, что подтверждает необходимость тестирования неподвижных фаз с использованием широкого круга соединений различной структуры, а также проверки и замены параметров теста Танака (см. главу 6).

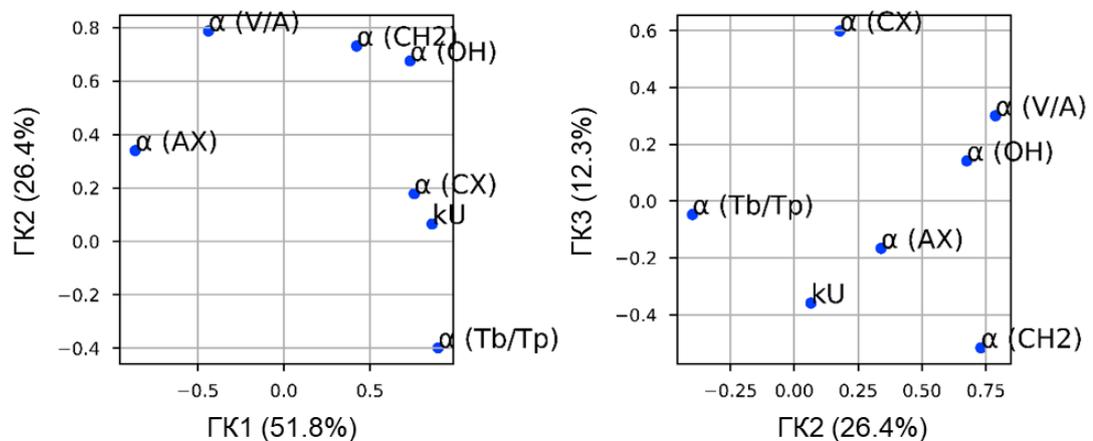


Рис. 48. Графики нагрузок ГК1-ГК2 и ГК2-ГК3 для данных теста Танака.

Стоит отметить, что все параметры теста Танака являются значимыми в рамках метода главных компонент благодаря ненулевым векторам нагрузок (рис. 48). Для сравнения в работе [104] были выделены две селективности α (OH) и α (Tb/Tr), характеризующие гидрофильность и рН поверхности сорбента, с помощью которых дифференцировали неподвижные фазы, модифицированные полимерами и низкомолекулярными силанами. В данном случае по графику нагрузок ГК1-ГК2 можно было бы отметить положительную корреляцию между α (CH₂) и α (OH), а также α (CX) и kU, и отрицательную между α (AX) и α (Tb/Tr), однако на графике

нагрузок ГК2-ГК3 такие зависимости не наблюдаются. Таким образом, параметры теста описывают разные свойства сорбентов из данного набора.

5.2. Кластеризация сорбентов по данным удерживания биологически активных веществ

Азотистые основания, нуклеозиды, углеводы, карбоновые кислоты и водорастворимые витамины, характеризующиеся достаточно высокой гидрофильностью ($\log P < 0$), были выбраны в качестве тестовых соединений, поскольку метод гидрофильной хроматографии удобен для их определения [96,98,99,148]. Перед применением метода главных компонент проводили предварительную подготовку данных для 28 неподвижных фаз. Во-первых, были рассчитаны попарные селективности в каждом классе соединений, чтобы нивелировать влияние состава подвижной фазы и существенных различий величин факторов удерживания веществ разных классов. Общее число коэффициентов селективности составило 119, количество комбинаций пар соединений в каждой из пяти отдельных групп (по количеству различающих составов элюента) равно $\frac{n!}{2!(n-2)!}$, где n – количество аналитов в каждой группе. Далее рассчитывали двоичные логарифмы коэффициентов селективности. При изменении порядка элюирования веществ (например, вещество 1 и вещество 2) диапазон значений, которые может принимать коэффициент селективности α (вещество 1/вещество 2), изменяется от $[0; 1]$ до $[1; +\infty]$ или наоборот. В случае логарифма селективности меняется только знак при сопоставимой абсолютной величине значения, что даёт более симметричные данные.

После проведения автошкалирования данных 119 логарифмов селективности для 28 неподвижных фаз применили метод главных компонент. Даже без применения кластерного анализа на графике счетов ГК1-ГК2 отчётливо видны 4 группы сорбентов, отмеченных зелёным, красным, оранжевым и синим цветом (рис. 49А). Перед проведением кластерного анализа было выбрано три главные компоненты по графику каменистой осыпи (рис. 50). На дендрограмме при 33 % пороге дисперсии наблюдали четыре кластера (рис. 49Б), а также индекс Дэвиса-Булдина имел значительный локальный экстремум для данного количества групп (Приложение 7). Несмотря на отличающееся количество кластеров, установленное по другим метрикам (Приложение 7), выбрали четыре, так как на графике счетов отчётливо

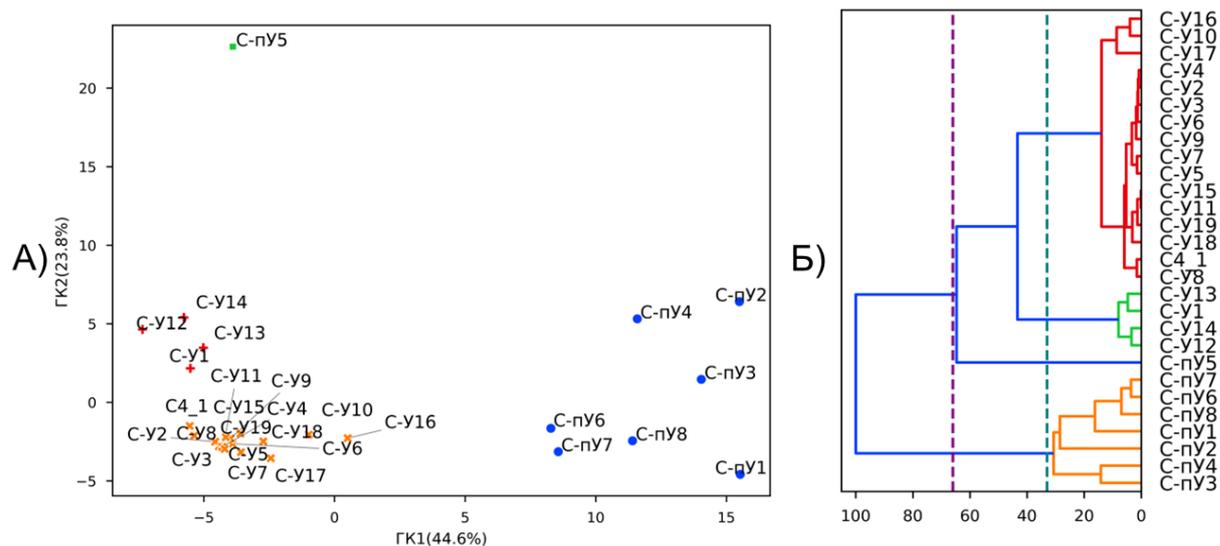


Рис. 49. Результаты хемометрической обработки 119 логарифмов селективности биологически активных веществ для 28 неподвижных фаз. А) График счетов ГК1-ГК2. Б) Иерархическая кластеризация с использованием ГК 1-3. Кластеры окрашены в соответствии с 33 % порогом дисперсии.

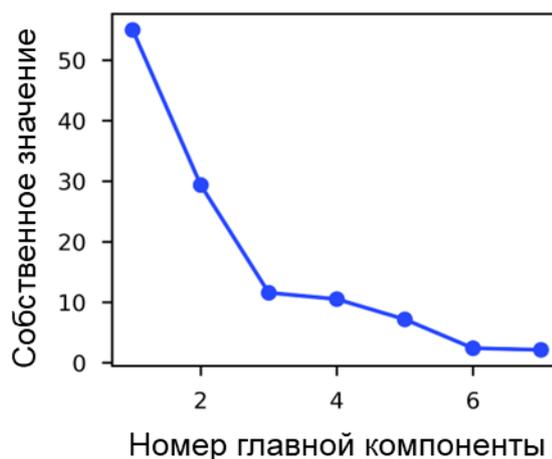


Рис. 50. Зависимость собственного значения от номера главной компоненты 119 логарифмов селективности биологически активных веществ для 28 неподвижных фаз (график каменистой осыпи).

видны 4 кластера, а также два независимых метода кластерного анализа показывали идентичное распределение объектов по классам (индекс Рэнда равен 1).

Стоит отметить, что кластеры, включающие «С-пУ» сорбенты, были расположены на существенном расстоянии от всех неподвижных фаз с низкомолекулярными модификаторами, что иллюстрировало существенное влияние полимеров в функциональном слое на хроматографические свойства фаз. Было показано, что данные сорбенты позволяют разделять не только полярные соединения, но и гидрофобные алкилбензолы в условиях ОФ ВЭЖХ [119]. Фаза С-пУ5, как и в случае данных теста Танака, выделяется в отдельный кластер из

одного объекта, т.е. отличается по селективности от всех исследуемых сорбентов. Фаза С-пУ5 была получена с использованием наибольшего количества полимера в синтезе, который представлял собой сополимер акриловой и малеиновой кислот (табл. 10 стр. 56). Мономерные звенья полимера содержат одну или две карбоксильные группы, некоторые из них в результате синтеза, вероятно, остаются неизменными, что согласуется с проявлением катионообменных свойств ($\alpha(\text{CX})=3.1$, $\alpha(\text{AX})=0.7$) в отличие от аминопропилсиликагеля ($\alpha(\text{CX})=0.06$, $\alpha(\text{AX})=14.3$). При этом сорбент С-пУ4, полученный в аналогичных условиях, но с меньшим количеством полимерной кислоты, относится к другому кластеру. В него также входят остальные «С-пУ» фазы. Однако данный кластер является достаточно разреженным, т.е. расстояние между сорбентами с полимерными слоями больше, чем между таковыми с низкомолекулярными модификаторами. Это свидетельствует о том, что замена одной полимерной кислоты на другую, увеличение её количества, используемого в синтезе, или молекулярной массы приводит к существенному изменению свойств неподвижных фаз по сравнению с варьированием природы низкомолекулярных реагентов.

«С-У» сорбенты образуют два кластера. Первый, отмеченный красным на рис. 49А, содержит четыре неподвижные фазы, хроматографические свойства которых отличаются от исходного аминопропилсиликагеля. Фазы С-У12, С-У13 и С-У14 были получены при одновременном использовании в синтезе по реакции Уги 2-морфолиноэтилизоцианида и катализатора, тогда как С-У1 – трет-бутилизоцианида и этанола в качестве растворителя (табл. 10 стр. 56). Таким образом, данные условия модифицирования приводят к получению сорбентов, обладающих иной селективностью по отношению к биологически активным веществам по сравнению с исходной аминофазой. Остальные «С-У» фазы и матрица С4_1 входят в кластер, отмеченный оранжевым на рис. 49А. Несмотря на отличие свойств большинства фаз с низкомолекулярными модификаторами от аминопропилсиликагеля по данным теста Танака (рис. 46А), селективность разделения азотистых оснований, нуклеозидов, углеводов, карбоновых кислот и водорастворимых витаминов на них схожая.

5.3. Выбор сокращённого набора анализов для сравнения селективности неподвижных фаз

Поскольку для тестирования неподвижных фаз с использованием 33 биологически активных веществ и нескольких составов элюента требуется проведения длительных стадий переуравновешивания колонки, то выявление сокращенного набора соединений, могло бы существенно сократить время и расход растворителя, требуемые для установления различий между модифицированными фазами. Для этого для каждой группы анализов по отдельности выполнили следующие этапы:

- 1) предварительно проведя автошкалирование логарифмов селективности, применили метод главных компонент;
- 2) выбрали количество главных компонент по графику каменистой осыпи;
- 3) разделили сорбенты на четыре кластера с использованием метода К-средних и иерархической кластеризации;
- 4) сравнили состав кластеров, полученных разными методами;
- 5) сопоставили результаты кластеризации по данным для одной группы веществ и полному набору соединений.

Результаты представлены в табл. 29. В большинстве случаев состав кластеров по данным для одной группы соединений, в том числе теста Танака, существенно отличался от такового по всему набору соединений (индекс Рэнда от 0.34 до 0.73). Для азотистых оснований и нуклеозидов индекс Рэнда был близок к 1. Основные различия в кластеризации по данному классу соединений и полному набору веществ заключались в разделении кластера «С-пУ» фаз на два и объединении фазы С-пУ5 с фазами С-У12, С-У13, С-У14 и С-У1 (рис. 52). Однако они были вызваны ограничением числа кластеров до четырёх. Несмотря на это на графике счетов ГК1-ГК2 (рис. 52) отчётливо видно, что неподвижные фазы с полимерным функциональным слоем хорошо отделяются от фаз с низкомолекулярными модификаторами.

Была предпринята попытка сократить количество соединений, необходимых для получения результатов близких к таковым, полученных для полного набора соединений (четыре аналогичных кластера). Сначала проверили возможность использования только одного логарифма коэффициента селективности. Применив

Таблица 29. Количество главных компонент и индексы Рэнда, рассчитанные при сравнении четырёх кластеров, полученных методом К-средних и иерархической кластеризацией для каждой группы соединений (G_HCA vs G_K-Means) с полным набором веществ (G_HCA vs F_HCA и G_K-Means vs F_K-Means)

Группа	Количество главных компонент	G_HCA vs G_K-Means	G_HCA vs F_HCA	G_K-Means vs F_K-Means
Углеводы	2	0.86	0.48	0.57
Нуклеозиды, азотистые основания	3	1	0.91	0.91
В ₃ амид, В ₆ , В ₂ , В ₁	2	0.9	0.64	0.73
В ₃ кислота, В ₁₂ , С	2	0.59	0.34	0.34
Карбоновые кислоты	4	0.69	0.43	0.47
Тест Танака	4	0.89	0.53	0.48

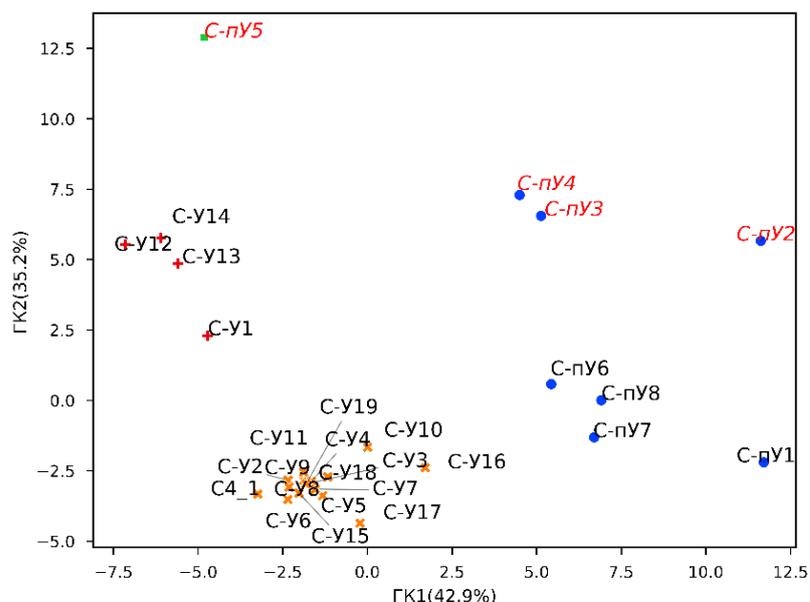


Рис. 52. График счетов ГК1-ГК2 для 55 логарифмов селективности нуклеозидов и азотистых оснований на 28 неподвижных фазах. Цвета кластеров соответствуют полному набору соединений (рис. 49А). Неподвижные фазы, выделенные красным курсивом, по данным для нуклеозидов и азотистых оснований отнесены в другие кластеры.

метод К-средних и иерархическую кластеризацию к каждой паре соединений по отдельности было показано, что хорошего совпадения кластеров с таковыми по полному набору соединений, добиться не удаётся, индекс Рэнда не превышает 0.75.

Количество веществ было увеличено до трёх для сравнения сорбентов по двум селективностям. Метод К-средних и иерархическая кластеризация были

применены ко всем комбинациям пар логарифмов селективности, которые были предварительно автошкалированы. Результаты кластеризации были сопоставлены с таковыми по полному набору соединений. Было обнаружено, что в пяти случаях достигается индекс Рэнда, равный 1: (1) dUrd/Cyd, dUrd/Gua; (2) dUrd/Cyd, dUrd/Ade; (3) Cyd/Guo, dUrd/Cyd; (4) Gua/Cyd, dUrd/Cyd; (5) Ado/Cyd, Thy/Ado. В четырёх случаях из пяти одной парой является 2'-дезоксинуридин (dUrd)/цитидин (Cyd). В сочетании с ней дважды встречается гуанин (Gua). Стоит отметить, что данные селективности расположены ортогонально на графике нагрузок полного набора соединений (рис. 51). Таким образом, два нуклеозида и одно азотистое основание были выбраны для сравнения свойств неподвижных фаз с полимерными и низкомолекулярными модификаторами. Результаты характеристики по трём веществам можно представить в виде двумерного графика, где по осям откладываются автошкалированные значения параметров, рассчитываемые из их удерживания: $\log \alpha(\text{dUrd/Cyd})$ и $\log \alpha(\text{dUrd/Gua})$ или $\log \alpha(\text{Gua/Cyd})$ (рис. 53). В данном случае сравнение свойств занимает значительно меньше времени, около трёх рабочих часов вместо недели, благодаря сокращению числа анализов и отсутствия стадии переуравновешивания колонок.

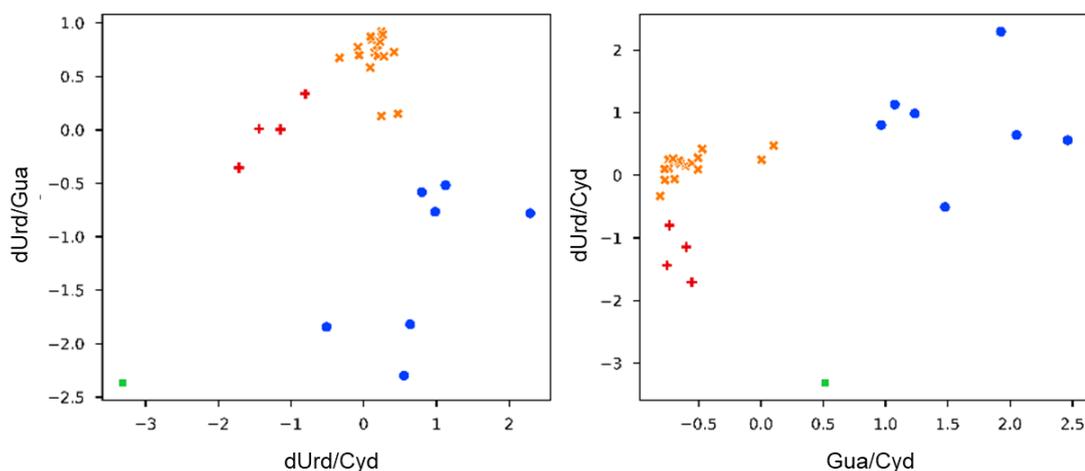


Рис. 53. Сравнение свойств сорбентов по трём веществам: 2'-дезоксинуридин (dUrd), цитидин (Cyd), гуанин (Gua). По осям отложены автошкалированные значения $\log \alpha(\text{dUrd/Cyd})$, $\log \alpha(\text{dUrd/Gua})$ и $\log \alpha(\text{Gua/Cyd})$. Цвета кластеров соответствуют полному набору соединений (рис. 49А).

Для проверки применимости выбранных параметров селективности, во-первых, использовали результаты тестирования других партий матрицы 3-аминопропилсиликагеля (табл. 9 стр. 55) [116], которые предположительно должны иметь близкие к аминофазе С4_1 свойства. Данные колонки были добавлены на

графики по двум селективностям путём проецирования в пространство для 28 рассматриваемых выше неподвижных фаз (рис. 54). Действительно, аминофазы из других партий C4, C4_2 и C4_3 на графике были расположены достаточно близко к C4_1, что подтверждает корректность их характеристики по данным параметрам.

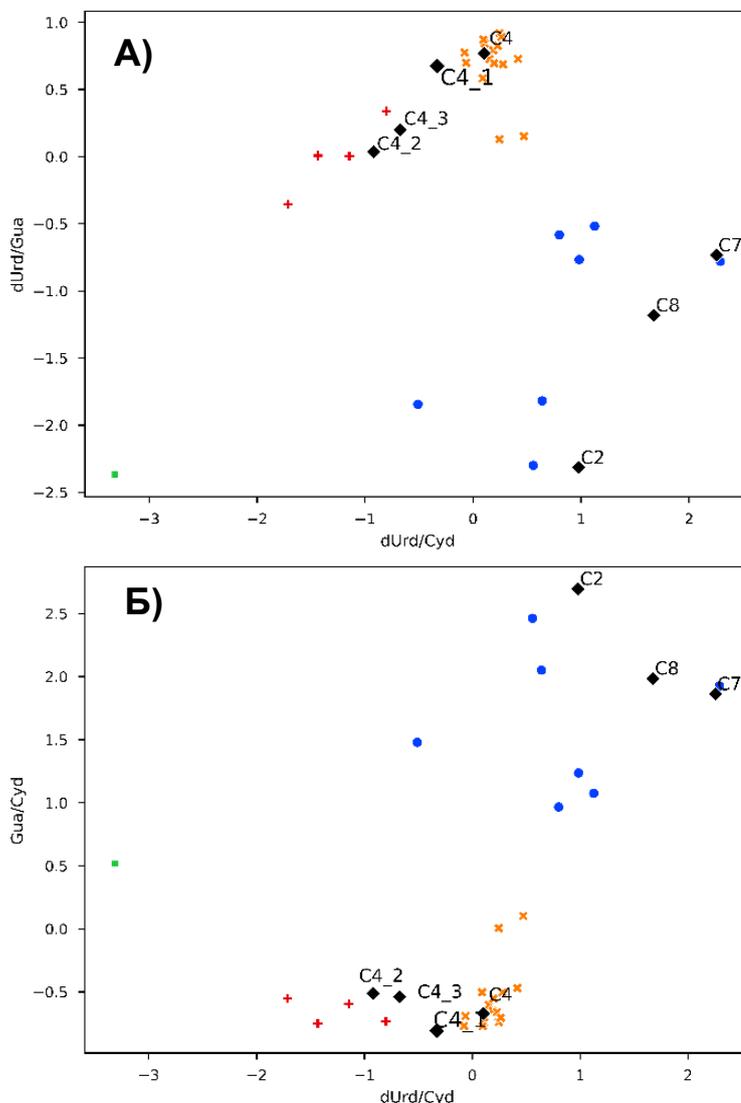


Рис. 54. Применение выбранных веществ А) $dUrd/Cyd$ и $dUrd/Gua$, Б) Gua/Cyd и $dUrd/Cyd$ для сравнения свойств неподвижных фаз. Остальные условия приведены в подписи к рис. 53.

Во-вторых, сорбенты с принципиально другим функциональным слоем сравнили с набором неподвижных фаз с полимерными и низкомолекулярными модификаторами, полученными по реакции Уги. Сорбенты C2 и C8 на основе силикагеля и 3-аминопропилсиликагеля, соответственно, имеют в структуре макромолекулы эремомицина, а C7 – промежуточный продукт синтеза сорбента C8, получен модифицированием аминофазы C4_1 с помощью пятикратного избытка реагента 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (табл. 9 стр. 55) [117,119]. Данные

неподвижные фазы на графике по двум селективностям располагаются ближе к сорбентам, модифицированным с помощью полимеров (рис. 54), что может свидетельствовать о возможной реализации гидрофобных взаимодействий. Однако в работах [117,119] было отмечено, что фазы на основе силикагеля, модифицированные эремомицином, не удерживают гидрофобные алкилбензолы в отличие от «С-пУ» сорбентов. Но стоит обратить внимание, что для «С-пУ» фаз разделение алкилбензолов было показано в подвижной фазе вода/ацетонитрил 85/15 об.%, а вывод о невозможности их разделения на фазах С2, С7 и С8 не содержал информации о составах элюента. Вероятно, при низком содержании ацетонитрила данные сорбенты могут обеспечивать удерживание гидрофобных ароматических соединений, поскольку на одну молекулу эремомицина приходится 5 бензольных колец [149], а в закрепляемом на аминогруппу 1,4-бутандиолдиглицидиловом эфире есть гидрофобный фрагмент из 4 атомов углерода.

Таким образом, сокращенный набор из трёх веществ может служить для экспрессного сравнения свойств полярных неподвижных фаз и быть дополнением для существующих тестов характеристики, отражающим различия в селективности разделения по отношению к биологически активным соединениям, часто определяемым методом гидрофильной хроматографии. Основываясь на информации о свойствах рассматриваемых неподвижных фаз, имеющейся в других работах, можно предположить, что на различия в селективности dUrd/Cyd, dUrd/Gua и Gua/Cyd существенное влияние оказывает способность фаз участвовать в гидрофобных взаимодействиях. Это подкреплялось тем, что на аминопропилсиликагеле и его производных с низкомолекулярными структурными фрагментами гидрофобные алкилбензолы не удерживались в условиях ОФ ВЭЖХ в отличие от сорбентов с высокомолекулярными модификаторами. Однако необходима дополнительная проверка этого предположения для установления более строгой связи между выделенными селективностями и оцениваемыми свойствами неподвижных фаз.

Заключение из главы 5

В данной работе впервые предложено совместное использование метода главных компонент, иерархической кластеризации, метода К-средних и индекса Рэнда для сравнения селективности неподвижных фаз в условиях гидрофильной

хроматографии. Задача заключалась в выявлении сходств и различий в свойствах сорбентов с низкомолекулярными и полимерными функциональными слоями, полученных на основе 3-аминопропилсиликагеля по реакции Уги в лаборатории хроматографии МГУ. Применение комплекса хемометрических подходов к данным теста Танака позволило показать его ограничения, поскольку чёткого разделения сорбентов на группы по свойствам не наблюдали. Напротив, по данным удерживания 33 биологически активных веществ (азотистые основания, нуклеозиды, водорастворимые витамины, углеводы, карбоновые кислоты) в определённых условиях элюирования было установлено, что неподвижные фазы, модифицированные полимерами, существенно отличаются по селективности от таковых с низкомолекулярными модификаторами и матрицы. При этом структура полимера, молекулярная масса и массовое соотношение матрица/полимер влияло на свойства. Также были выделены условия синтеза сорбентов с низкомолекулярными модификаторами, которые позволили изменить селективность фазы по сравнению с исходной аминофазой.

С целью сокращения времени, необходимого для тестирования колонок с использованием 33 веществ и различных подвижных фаз, провели поиск соединений, по параметрам удерживания которых можно получить аналогичную группировку неподвижных фаз по свойствам. Было установлено, что, используя данные только для соединений из класса азотистых оснований и нуклеозидов, можно получить схожее разделение фаз по селективности. Выбрано три вещества (цитидина, 2'-дезоксинуридина, гуанина) для выявления различий в свойствах сорбентов, что позволяет сократить время тестирования одной колонки с недели до трёх часов. На основании имеющихся данных о селективности неподвижных фаз в других условиях элюирования выдвинуто предположение о том, что различия свойств сорбентов в условиях гидрофильной хроматографии связаны с возможным влиянием гидрофобных взаимодействий.

ГЛАВА 6. Параметры для характеристики гидрофильных и анионообменных свойств неподвижных фаз⁴

Как было отмечено в обзоре литературы (раздел 1.4.4), параметры широко используемого способа характеристики – теста Танака, такие как гидрофильность, анионообменная и метиленовая селективность требуют оценки правильности описания соответствующих свойств неподвижных фаз, проверки применимости к фазам на основе полистирол-дивинилбензола (ПС-ДВБ), а также сравнения с другими существующими параметрами. Оцениваемые с их помощью свойства являются одними из наиболее важных для классификации колонок, поскольку демонстрируют потенциальный вклад основных механизмов удерживания в гидрофильной хроматографии – распределения и ионного обмена. Выбор подходящих веществ-маркеров является ключевой проблемой данного способа характеристики неподвижных фаз, поскольку их поведение в хроматографической системе определяет результат сравнения фаз.

6.1. Сравнение существующих и предложенных параметров гидрофильности сорбентов

Гидрофильность неподвижных фаз отражает их способность обеспечивать «гидрофильные взаимодействия», а также механизм распределения, зависящий от количества адсорбированной фазой воды из элюента. Для оценки данного свойства сорбентов на данный момент предложены такие параметры, как фактор удерживания уридина $k'(U)$ в тесте Танака [69] и коэффициент селективности цитозина и урацила в статье [70] (тест Иргума). В качестве подвижной фазы в первом случае используют смесь 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор w_pH 4.7 / ацетонитрил 10/90 об.%, во втором – 25 мМ ацетат аммония / ацетонитрил 20/80 об.%, где w_pH водной части приблизительно равен 6.8. Учитывая изменение констант кислотности уксусной кислоты и аммония при добавлении ацетонитрила, водно-органический s_pH в обоих случаях оказывается близким [18], несмотря на существенную разницу

⁴ 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:

Смагина М.А., Хрисанфова А.О., Иванова Е.Д., Каринская Э.А., Статкус М.А., Шнигун О.А., Чернобровкина А.В. Закономерности удерживания неорганических ионов на аминированных неподвижных фазах на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола в среде с высоким содержанием ацетонитрила // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25. № 5. С. 687-696. EDN: KLJAIH.

в w_pH . Однако отличающиеся содержания ацетонитрила могут влиять на механизмы удерживания веществ-маркеров и приводить к расхождениям в характеристике.

Для сравнения двух параметров гидрофильности в данной работе провели тестирование восьми коммерчески доступных и разработанных в лаборатории хроматографии МГУ неподвижных фаз на основе силикагеля с различными функциональными группами в соответствующих условиях. Результаты характеристики представлены в табл. 30. Можно заметить, что корреляция между $k'(U)$ и $\alpha(\text{цитозин/урацил})$ отсутствует (рис. 55А). При этом разница составов подвижных фаз, используемых в тестах, влияет в первую очередь на абсолютные величины параметров: чем выше доля ацетонитрила, тем больше значения (рис. 55Б). Однако результаты сравнения неподвижных фаз по $k'(U)$ или $\alpha(\text{цитозин/урацил})$ в двух условиях имеют отличия. Например, в условиях теста Танака фактор удерживания уридина на сорбенте с привитым эремомицином С2 выше, чем у аминопропилсиликагеля С4, а в условиях теста Иргума – наоборот (табл. 30), что, вероятно, вызвано разным соотношением вкладов распределения и адсорбции в удерживание уридина на данных неподвижных фазах. При сравнении $k'(U)$ и $\alpha(\text{цитозин/урацил})$ в одних условиях (теста Танака или Иргума) корреляция также отсутствует, что подтверждает то, что данные параметры описывают разные свойства неподвижных фаз.

Таблица 30. Параметры гидрофильности неподвижных фаз $k'(U)$, $\alpha(\text{цитозин/урацил})$ и соотношение объёмов фаз $\frac{V_W}{V_M}$. Условия теста Танака: 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор w_pH 4.7 / ацетонитрил 10/90 об.%. Условия теста Иргума*: 25 мМ ацетат аммония / ацетонитрил 20/80 об.%.
* Тест Иргума – тест, предложенный в работе [70]

Неподвижная фаза	В условиях теста Танака			В условиях теста Иргума	
	$\frac{V_W}{V_M}$	$k'(U)$	$\alpha(\text{цитозин/урацил})$	$k'(U)$	$\alpha(\text{цитозин/урацил})$
Силикагель С1	0.0556	0.81	6.03	0.62	2.77
С привитым эремомицином С2	0.1298	3.78	7.98	1.56	4.01
Диол С3	0.0858	0.98	4.11	0.71	2.34
Аминопропил С4	0.1365	3.04	3.93	1.60	2.26
Полиамин С5	0.1692	4.22	4.37	1.80	2.53
цвиттер-ионный С6	0.1354	2.17	2.97	1.07	1.87
С9	0.0590	1.19	4.84	0.71	2.52
С10	0.1197	2.86	3.77	1.53	2.21

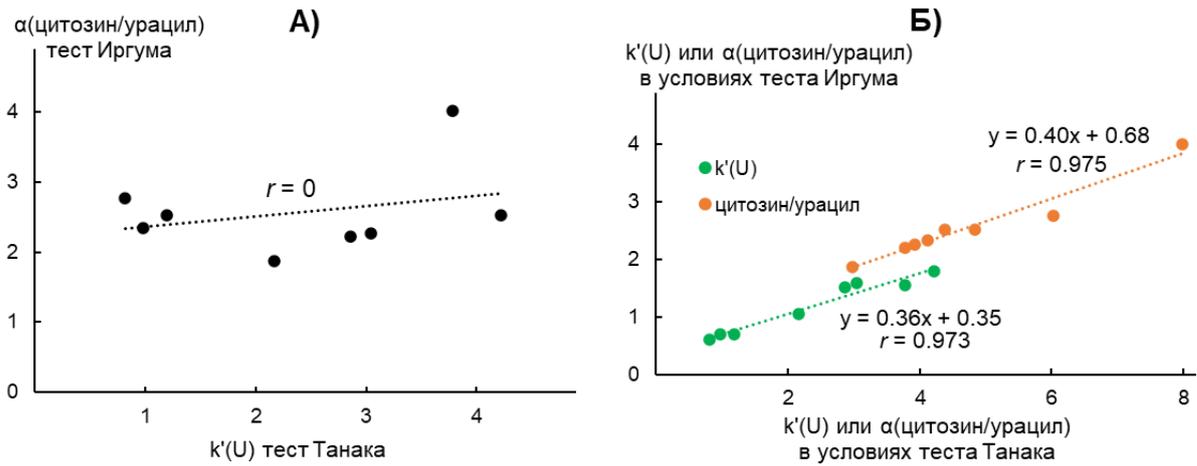


Рис. 55. Оценка А) параметров гидрофильности неподвижных фаз $k'(U)$ и $\alpha(\text{цитозин/урацил})$ в соответствующих условиях; Б) влияния условий на параметры гидрофильности. Условия теста Танака: 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор pH 4.7 / ацетонитрил 10/90 об.%. Условия теста Иргума: 25 мМ ацетат аммония / ацетонитрил 20/80 об.%.

Для того чтобы параметр был корректной оценкой гидрофильности, необходимо, чтобы он был пропорционален объёму воды, адсорбированной неподвижной фазой. Для его установления в данной работе использовали наиболее удобный подход, не требующий дополнительных экспериментальных установок, основанный на измерении времени удерживания толуола (уравнение (15) стр. 23). В качестве подвижной фазы применяли состав, предложенный в тесте Танака [69].

Во-первых, сравнили измеренные параметры, а также факторы удерживания урацила и цитозина с соотношением объёмов фаз $\frac{V_W}{V_M}$ колонок (рис. 56). Было показано отсутствие корреляции между $\alpha(\text{цитозин/урацил})$ и $\frac{V_W}{V_M}$, тогда как коэффициент корреляции зависимости фактора удерживания урацила, уридина и цитозина был больше 0.85. Из зависимостей на рис. 56В,Г заметно выделялась точка, соответствующая сорбенту с привитым эремомицином С2, для которого в разделе 4.2 было отмечено существенное влияние адсорбции для цитозина. Полученные тренды согласовались с данными для 22 коммерчески доступных колонок, представленными в работе Гуо (рис. 57) [58], а также для 7 неподвижных фаз в исследовании [84].

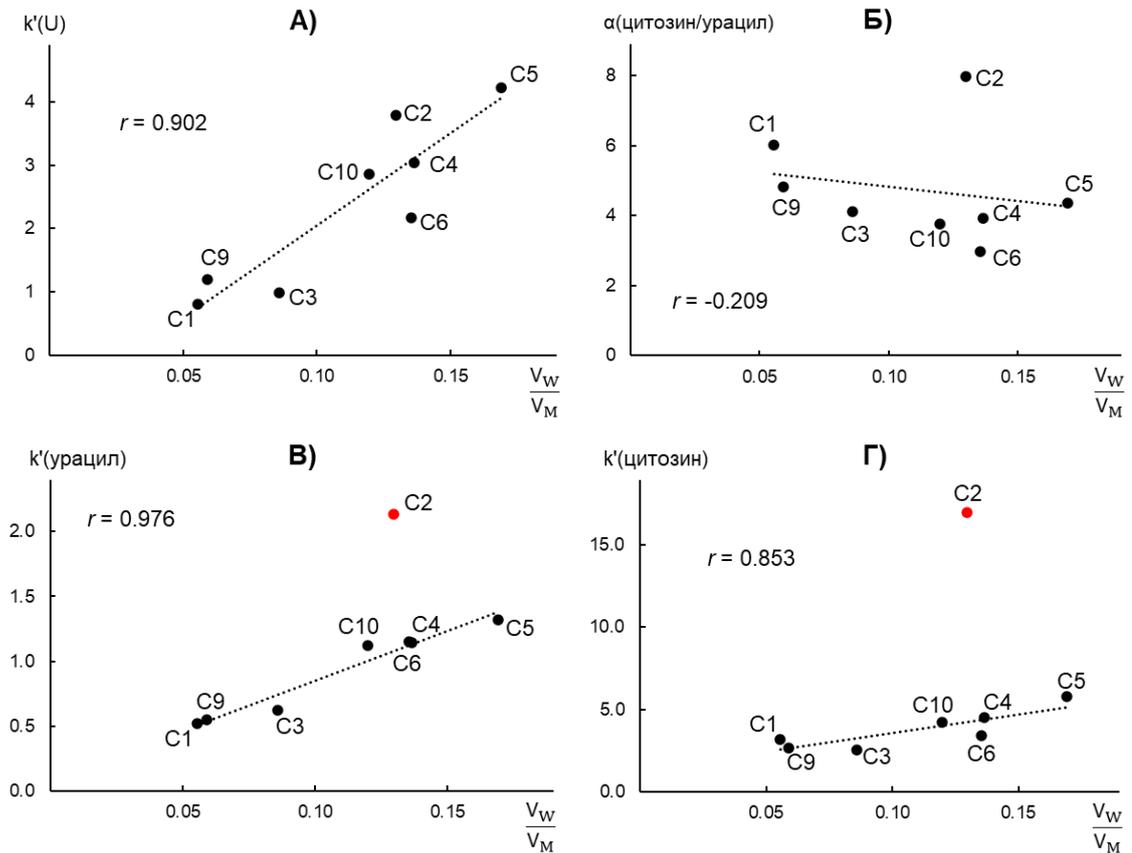


Рис. 56. Связь соотношения объёма фаз $\frac{V_W}{V_M}$ восьми колонок и А) фактора удерживания уридина $k'(U)$, Б) $\alpha(\text{цитозин/урацил})$, В) фактора удерживания урацила и Г) фактора удерживания цитозина. Красная точка соответствует сорбенту с привитым эремомицином С2. Условия теста Танака: 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор $\text{pH} 4.7$ / ацетонитрил 10/90 об.%.

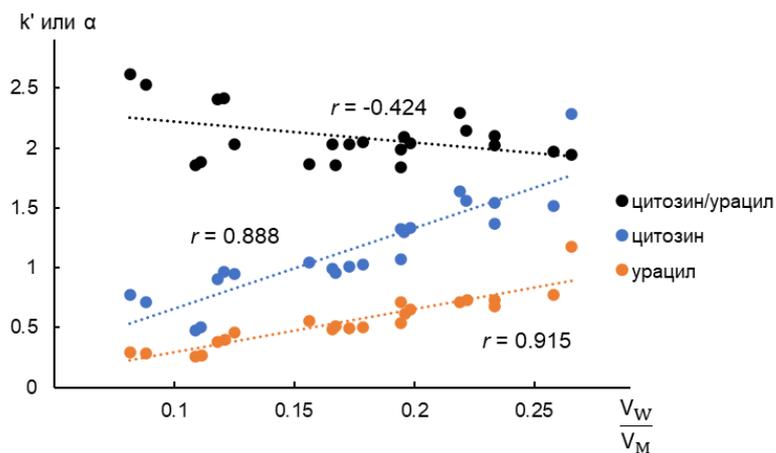


Рис. 57. Связь соотношения объёма фаз $\frac{V_W}{V_M}$ колонок с фактором удерживания урацила, цитозина и $\alpha(\text{цитозин/урацил})$. Условия: ацетат аммония / ацетонитрил 25/75 об.%, концентрация ацетата аммония в элюенте – 5 мМ. График построен по значениям, представленным на рис. 1 статьи [58], обработанных с помощью онлайн-программы WebPlotDigitizer 4.8.

Отклонение экспериментальных значений факторов удерживания веществ на разных неподвижных фазах от линейной зависимости вызвано влиянием адсорбции на их удерживание, зависящим от структуры функционального слоя. С опорой на методологию, разработанную Гуо (уравнение (14) стр. 23) [58], можно предположить, что наиболее подходящим маркером гидрофильности является соединение удерживающееся преимущественно за счёт механизма распределения:

$$k' \approx k'(\text{распределение}) = D \cdot \frac{V_W}{V_M} \quad (30)$$

где коэффициент распределения D не зависит от природы неподвижной фазы. По данным работы [60] (табл. 2 стр. 24) и этого исследования (табл. 21 стр. 92) для уридина вклад распределения составляет более 90 % при 90 об.% ацетонитрила в элюенте, подкрепляя его применение в качестве параметра гидрофильности в тесте Танака, тогда как для урацила и цитозина отмечено влияние адсорбции (до 100% на силикагеле для цитозина).

Для селективности теоретическая зависимость от соотношения объёмов фаз выглядит следующим образом [59]:

$$\alpha = \frac{k'_1}{k'_2} = \frac{D_1 \cdot \frac{V_W}{V_M} + k'(\text{адс.})_1}{D_2 \cdot \frac{V_W}{V_M} + k'(\text{адс.})_2} \quad (31)$$

т.е. в общем случае она нелинейно связана с $\frac{V_W}{V_M}$. Кроме того, удерживание за счёт адсорбции $k'(\text{адс.})$ зависит от типа групп сорбента. Это объясняет плохую корреляцию между $\alpha(\text{цитозин/урацил})$ и соотношением фаз $\frac{V_W}{V_M}$.

Во-вторых, проверили применимость других нейтральных соединений из разных классов для оценивания гидрофильности (рис. 58). В набор веществ включили цитидин, 2'-дезоксигуанидин и гуанин, которые были выбраны из 11 азотистых оснований и нуклеозидов для кластеризации колонок (см. раздел 5.3), а также гуанозин, для которого был показан высокий вклад распределения в удерживание на немодифицированном силикагеле (см. раздел 4.1.1.1., табл. 21 стр. 92). Также были рассмотрены углеводы, на удерживание которых опираются при сравнении гидрофильных свойств сорбентов [119], и предложены более простые молекулы с меньшим числом гетероатомов, из-за наличия которых могут образовываться водородные связи с неподвижной фазой, влияние которых

желательно сократить: мочевина, тиомочевина, формамид и метансульфонамид. Для углеводов и амидов, слабо поглощающих в рабочем диапазоне длин волн, использовали испарительный детектор по светорассеянию.

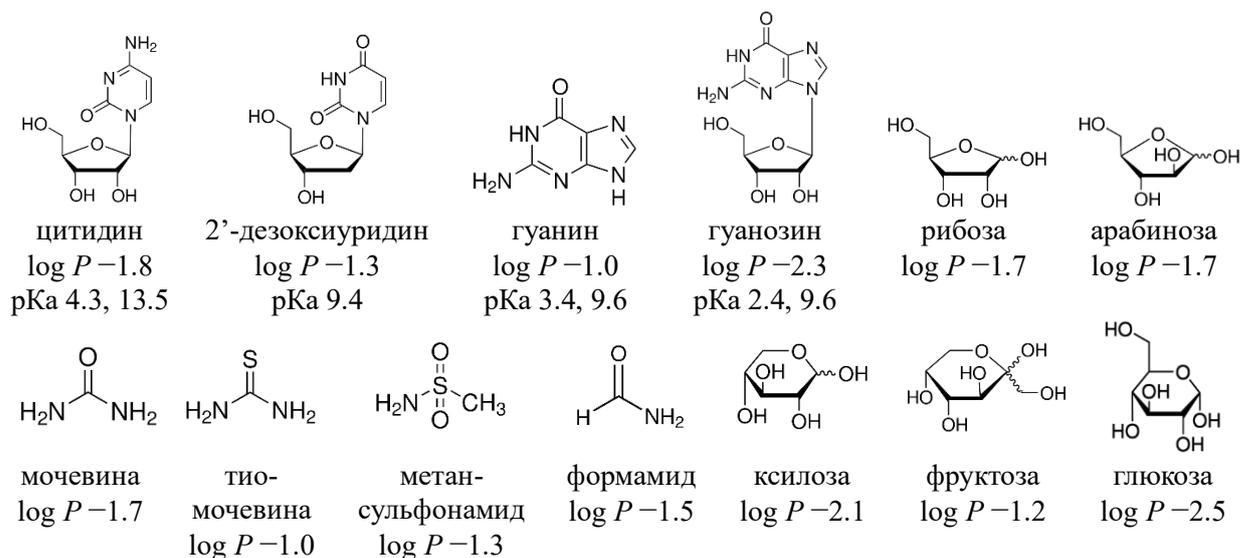


Рис. 58. Структурные формулы и свойства нейтральных веществ – потенциальных маркеров гидрофильности. pK_a и $\log P$ рассчитаны в программе ACD/Labs 12.01.

Наиболее высокие коэффициенты корреляции зависимостей факторов удерживания от соотношения объёмов фаз для восьми рассматриваемых неподвижных фаз были получены для уридина, тиомочевины и метансульфонамида (табл. 31). Поскольку интерес представляет универсальный маркер, подходящий для тестирования неподвижных фаз с различными функциональными слоями, то урацил, 2'-дезоксидиридин и гуанин, для которых получены высокие коэффициенты корреляции для набора неподвижных, исключая фазу C2, далее не рассматривали. Для остальных соединений, по-видимому, адсорбция вносит существенный вклад в удерживание, что искажает результаты сравнения сорбентов. При этом факторы удерживания углеводов хорошо коррелируют друг с другом ($r > 0.95$), что согласуется с выводом, полученным с использованием хемометрических подходов, что все представители данного класса одинаково характеризуют неподвижные фазы (см. раздел 5.2), вероятно, по совокупности взаимодействий.

Среди пар соединений только для трёх коэффициенты корреляции были по модулю равны или выше 0.9 (табл. 31). Для коэффициента селективности уридина и 2'-дезоксидирина (гидроксильной селективности $\alpha(OH)$ из теста Танака), который, как было показано в статье [89], коррелирует с толщиной водного слоя (рис. 10 стр. 44), коэффициент корреляции равен 0.835. Различие заключается в оценке

количества адсорбированной воды в данной работе и статье [89]. Парные селективности цитидина, 2'-дезоксигуанидина и гуанина, выделенных с помощью хемометрических подходов для кластеризации колонок (см. раздел 5.3), по-видимому, в основном отражают различия адсорбционных возможностей неподвижных фаз.

Таблица 31. Коэффициенты корреляции зависимостей факторов удерживания или коэффициентов селективности нейтральных веществ от соотношения объёмов фаз. Условия приведены в подписи к рис. 56

Вещество	Коэффициент корреляции r	
	Все колонки	Без фазы C2
Урацил	0.714	0.976
Уридин	0.902	0.929
Цитозин	0.365	0.853
Цитидин	0.832	0.850
2'-дезоксигуанидин	0.764	0.933
Гуанин	0.708	0.905
Гуанозин	0.607	0.864
Мочевина	0.790	0.883
Тиомочевина	0.939	0.943
Метансульфонамид	0.904	0.914
Формаимид	0.793	0.872
Рибоза	0.834	0.833
Ксилоза	0.828	0.837
Арабиноза	0.783	0.805
Фруктоза	0.788	0.802
Глюкоза	0.779	0.804
Гуанозин/цитозин	0.912	0.909
Цитозин/гуанин	-0.895	-0.900
Фруктоза/глюкоза	-0.913	-0.924

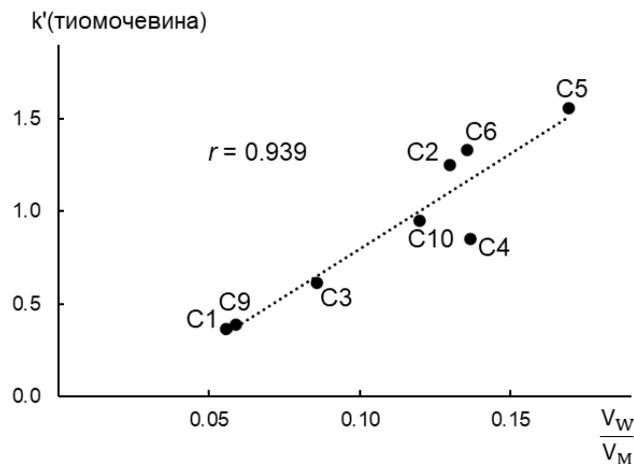


Рис. 59. Связь соотношения объёма фаз $\frac{V_W}{V_M}$ колонок и фактора удерживания тиомочевины. Условия приведены в подписи к рис. 56.

Зависимость фактора удерживания тиомочевина от соотношения объёмов фаз, характеризующаяся наибольшим коэффициентом корреляции, представлена на рис. 59. По данному параметру ошибочно классифицирован аминопропилсиликагель (выпадающая точка), вероятно, из-за деградации при эксплуатации за счёт высокой химической активности аминогрупп или неполного уравнивания [2]. Интересно отметить, что тиомочевина используется в ОФ ВЭЖХ в качестве маркера мёртвого времени [150], её также можно детектировать спектрофотометрически при длине волны 240 нм. За счёт хорошей корреляции фактора удерживания тиомочевина с соотношением объёмов фаз данное соединение может служить потенциальным маркером гидрофильных свойств неподвижных фаз. Подробное изучение механизмов удерживания тиомочевина на сорбентах разных типов, в том числе с использованием методологии Гуо, могло бы прояснить перспективы применения данного маркера.

6.2. Выбор маркера анионообменных свойств

Как было рассмотрено в обзоре литературы, для характеристики анионообменных свойств неподвижных фаз используют коэффициент селективности гидрофобного аниона и нейтрального соединения. В тесте Танака для гидрофильной хроматографии такой парой служит *p*-толуолсульфонат и уридин ($\alpha(AH)$) [69]. В ряде работ вместо уридина используют урацил [103,106]. Однако было продемонстрировано, что значения данного параметра, измеренные для аминированных неподвижных фаз на основе полистирол-дивинилбензола, не коррелируют с фактором удерживания хлорида в ионной хроматографии [106]. Авторы предполагают, что на величину $\alpha(AH)$ влияют гидрофобные и π - π взаимодействия между толуолом, входящим в состав *p*-толуолсульфоната, и ароматической матрицей сорбента [34,106,120]. Это оправдано, поскольку подобные неподвижные фазы обеспечивают удерживание алкилбензолов, в том числе толуола, в элюенте, содержащем 90 об.% ацетонитрила, с сохранением порядка выхода, характерного для ОФ ВЭЖХ [151].

В тесте Танака, разработанном на модифицированных силикагелях, заведомо используют сульфонат с гидрофобным заместителем и нормируют его удерживание на фактор удерживания нейтрального соединения, для того чтобы сократить влияние гидрофильных взаимодействий на параметр. С целью проверки его применимости

для характеристики анионообменных свойств предложили сравнить механизмы удерживания веществ-маркеров на неподвижных фазах на основе силикагеля и полимера. Дополнительно были рассмотрены более гидрофильные алкансульфонаты (бутан-, пропан-, этан-, метан-) и неорганические ионы (хлорид, нитрат), выбранные в данной работе в качестве новых маркеров анионообменных свойств (рис. 60). Результаты характеристики неподвижных фаз с помощью существующего и предлагаемого параметра сравнивали с ёмкостью колонок.

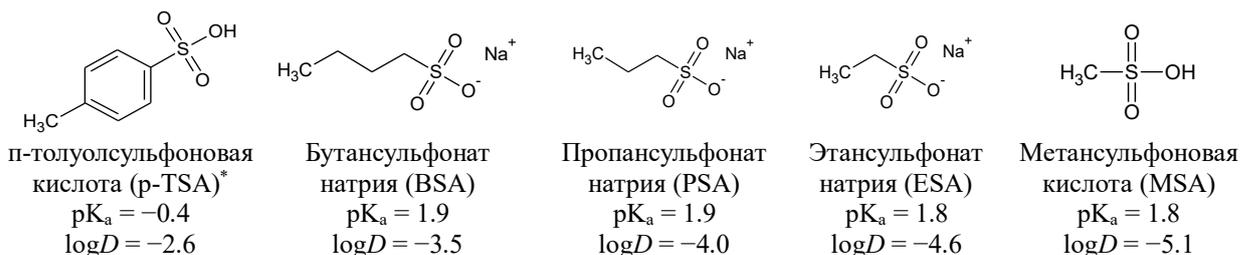


Рис. 60. Структурные формулы тестовых веществ, представленные в форме кислот или анионов в соответствии с используемыми в работе реактивами. pK_a и log D для анионов рассчитаны в программе ACD/Labs 12.01. * Название p-TSA соответствует п-толуолсульфоновой кислоте, а SPTS – ее натриевой соли.

В качестве подвижной фазы использовали смесь аммонийно-ацетатного буферного раствора w_pH 4.7 и ацетонитрила, аналогичную элюенту в тесте Танака [69]. В данных условиях все сульфокислоты ожидаемо присутствуют в форме анионов. Благодаря высокой летучести компонентов подвижной фазы было возможным использование испарительного детектора по светорассеянию для регистрации пиков соединений, слабо поглощающих УФ излучение при рабочих длинах волн.

6.2.1. Изучение механизмов удерживания веществ-маркеров

Изучение механизмов удерживания анионов путём варьирования концентрации буферного раствора и содержания воды в элюенте проводили на четырёх неподвижных фазах, содержащих аминогруппы (табл. 9 стр. 55), на основе силикагеля (С4, С9) и полистирол-дивинилбензола (П1, П2). Возможность использования сорбентов П1 и П2 для разделения полярных, гидрофобных соединений, а также неорганических анионов в условиях ионной хроматографии, была показана в работах [120,121]. Несмотря на различия в структуре функциональных слоёв четырёх выбранных неподвижных фаз, ожидали, что основное влияние на свойства фаз будет оказывать матрица.

Для неподвижных фаз на основе силикагеля при использовании элюента, содержащего 90 об.% ацетонитрила, было показано, что удерживание сульфонов увеличивается с уменьшением гидрофобности заместителя (рис. 61, Приложение 8), что согласуется с классическими трендами в гидрофильной хроматографии и может являться следствием влияния механизма распределения на удерживание. Для фаз на основе ПС-ДВБ порядок выхода анионов нарушался, фактор удерживания п-толуолсульфоната был сопоставим или выше таковых для более гидрофильных алкансульфонатов, что, по-видимому, демонстрировало влияние специфических взаимодействий между p-TSA и ароматической матрицей. Удерживание хлорида было выше, чем сульфонов, а также поляризуемого нитрата на всех сорбентах, как в работе [30], что противоположно традиционному порядку выхода в ионной хроматографии. Вероятно, это связано с большей гидратной оболочкой хлорида по

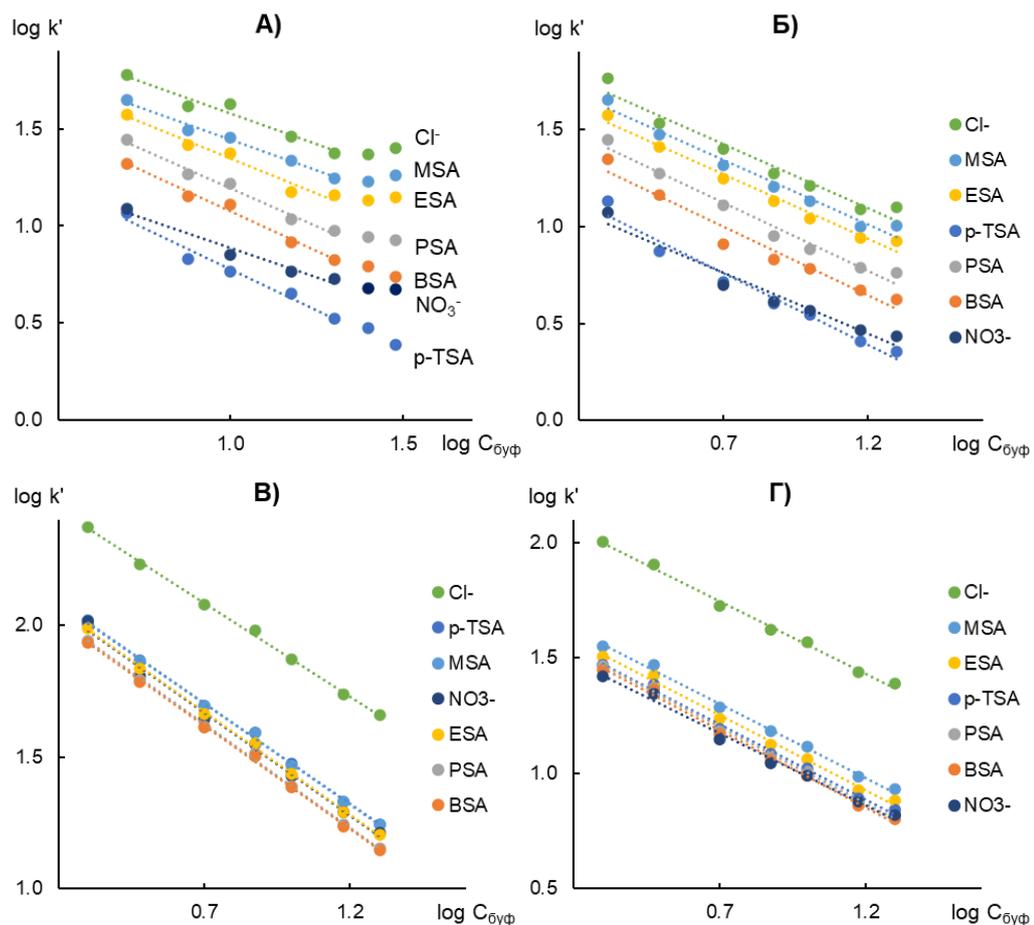


Рис. 61. Зависимости факторов удерживания анионов от концентрации буферного раствора в билогарифмических координатах на неподвижных фазах А) С4, Б) С9, В) П1 и Г) П2. Условия: 20-300 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор $w_{\text{pH}} 4.7$ / ацетонитрил 10/90 об.%. $C_{\text{буф}}$ – концентрация буферного раствора в подвижной фазе.

Таблица 32. Угловые коэффициенты, свободные члены и коэффициенты корреляции (указаны по модулю) зависимостей $k'-1/c_{\text{буф}}$ и $\log k'-\log c_{\text{буф}}$ для анионов на аминированных неподвижных фазах. $n=5$, $P=0.95$ для С4, $n=7$, $P=0.95$ для С9, П1, П2. Условия указаны в подписи к рис. 61

Анион	$k' = a/c_{\text{буф}} + b$			$\log k' = s \cdot \log c_{\text{буф}} + \text{const}$		
	a	b	r	s	const	r
Неподвижная фаза С4						
p-TSA	57±7	0	0.997	-0.8±0.3	1.6±0.3	0.986
BSA	110±10	0	0.996	-0.8±0.2	1.9±0.2	0.994
PSA	150±20	0	0.996	-0.8±0.2	2.0±0.2	0.992
ESA	160±40	6±5	0.991	-0.7±0.2	2.1±0.3	0.984
MSA	170±40	10±4	0.993	-0.6±0.1	2.1±0.1	0.994
Cl ⁻	230±60	12±8	0.997	-0.6±0.2	2.2±0.3	0.979
NO ₃ ⁻	50±10	3±1	0.997	-0.6±0.3	1.5±0.4	0.985
Неподвижная фаза С9						
p-TSA	26±4	0	0.993	-0.7±0.2	1.3±0.1	0.985
BSA	40±5	2±1	0.993	-0.7±0.2	1.5±0.2	0.979
PSA	50±3	2.7±0.8	0.999	-0.7±0.1	1.6±0.1	0.988
ESA	65±2	4.7±0.6	0.999	-0.7±0.1	1.7±0.1	0.991
MSA	77±5	5±1	0.998	-0.7±0.1	1.8±0.1	0.989
Cl ⁻	100±20	6±4	0.990	-0.7±0.2	1.9±0.1	0.980
NO ₃ ⁻	20±2	1.5±0.6	0.996	-0.6±0.2	1.2±0.2	0.978
Неподвижная фаза П1						
p-TSA	180±20	11±4	0.997	-0.76±0.04	2.23±0.03	0.999
BSA	160±10	8±3	0.998	-0.78±0.03	2.16±0.03	0.999
PSA	160±10	8±3	0.998	-0.78±0.04	2.17±0.04	0.999
ESA	180±10	9±3	0.998	-0.78±0.03	2.22±0.03	0.999
MSA	190±10	10±3	0.998	-0.77±0.04	2.24±0.04	0.999
Cl ⁻	410±40	30±10	0.997	-0.71±0.03	2.58±0.03	0.999
NO ₃ ⁻	190±20	7±5	0.996	-0.78±0.08	2.21±0.07	0.996
Неподвижная фаза П2						
p-TSA	52±7	5±2	0.993	-0.65±0.06	1.67±0.05	0.997
BSA	50±7	5±2	0.992	-0.67±0.05	1.66±0.05	0.998
PSA	51±7	5±2	0.993	-0.66±0.05	1.67±0.04	0.998
ESA	56±9	6±2	0.991	-0.65±0.05	1.71±0.05	0.997
MSA	62±9	6±2	0.992	-0.64±0.04	1.75±0.04	0.998
Cl ⁻	170±20	18±5	0.995	-0.63±0.05	2.19±0.05	0.997
NO ₃ ⁻	45±7	5±2	0.990	-0.62±0.07	1.61±0.06	0.996

сравнению с другими анионами, что приводит к большему удерживанию в адсорбированном слое воды.

При варьировании концентрации буферного раствора от 2 до 20 мМ в подвижной фазе были получены линейные зависимости $k'-1/c_{\text{буф}}$ и $\log k'-\log c_{\text{буф}}$ (рис. 61, табл. 32) для всех анионов на рассматриваемых неподвижных фазах, что свидетельствовало о реализации механизма ионного обмена. Увеличение

концентрации до 30 мМ приводило к возрастанию факторов удерживания метан-, этансульфоната и хлорида на аминопропилсиликагеле (С4), что, по-видимому, было вызвано значительным подавлением ионного обмена и ростом удерживания за счёт распределения [67]. Стоит отметить, что в используемой системе элюирующим ионом является ацетат, однако расчёт его равновесной концентрации в подвижной фазе затруднен из-за диссоциации аммония в водно-органической среде (см. раздел 3.4.1). Поэтому в уравнениях, описывающих ионный обмен, использовали общую концентрацию буферного раствора, прямо пропорциональную концентрации ацетата.

В большинстве случаев билогарифмические зависимости $\log k' - \log c_{\text{буф}}$ имели угловые коэффициенты, отличные от -1 , а зависимости $k' - 1/c_{\text{буф}}$ не проходили через начало координат (имели не нулевые свободные члены b), что демонстрировало влияние неионных взаимодействий на удерживание анионов (табл. 32). Только для п-толуолсульфоната на неподвижных фазах на основе силикагеля, а также бутан- и пропансульфоната на аминопропилсиликагеле (С4) зависимости были близки к теоретическим со 100% вкладом ионного обмена в удерживание, что подтверждало корректность использования р-TSA (SPTS) в качестве маркера для оценки анионообменных свойств фаз на основе силикагеля в тесте Танака. Стоит отметить, что угловой коэффициент a и свободный член b зависимости $k' - 1/c_{\text{буф}}$ возрастал с увеличением гидрофильности сульфонатов на модифицированных силикагелях, отражая их возрастающее сродство к ним, для полимерных сорбентов такой зависимости не наблюдали.

Рассматриваемые неподвижные фазы отличались по абсолютным факторам удерживания анионов. Их сравнение при низких концентрациях буферного раствора в элюенте, когда электростатические взаимодействия проявляются в значительной степени, предполагаемо даёт представление об относительной ёмкости колонок (см. уравнение (22) стр. 26), которая соотносилась следующим образом: С4 > С9, П1 > П2. Однако результаты сравнения неподвижных фаз на основе силикагеля и ПС-ДВБ зависели от используемого аниона. Например, по факторам удерживания р-TSA фазы соотносились следующим образом (k' при 5 мМ буферного раствора в элюенте): П1 (49.7) > П2 (15.5) > С4 (11.7) > С9 (5.2), тогда как по MSA: П1 (49.5) > С4 (44.3) > С9 (20.8) > П2 (19.4). Приведённый пример наглядно демонстрирует

важность правильного выбора вещества-маркера для сравнения неподвижных фаз. Различия в ранжировании, по-видимому, связаны с влиянием матрицы на константы ионного обмена K_{IEX} . На данном этапе сделать выбор в пользу одного или другого аниона не представлялось возможным.

Далее проводили варьирование доли воды от 6.7 до 20 об.% при 10 мМ концентрации буферного раствора в подвижной фазе с целью выяснения природы неионных взаимодействий, влияющих на удерживание веществ. В большинстве случаев зависимости факторов удерживания ионов от содержания воды имели U-образную форму (рис. 62), как было показано в работе [63]. При увеличении доли сильного растворителя от 6.7 до 15 об.% было отмечено снижение факторов удерживания алкансульфонатов и хлорида на всех неподвижных фазах, что является характерным при удерживании за счёт распределения. В данный диапазон входило

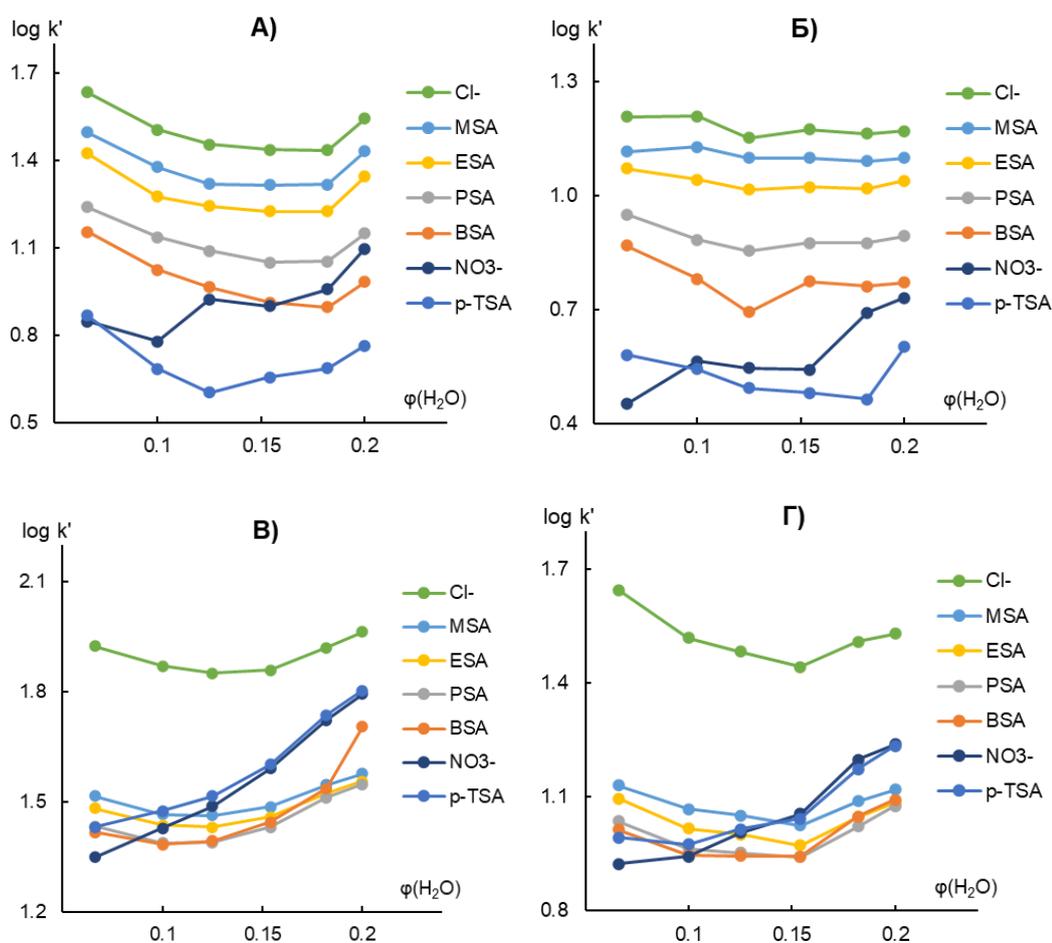


Рис. 62. Зависимости факторов удерживания анионов от доли воды в элюенте на неподвижных фазах А) С4, Б) С9, В) П1 и Г) П2. Условия: аммонийно-ацетатный буферный раствор w_{pH} 4.7 / ацетонитрил 6.7/93.3 – 20/80 об.%. Концентрация буферного раствора в подвижной фазе 10 мМ.

содержание воды 10 об.%, при котором изучали влияние концентрации буферного раствора. Можно предположить, что наряду с ионным обменом более гидрофильные анионы удерживаются в адсорбированном на неподвижной фазе слое воды. Подобный тренд также наблюдали для п-толуолсульфоната на модифицированных силикагелях, несмотря на близкий к 100% вклад ионного обмена. Дальнейшее возрастание удерживания анионов, вероятно, является следствием влияния разного количества ацетонитрила на диэлектрическую проницаемость среды, константы ионного обмена и диссоциации, а также на объем адсорбированной фазой воды. Уменьшение содержания ацетонитрила, вероятно, приводит к увеличению доли протонированных аминогрупп сорбентов и, как следствие, возрастанию силы притяжения анионов. Отмеченные факторы в результате приводят к увеличению вклада ионного обмена в удерживание, как было показано для аниона п-толуолсульфоната на силикагеле, модифицированном эремомицином (см. раздел 4.2.1).

Фактор удерживания NO_3^- увеличивался с ростом доли воды на всех неподвижных фазах. Такой тренд характерен для удерживания веществ в режиме обращенно-фазовой хроматографии. Аналогичный вид имели зависимости для п-толуолсульфоната на фазах на основе ПС-ДВБ, подтверждая предположение о влиянии гидрофобных взаимодействий на его удерживание на данном типе сорбентов. Отличие трендов для нитрата и п-толуолсульфоната от остальных анионов приводило к существенному изменению селективности их разделения.

Поскольку данную работу по изучению механизмов удерживания анионов проводили на оборудовании с испарительным детектором по светорассеянию, и некоторые аналиты были в форме натриевых солей (рис. 60), то пик катиона также фиксировали на хроматограммах. Интересно отметить, что его удерживание было неожиданно высоким на положительно заряженных неподвижных фазах. Поэтому дополнительно были изучены **закономерности удерживания катионов** щелочных и щелочноземельных металлов в тех же условиях.

Одинаковый порядок выхода катионов наблюдали на всех рассматриваемых неподвижных фазах с анионообменными свойствами (рис. 63). Для катионов щелочных металлов он был противоположен таковому в катионообменной хроматографии в водной среде [152] и на силикагеле в ГИХ (рис. 63), что являлось

следствием иного механизма удерживания в элюенте с высоким содержанием ацетонитрила. На аминированных сорбентах удерживание возрастало с ростом величины гидратированного радиуса ($r_{\text{гидр}}(\text{K}^+)=0.331$ нм, $r_{\text{гидр}}(\text{Na}^+)=0.358$ нм, $r_{\text{гидр}}(\text{Li}^+)=0.382$ нм [153]). По-видимому, гидратная оболочка катионов, формирующаяся даже в присутствии ацетонитрила [154], приводит к их распределению в водный слой на поверхности сорбента, несмотря на электростатическое отталкивание от положительно заряженной фазы. Факторы удерживания Mg^{2+} и Ca^{2+} на анионообменниках имели экстремальные значения, превышающие таковые для анионов, и не согласовались с величинами гидратированных радиусов ($r_{\text{гидр}}(\text{Ca}^{2+})=0.412$ нм, $r_{\text{гидр}}(\text{Mg}^{2+})=0.428$ нм [153]). Предположили, что данное поведение катионов щелочноземельных металлов связано с вкладом комплексообразования в их удерживание.

Более высокие факторы удерживания катионов были получены на модифицированных силикагелях, которые, по-видимому, адсорбируют большее количество воды из элюента, способствующей механизму распределения, а также обеспечивают дополнительное удерживание на остаточных силанолах матрицы. Данным закономерностям не удовлетворяло значительное удерживание катиона кальция на фазе П2, вероятно, из-за связывания Ca^{2+} с хелатообразующими фрагментами этилендиамина и этиленгликоля в структуре сорбента, наличие которых предполагали на основании информации о его синтезе (табл. 9 стр. 55).

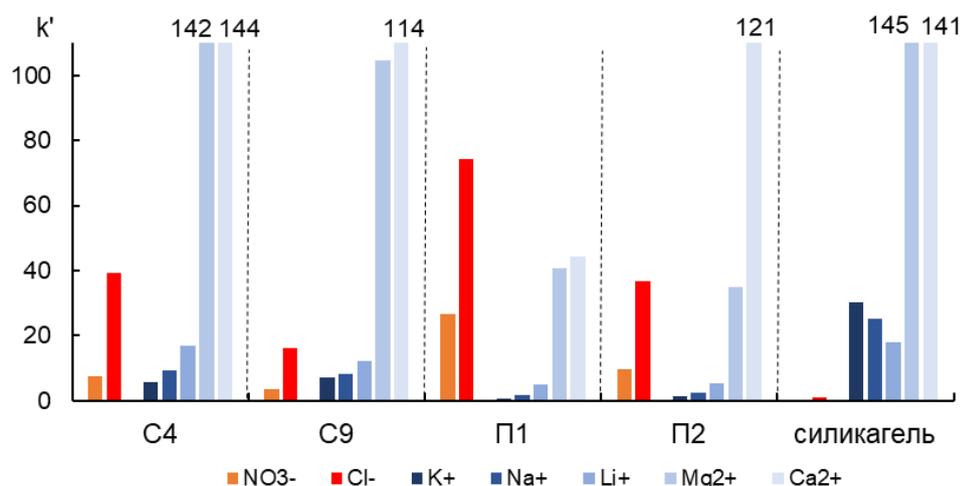


Рис. 63. Сравнение факторов удерживания неорганических ионов на немодифицированном силикагеле С1 и неподвижных фазах С4, С9, П1, П2. Условия: 100 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор $\text{pH} 4.7$ / ацетонитрил 10/90 об. %.

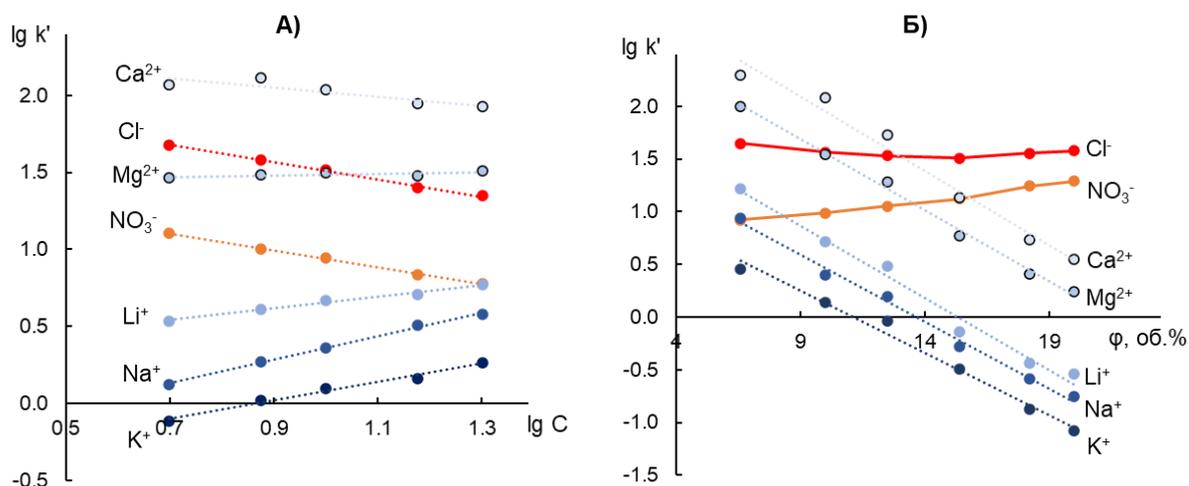


Рис. 64. Зависимости факторов удерживания неорганических ионов на фазе П2 от А) концентрации буферного раствора в подвижной фазе, условия: аммонийно-ацетатный буферный раствор $w_{\text{pH}} 4.7$ / ацетонитрил 10/90 об.%, диапазон концентраций 5-20 мМ в элюенте; Б) содержания воды в подвижной фазе, условия: аммонийно-ацетатный буферный раствор $w_{\text{pH}} 4.7$ / ацетонитрил, 6.7/93.3 – 20/80 об.%. Концентрация буферного раствора в подвижной фазе – 10 мМ.

Таблица 33. Угловые коэффициенты зависимостей $\log k' - \log c_{\text{буф}}$ и $\log k' - \phi$. Коэффициент корреляции $r > 0.960$ для катионов щелочных металлов, $r > 0.871$ для катионов щелочноземельных металлов. Условия указаны в подписи к рис. 64

Угловой коэфф.	$\log k' - \log c_{\text{буф}}$				$\log k' - \phi$			
	С4	С9	П1	П2	С4	С9	П1	П2
K^+	0.59	0.46	0.93	0.60	-0.06	-0.07	-0.14	-0.11
Na^+	0.74	0.54	0.81	0.77	-0.08	-0.08	-0.13	-0.13
Li^+	0.57	0.41	0.51	0.38	-0.10	-0.10	-0.15	-0.14
Mg^{2+}	0.22	0.27	0.13	0	-0.12	-0.12	-0.15	-0.14
Ca^{2+}	0.25	0.33	0.11	-0.30	-0.12	-0.12	-0.15	-0.14

При увеличении концентрации буферного раствора в элюенте, содержащем 90 об.% ацетонитрила, наблюдали рост факторов удерживания однозарядных катионов (рис. 64А), что подтверждало влияние электростатического отталкивания. Зависимости факторов удерживания от концентрации $\log k' - \log c_{\text{буф}}$ были линейны (табл. 33), угловые коэффициенты которых имели наименьшие значения для катиона лития с бóльшим радиусом гидратной оболочки и, по-видимому, меньшим отталкиванием от положительно заряженных фаз. Факторы удерживания катионов щелочноземельных металлов слабо зависели от концентрации буферного раствора, вероятно, из-за влияния комплексообразования.

Увеличение содержания воды в элюенте ϕ от 6.7 до 20 об.% приводило к существенному уменьшению факторов удерживания катионов (рис. 64Б, табл. 33) вплоть до $k'=0$ для Na^+ и K^+ на фазе П1 при 20 об.%. При этом линейность

зависимостей в координатах $\log k' - \varphi$ (уравнение (11) стр. 21) доказывала влияние механизма распределения для катионов на аминированных фазах на основе силикагеля и ПС-ДВБ. Подобное поведение катионов в условиях гидрофильной хроматографии ранее было показано только на неподвижных фазах, имеющих как анионо-, так и катионообменные центры [155].

Зависимости факторов удерживания неорганических катионов и анионов от двух параметров подвижной фазы на колонке П2 наглядно демонстрируют их влияние на селективность разделения (рис. 64). Для фаз С4, С9 и П1 закономерности удерживания имели аналогичный вид, отличающийся абсолютными значениями факторов удерживания и в ряде случаев углом наклона, как указано на рис. 63 и в табл. 33. Данные закономерности позволили выбрать условия экспрессного разделения смеси неорганических катионов и анионов на анионообменниках (рис. 65). Эффективность для ионов достигала 45000 тт/м на аминированном силикагеле и 40000 тт/м на аминированном ПС-ДВБ.

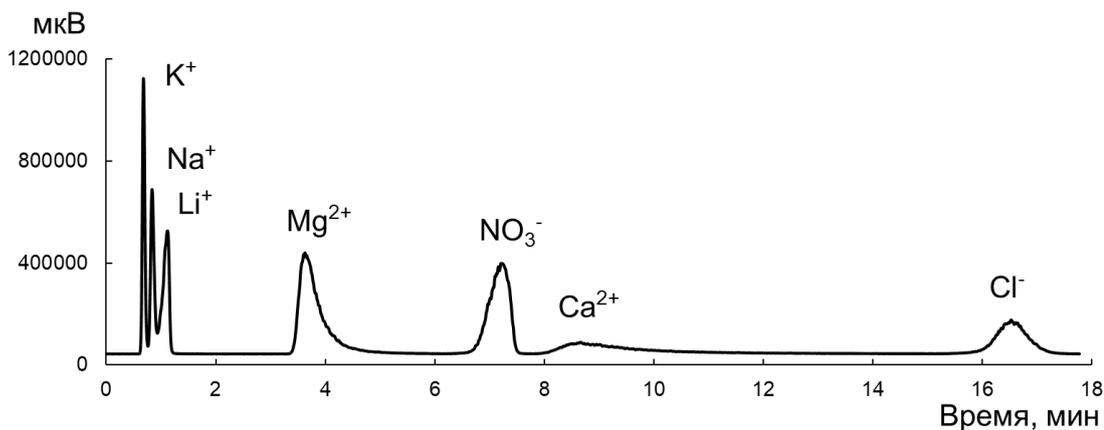


Рис. 65. Хроматограмма модельной смеси неорганических ионов на аминированной неподвижной фазе на основе полистирол-дивинилбензола П2 (размер колонки 100×4 мм). Условия: 65 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор w/w рН 4.7/ацетонитрил 15.4/84.6 об.%, скорость потока 1.8 мл/мин, испарительный детектор по светорассеянию. Концентрации ионов в смеси: K^+ – 60 мг/л, Na^+ – 50 мг/л, Li^+ – 30 мг/л, Mg^{2+} – 60 мг/л, Ca^{2+} – 120 мг/л, NO_3^- – 500 мг/л, Cl^- – 570 мг/л.

Таким образом, с опорой на закономерности удерживания анионов на неподвижных фазах на основе разных матриц при варьировании концентрации буферного раствора и доли воды в элюенте было подтверждено влияние гидрофильных взаимодействий для п-толуолсульфоната на аминированном силикагеле и гидрофобных на аминированном ПС-ДВБ в условиях теста Танака. В последнем случае селективность $\alpha(AX) = k'(SPTS)/k'(уридин)$ ожидаемо является

некорректной оценкой анионообменных свойств фаз, поскольку деление на фактор удерживания предположительно снижает влияние гидрофильных взаимодействий на параметр. Возможным решением может быть замена п-толуолсульфоната более гидрофильным анионом. Среди рассматриваемых аналитов метансульфонат представляется более подходящим, поскольку для сульфонов с большей длиной алкильной цепи также возможно проявление гидрофобных взаимодействий, тренды для нитрата аналогичны таковым для p-TSA, а удерживание хлорида значительно выше при схожем с MSA поведении. Несмотря на сделанный выбор нового маркера на основе механизмов удерживания, требуется проверка с использованием информации о ёмкости колонок.

6.2.2. Анионообменная ёмкость колонок

Традиционным методом определения ёмкости колонок является вытеснительная хроматография в водной среде (см. раздел 1.4.1). Однако в присутствии 90 об.% ацетонитрила в элюенте неподвижная фаза адсорбирует воду, а также изменяются константы диссоциации ионогенных групп сорбента, что в совокупности может уменьшать число доступных для ионного обмена заряженных центров. Поскольку ёмкость может существенно изменяться в зависимости от условий, то была предпринята попытка её измерения в среде с высоким содержанием ацетонитрила. Сравнивали результаты, полученные тремя способами, отличающиеся составом элюента, в котором происходило заполнение и вытеснение ионов:

- 1) способ 'В' – вытеснительная хроматография в водной среде;
- 2) способ 'В/А' – вытеснительная хроматография с элюентом вода/ацетонитрил 10/90 об.%;
- 3) способ 'В/А-В' – колонка уравнивается в элюенте вода/ацетонитрил 10/90 об.%, затем постепенно перемывается на воду и ионы вытесняются в водной среде.

В качестве вытесняемого и вытесняющего ионов использовали хлорид и нитрат (табл. 4 стр. 33), имеющие различающиеся коэффициенты молярного поглощения в диапазоне длин волн 190-230 нм, что позволило следить за процессом вытеснения с использованием спектрофотометрического детектора. Кроме того, их натриевые соли хорошо растворимы в присутствии 90 об.% ацетонитрила.

Концентрации NO_3^- и Cl^- составляли 10 и 20 мМ, соответственно, в водных и водно-органических элюентах, что обеспечивало вытеснение одного иона другим менее чем за 60 мин. Концентрацию вытесненных с колонки ионов, эквивалентную числу заряженных групп неподвижной фазы, определяли методом ионной хроматографии в способах 'В' и 'В/А-В' и гидрофильной хроматографии в водно-органических образцах из способа 'В/А' (см. раздел 2.7).

Роль вытесняемого и вытесняющего ионов зависела от среды, в которой проводилось вытеснение. Первый должен иметь меньшее сродство к неподвижной фазе, чем второй. Поскольку хлорид удерживается меньше нитрата в водной среде, а нитрат меньше хлорида в присутствии 90 об.% ацетонитрила (см. раздел 6.2.1), то роль вытесняемого иона в способах 'В' и 'В/А-В' играл хлорид, а в способе 'В/А' – нитрат. Для проверки эффективности процесса вытеснения иона, являющегося ключевой стадией определения ёмкости колонки, в выбранных условиях провели его детальное изучение путём поминутного сбора элюата (рис. 66). Полученные зависимости концентрации анионов от времени проведения процесса подтверждают полное вытеснение одного иона другим, как в водной, так и в водно-органической среде.

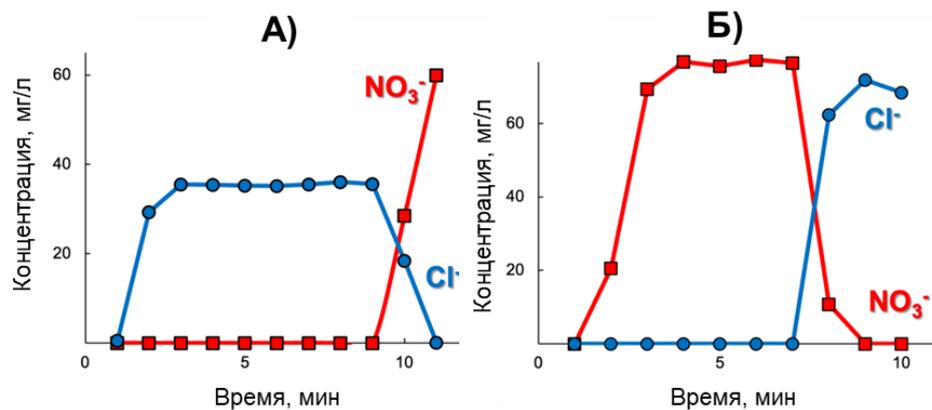


Рис. 66. Зависимость состава элюата от времени протекания процесса вытеснения на колонке ПЗ. А) Вытеснение хлорида 10 мМ раствором нитрата в воде (способы 'В' и 'В/А-В'). Б) Вытеснение нитрата 20 мМ раствором хлорида в смеси вода/ацетонитрил 10/90 об.% (способ 'В/А'). Концентрации Cl^- и NO_3^- измерены методами ионной и гидрофильной хроматографии, соответственно (см. раздел 2.7).

В выбранных условиях были протестированы колонки С4, С9, П1 и П2, а также восемь неподвижных фаз на основе силикагеля и ПС-ДВБ (табл. 34). Значения ёмкости представлены в единицах $\text{мкмоль}/1 \text{ см}^3$ колонки, поскольку используемые колонки имеют разные размеры, а информация о массе сорбента в колонке

неизвестна. Полученные величины являются кажущейся ёмкостью, поскольку зависят от условий их получения, в том числе рН. Это можно заметить для большинства фаз на основе силикагеля. Нулевые значения ёмкости аминопропилсиликагеля (С4) и сорбента с низкомолекулярным модификатором на его основе (С9), вероятно, связаны с образованием связей между amino- и силанольными группами [145,156]. Более стабильные результаты ёмкости были получены на неподвижной фазе С5 (Polyamine II, УМС) с полимерным функциональным слоем, а также фазах на основе ПС-ДВБ, для которых предполагают наличие четвертичных аминогрупп. Для них ёмкости, установленные в водно-ацетонитрильной среде (способ 'В/А'), были меньше, чем в других условиях, вероятно, из-за особенностей, отмеченных выше, или меньшей доступности заряженных центров для нитрата, большего по размеру, чем хлорид.

Таблица 34. Результаты характеристики неподвижных фаз: анионообменная ёмкость, измеренная тремя способами 'В', 'В/А' и 'В/А-В', факторы удерживания веществ-маркеров и метиленовая селективность, полученные в условиях: 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор w_{pH} 4.7/ацетонитрил 10/90 об.%

Неподвижная фаза	Ёмкость 'В/А', мкмоль/см ³ *	Ёмкость 'В/А-В', мкмоль/см ³	Ёмкость 'В', мкмоль/см ³	k' (p-TSA)	k' (MSA)	k' (U)	α (CH ₂)***
С4	9	0	0 (36)**	18.1	61.2	4.6	0.77 (1.4)
С9	33	0	0 (16)	13.9	46.0	2.6	0.79 (1.4)
С5	99	161	150	39.8	180.4	5.5	0.67 (1.5)
С10	6	3	36 (33)	17.9	40.8	5.8	0.83 (1.4)
С6	22	33	31 (54)	35.2	54.4	2.4	0.89 (1.2)
С2	0	0	2	2.7	8.2	3.6	0.77 (1.1)
П1	74	93	90	100.9	104.5	2.3	0.98 (1.4)
П2	44	48	49	34.6	42.5	1.2	0.97 (1.3)
П3	60	56	63	75.9	65.2	0.8	1.02 (1.2)
П4	14	13	15	29.9	23.8	0.7	1.06 (1.1)
П5	93	145	125	92.3	92.0	2.1	1.00 (1.3)
П6	79	102	104	111.6	131.4	2.4	0.99 (1.3)

* Объёмы колонок: 0.7065 см³ для С4, С9, С10, С6 и С2, 2.4916 см³ для С5, 1.256 см³ для «П»-колонок;

** ёмкости, указанные в скобках, измерены при заполнении ионообменных центров анионами при рН 3.5, остальные значения получены без контроля рН (рН~5.5);

*** метиленовая селективность $\alpha(\text{CH}_2)=k'(\text{BSA})/k'(\text{PSA})$, значения в скобках: $\alpha(\text{CH}_2)=k'(\text{уридин})/k'(\text{5-метилуридин})$ из теста Танака [69].

Таким образом, способ 'В/А-В' кажется наиболее подходящим для определения числа заряженных групп, доступных для взаимодействия в условиях гидрофильной хроматографии. Однако для сорбентов на основе силикагеля необходим контроль рН, проще реализуемый в водной среде.

6.2.3. Альтернативный параметр для оценивания анионообменных свойств неподвижных фаз

По аналогии с параметром $\alpha(\text{AX})$ и с учётом изученных механизмов удерживания анионов предположили, что нормирование фактора удерживания метансульфоната на фактор удерживания подходящего соединения может позволить лучше характеризовать сорбенты. В идеальном случае данное вещество должно вступать во все взаимодействия с неподвижной фазой, как MSA, кроме ионного обмена. Однако подобрать соединение структурно похожее на метансульфонат с аналогичной гидрофильностью достаточно сложно. Предположили, что высокогидрофильные цвиттер-ионные соединения N-метилтаурин и таурин могут подойти для этой цели (рис. 67), учитывая отсутствие электростатических взаимодействий для аминокислоты фенилаланина (см. раздел 4.1.2). Для сравнения также тестировали уридин [69] и урацил [103], используемые в паре с п-толуолсульфонатом.

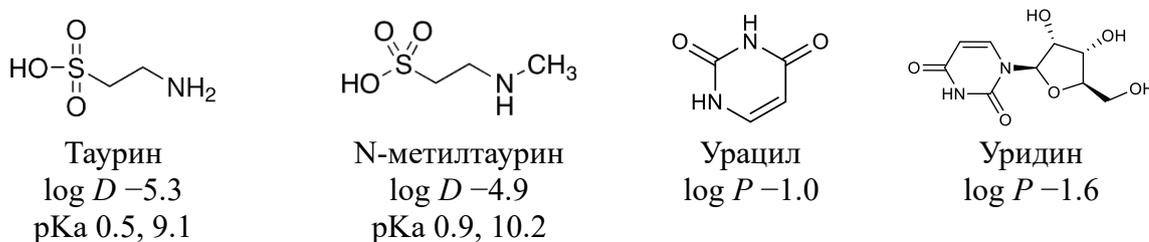


Рис. 67. Структурные формулы и свойства тестовых веществ, предлагаемых для нормировки удерживания метансульфоната. pKa, $\log P$ и $\log D$ для цвиттер-ионов рассчитаны в программе ACD/Labs 12.01.

Рассмотрели закономерности удерживания данных соединений на фазах С4, С9, П1 и П2 при варьировании концентрации буферного раствора и доли воды в элюенте в тех же условиях, что для анионов. Во-первых, одинаковый порядок выхода веществ соблюдался на всех сорбентах: урацил < уридин < N-метилтаурин < таурин. Он согласовался с возрастанием их гидрофильности, оцененной параметрами $\log P$ и $\log D$, отражая влияние механизма распределения на удерживание. Величины факторов удерживания данных веществ на неподвижных фазах соотносились

следующим образом: П2 < П1 < С9 < С4, по-видимому, демонстрируя различия фаз в гидрофильности. Во-вторых, при увеличении концентрации буферного раствора в подвижной фазе факторы удерживания урацила и уридина изменялись слабо, немного возрастают на аминированных силикагелях, тогда как для сульфаминокислот было отмечено уменьшение факторов удерживания в диапазоне от 2 до 10 мМ (рис. 68А,Б). Данный тренд для цвиттер-ионных соединений напоминал закономерности для анионов, демонстрируя влияние электростатических взаимодействий между кислотными группами аналитов и аминогрупп неподвижных фаз. Дальнейшее увеличение концентрации приводило к росту удерживания сульфаминокислот, по аналогии с урацилом и уридином, за счёт увеличения толщины водного слоя [43]. В-третьих, с увеличением доли воды в подвижной фазе происходило снижение факторов удерживания аналитов на неподвижных фазах на

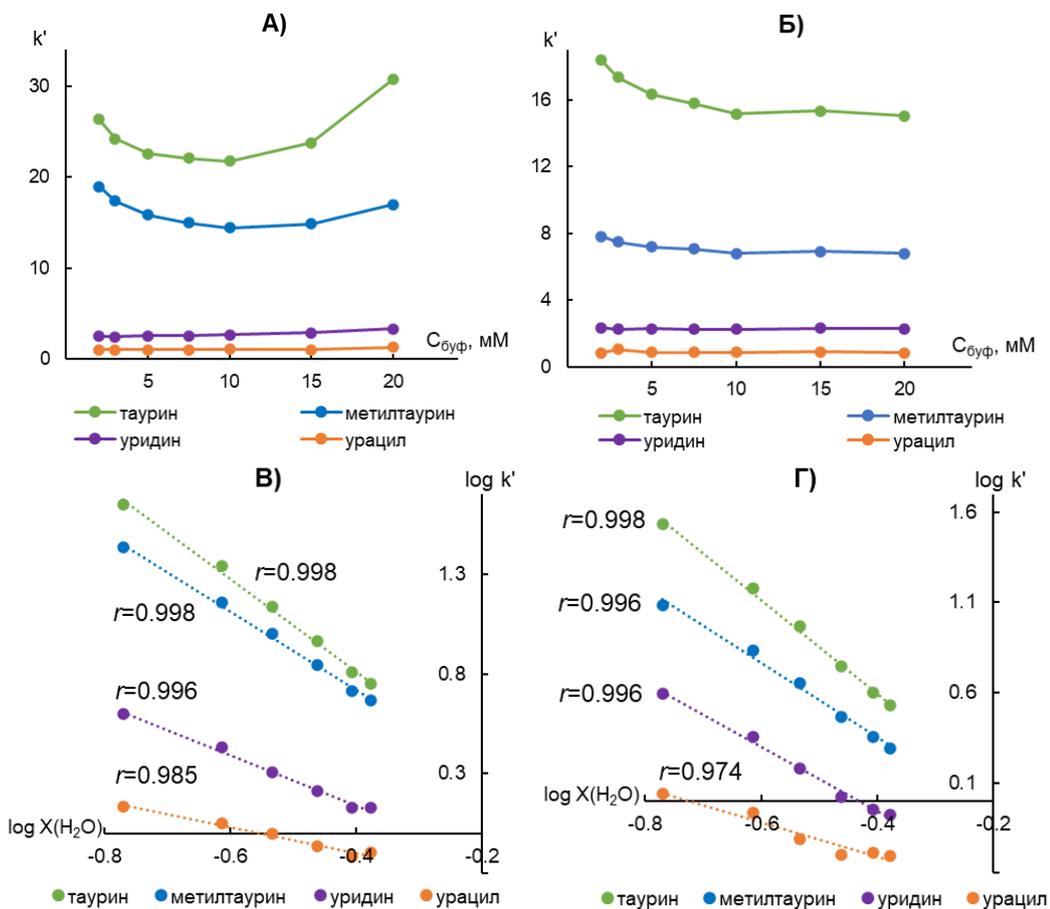


Рис. 68. Закономерности удерживания урацила, уридина, N-метилтаурина и таурина на неподвижных фазах С9 (А, В) и П1 (Б, Г). А), Б) Влияние концентрации буферного раствора ($C_{\text{буф}}$) на удерживание аналитов. Условия: 20-200 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор w/w рН 4.7 / ацетонитрил 10/90 об.%. В), Г) Влияние доли воды в подвижной фазе ($X(\text{H}_2\text{O})$) – мольная доля) на удерживание аналитов. Условия: аммонийно-ацетатный буферный раствор w/w рН 4.7 / ацетонитрил 6.7/93.3 – 20/80 об.%. Концентрация буферного раствора в подвижной фазе 10 мМ.

разных матрицах (рис. 68В,Г). Большие коэффициенты корреляции линейных зависимостей были получены в координатах $\log k' - \log X(H_2O)$, отвечающих механизму адсорбции (уравнение (12) стр. 22). Однако установить количественный вклад данного механизма в удерживание веществ по имеющимся данным не представляется возможным, но можно заключить, что существенных различий в удерживании данных соединений на аминированных силикагеле и ПС-ДВБ не наблюдается. Таким образом, аминосульфокислоты не удовлетворяют требованиям к веществу для нормировки удерживания метансульфоната. Стоит отметить, что фактор удерживания урацила в подвижной фазе, содержащей 90 об.% ацетонитрила, на сорбентах П1 и П2 меньше 1, что при расчёте коэффициента селективности α (анион/урацил) приводит к значениям, большим, чем фактор удерживания аниона, что противоречит идее сокращения вклада неионных взаимодействий в его удерживание.

В результате тестировали набор неподвижных фаз с использованием известного маркера анионообменных свойств п-толуолсульфоната, предлагаемого метансульфоната, а также уридина в условиях теста Танака (табл. 34). Дополнительно сравнивали гидрофобность неподвижных фаз по метиленовой селективности, рассчитываемой из факторов удерживания гомологов бутан- и пропансульфонатов [157]. По данному параметру было однозначно показана большая гидрофобность сорбентов на основе полистирол-дивинилбензола (табл. 34) по сравнению с модифицированными силикагелями: для первых величина коэффициента селективности была больше 0.97, для вторых – меньше 0.89, что качественно согласовалось с различием в удерживании гидрофобного толуола на фазах данных типов. Такой вывод нельзя было сделать по величинам $\alpha(CH_2)$ из теста Танака, рассчитываемым как отношение факторов удерживания уридина и 5-метилуридина, поскольку в обоих случаях были получены одинаковые значения из диапазона от 1.1 до 1.5.

Факторы удерживания анионов и коэффициенты селективности по отношению к уридину сравнивали с кажущейся ёмкостью колонок (рис. 69). Было показано отсутствие корреляции параметра анионообменных свойств из теста Танака $\alpha(p-TSA/уридин)$ и ёмкости сорбентов на основе ПС-ДВБ, установленной по способу 'В/А-В'. Аналогичное наблюдали для $\alpha(MSA/уридин)$. Однако было

отмечено, что факторы удерживания анионов p-TSA и MSA хорошо коррелируют с ёмкостью, наибольший коэффициент корреляции $r=0.976$ достигается с метансульфонатом. Проблема оценивания свойств с помощью коэффициента селективности, по-видимому, заключается в величине, на которую нормируется удерживание. Вероятно, это вызвано существенными структурными различиями анионов и уридина.

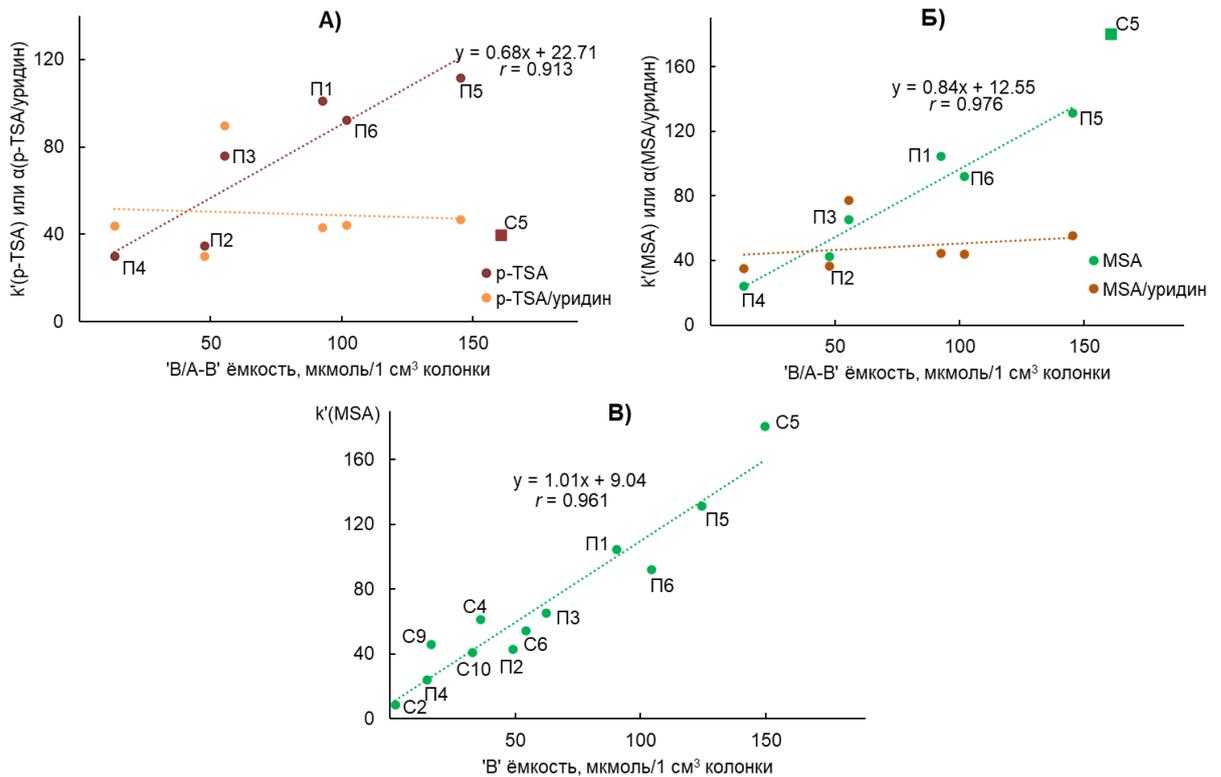


Рис. 69. Корреляции между ёмкостью колонок и А) $k'(p-TSA)$ или $\alpha(p-TSA/уридин)$; Б) $k'(MSA)$ или $\alpha(MSA/уридин)$ для неподвижных фаз на основе ПС-ДВБ; В) $k'(MSA)$ для всех рассматриваемых фаз. Факторы удерживания и коэффициенты селективности измерены в элюенте 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор w_pH 4.7 / ацетонитрил 10/90 об.%.

По фактору удерживания метансульфоната возможно одновременное сравнение сорбентов на основе полимера и силикагеля (рис. 69В), что подтверждается высоким коэффициентом корреляции с ёмкостью колонок, установленной по способу 'В' ($r=0.961$). Использование метансульфоната кажется оправданным, поскольку его удерживание в основном обеспечивается ионным обменом при достаточно низкой концентрации буферного раствора в элюенте (2 мМ). Для более точной количественной оценки анионообменных свойств желателен учёт различающейся гидрофильности неподвижных фаз, а также проверка влияния размера пор на параметр и сравнение констант ионного обмена на

сорбентах на основе разных матриц. На точность также влияет форма пика вещества-маркера, для рассмотренных колонок эффективность MSA превышала 8000 тт/м, асимметрия была в диапазоне 0.7-1.0.

Другим направлением для улучшения параметра анионообменных свойств может быть учёт гидрофобных и π - π взаимодействий п-толуолсульфоната с матрицей ПС-ДВБ. Возможным подходом может являться нормировка на фактор удерживания толуола или п-толуолсульфонамида, похожих структурно, но не участвующих в ионном обмене. Однако используемое в данном исследовании хроматографическое оборудование с испарительным детектором не позволяло фиксировать пики для высоколетучего толуола на аминированных ПС-ДВБ. Это исследование может быть продолжено с использованием спектрофотометрического детектирования, подходящего для предлагаемых аналитов.

Заключение из главы 6

Установлено, что существующие параметры гидрофильности (фактор удерживания уридина и коэффициент селективности цитозин/урацил), применяемые для характеристики полярных неподвижных фаз, описывают разные свойства. Из этих параметров фактор удерживания уридина даёт более корректную оценку количества воды, адсорбированной на фазе. Лучших результатов позволяет добиться использование тиомочевины в качестве маркера гидрофильности сорбента. Необходима дальнейшая проверка применимости данного соединения для более широкого круга неподвижных фаз. Показано, что для оценки метиленовой селективности сорбентов в гидрофильной хроматографии предпочтительнее использовать пару гомологов, например, бутан- и пропансульфонат, вместо уридина и его метилированного производного.

Проведенное исследование доказывает, что параметр для характеристики анионообменных свойств из теста Танака (коэффициент селективности п-толуолсульфонат/уридин) не коррелирует с ёмкостью сорбентов на основе полистирол-дивинилбензола. Установлено, что это вызвано влиянием гидрофобных взаимодействий на удерживание п-толуолсульфоната, а также неподходящей нормировкой его удерживания на нуклеозид уридин. В качестве универсального маркера для сравнения анионообменных свойств неподвижных фаз на основе силикагеля и полимера предложен метансульфонат.

Заключение

В результате проведённых исследований предложены улучшения существующих способов изучения полярных неподвижных фаз в режиме гидрофильной хроматографии, существенно дополнена информация об их свойствах, а также закономерностях удерживания веществ различной структуры и заряда. Суммарно изучено поведение в хроматографической системе порядка 60 соединений и 46 неподвижных фаз на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола, промышленно выпускаемых и разработанных в лаборатории хроматографии МГУ. Продемонстрированы возможности одновременного разделения и способы воздействия на селективность положительно, отрицательно заряженных и нейтральных соединений на неподвижных фазах с основными, нейтральными и многофункциональными слоями на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола в элюентах с содержанием ацетонитрила более 80 об. %.

Поскольку механизм удерживания веществ в гидрофильной хроматографии крайне чувствителен к составу элюента, то необходим его тщательный выбор, чему уделяется недостаточное внимание в существующих исследованиях. В работе установлены рекомендации для варьирования рН подвижной фазы с высоким содержанием ацетонитрила, позволяющие минимизировать влияние одновременно изменяющихся параметров, таких как концентрация элюирующего иона и природа компонентов буферного раствора, на удерживание ионизируемых аналитов. Рекомендован способ приготовления буферных растворов, заключающийся в добавлении основания к определенному количеству карбоновой кислоты до заданного $w_p\text{pH}$, концентрация которой соответствует требуемой равновесной концентрации элюирующего иона: $c_{\text{к-ты}} = c_{\text{буф}} = [M]/\alpha_{\text{A-}}$. Его использование в дальнейшем позволило бы унифицировать результаты, получаемые методом гидрофильной хроматографии. На основе выбранных условий предложено проводить варьирование параметров системы (рН, концентрации элюирующего иона, доли ацетонитрила, температуры колонки) при разных наборах фиксированных параметров подвижной фазы, использовать существующие модели связи фактора удерживания с параметрами системы, а также учитывать уменьшение силы кислот и оснований в среде с высоким содержанием ацетонитрила. Это позволило сформировать более глубокое понимание о спектре свойств

разнообразных неподвижных фаз и механизмах удерживания аналитов в условиях гидрофильной хроматографии. Показано влияние структуры сорбента и состава подвижной фазы на вклады распределения, адсорбции и ионного обмена в удерживание аналитов, а также на термодинамические параметры удерживания, что существенно дополняет и подкрепляет теорию метода гидрофильной хроматографии.

Использование комплекса хемометрических подходов (метода главных компонент, иерархической кластеризации, метода К-средних, индекса Рэнда) позволило надёжно сравнить селективность серии полярных неподвижных фаз, разработанных в лаборатории хроматографии МГУ. Во-первых, наглядно показано, что характеристика фаз по тесту Танака имеет недостатки в оценивании их свойств по сравнению с использованием большого набора биологически активных соединений разных классов. Во-вторых, однозначно установлены существенные различия в селективности неподвижных фаз с низко- и высокомолекулярными слоями на силикагеле. Кроме того, выявлено, что достаточно трёх биологически активных соединений (цитидин, 2'-дезоксисуридин, гуанин) вместо 33 для получения аналогичных результатов кластеризации, что позволяет существенно сократить временные и материальные затраты для установления различий в свойствах фаз. Данный комплекс хемометрических подходов и процедура сокращения числа тестовых веществ могут быть полезны для обработки любых хроматографических данных.

Экспрессный способ оценки свойств неподвижных фаз по параметрам удерживания строго установленного набора тестовых веществ (например, тест Танака) широко используют в практике гидрофильной хроматографии. Однако выбору веществ-маркеров не было уделено достаточного внимания. В результате сравнения существующих параметров гидрофильности (фактор удерживания уридина и коэффициент селективности цитозин/урацил) и предложенных в данной работе с соотношением объёмов фаз колонок показано, что фактор удерживания тиомочевины даёт лучшую оценку объёму воды, адсорбированного на неподвижной фазе. Это делает её перспективной заменой уридина для оценки гидрофильности неподвижных фаз в условиях теста Танака. С опорой на механизмы удерживания веществ и ёмкость колонок установлено, что параметр анионообменных свойств из

теста Танака (коэффициент селективности п-толуолсульфонат/уридин) не подходит для характеристики сорбентов на основе полистирол-дивинилбензола. Предложена альтернатива в виде фактора удерживания метансульфоната, обеспечивающая лучшую оценку анионообменной ёмкости. Замена пары уридин/5-метилуридин на бутан-/пропансульфонат позволила доказать большую гидрофобность фаз на основе полистирол-дивинилбензола по сравнению с таковыми на основе силикагеля. Предложенные альтернативные параметры позволят корректнее сравнивать неподвижные фазы.

Выбор способа для изучения свойств интересующей неподвижной фазы зависит от имеющейся априорной информации о ней и потенциальной области её применения. Для новых фаз со сложной структурой функционального слоя следует получать закономерности удерживания тестовых веществ при варьировании состава элюента. Сравнение неподвижных фаз, содержащих схожие функциональные группы, например, от разных производителей удобно проводить с помощью экспрессного подхода по параметрам удерживания веществ-маркеров. В случае, когда заранее известен круг потенциальных аналитов, изучение и сравнение селективности фаз, в том числе с использованием хемометрических подходов, и выбор колонки для анализа можно проводить по данным удерживания этих соединений.

В данной работе на основании проведенной оценки свойств разнообразных неподвижных фаз и установленных закономерностей удерживания веществ успешно выбраны условия разделения аналитов различных кислотно-основных свойств и гидрофильности, входящих в состав безалкогольного негазированного напитка, без проведения дополнительных экспериментов. Это подтверждает перспективность применения полученных результатов для дальнейшей разработки общих стратегий выбора условий анализа реальных объектов в методе гидрофильной хроматографии.

Выводы

1. Предложены решения для улучшения качества характеристики свойств неподвижных фаз для гидрофильной хроматографии, заключающиеся в тщательном выборе состава элюента и подхода к его варьированию для получения корректных профилей удерживания тестовых аналитов, описывающих спектр свойств фаз, применении комплекса хемометрических подходов к большому массиву данных удерживания веществ для эффективного сравнения селективности колонок и выборе новых веществ-маркеров для экспрессной оценки ёмкости сорбентов.
2. Выбраны условия варьирования рН подвижной фазы в диапазоне $w_p\text{pH}$ 2.85-5.76, предполагающие использование буферных растворов на основе муравьиной, уксусной и пропионовой кислот с катионами натрия в качестве противоионов, позволяющие установить влияние индивидуального параметра на профиль удерживания аналита в гидрофильной хроматографии.
3. Показано изменение факторов удерживания катионов, анионов, слабых кислот, оснований и амфолитов на немодифицированном силикагеле и его производных с привитыми основными, нейтральными, гиперразветвлёнными цвиттер-ионными слоями и макромолекулами эремомидина при варьировании состава подвижной фазы. Установлено сходство закономерностей изменения удерживания аналитов при увеличении рН элюента на неподвижных фазах с различными типами функциональных групп.
4. Оценены константы диссоциации ${}^s_pK_a(\text{HA}, \text{BH}^+)$ в водно-органических средах (85 и 90 об.% ацетонитрила) для муравьиной, уксусной, монохлоруксусной, пропионовой, 4-метил-, 4-метоксибензойной, бензойной кислот, ксантина, аммония и кислот, сопряжённых по отношению к 4-диметиламинопиридину, 4-аминопиридину, бензиламину и цитозину, позволяющие учесть уменьшения силы кислот и оснований в среде с высоким содержанием ацетонитрила в условиях гидрофильной хроматографии.
5. Показано, что обработка данных удерживания 33 биологически активных соединений из нескольких классов одновременно методом главных компонент, иерархической кластеризацией, методом К-средних и индексом Рэнда позволила надёжно установить различия неподвижных фаз с низко- и высокомолекулярными модификаторами на основе силикагеля по селективности и выделить три вещества-

маркера (цитидин, 2'-дезоксисуридин и гуанин), позволяющие проводить экспрессное сравнение свойств фаз.

6. Показано, что существующие параметры гидрофильности неподвижных фаз (фактор удерживания уридина из теста Танака и коэффициент селективности цитозин/урацил) характеризуют разные свойства, из которых первый даёт более корректную оценку объёма воды, адсорбированной на фазе ($r=0.902$ вместо -0.209). Лучших результатов ($r=0.939$) позволяет добиться использование фактора удерживания тиомочевина в качестве параметра гидрофильности фазы.

7. На основании изученных механизмов удерживания продемонстрированы недостатки применения параметров α (*p*-толуолсульфонат/уридин) и α (уридин/5-метилуридин) из теста Танака для количественной оценки анионообменных свойств и метиленовой селективности неподвижных фаз на основе ПС-ДВБ в режиме гидрофильной хроматографии, соответственно. По корреляции фактора удерживания в условиях теста Танака с ёмкостью фаз ($r=0.961$) выявили альтернативный маркер анионообменных свойств – метансульфонат. Для установления метиленовой селективности выбрали пару бутан-/пропансульфонат.

8. На основании результатов оценки свойств неподвижных фаз и полученных закономерностей удерживания веществ выбраны начальные условия разделения водорастворимых витаминов, искусственных подсластителей, регуляторов кислотности и консервантов в безалкогольном негазированном напитке.

Список литературы

1. *Alpert A.J.* Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds // *J. Chromatogr. A.* 1990. V. 499. P. 177–196.
2. *Olsen B.A., Pack B.W.* Hydrophilic Interaction Chromatography. A guide for practitioners. John Wiley & Sons, Inc. 2013. 313 p.
3. *Wei B., Dai L., Zhang K.* Applications of hydrophilic interaction and mixed-mode liquid chromatography in pharmaceutical analysis // *J. Chromatogr. A.* 2025. V. 1739. № 465524.
4. *Sheng Q., Liu M., Lan M., Quing G.* Hydrophilic interaction liquid chromatography promotes the development of bio-separation and bio-analytical chemistry // *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2023. V. 165. № 117148.
5. *Marrubini G., Appelblad P., Maietta M.* Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review // *Food Chem.* 2018. V. 257. P. 53–66.
6. *Jandera P., Hájek T.* Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction–reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review // *J. Sep. Sci.* 2018. V. 41. № 1. P. 145–162.
7. *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.
8. *Periat A., Debrus B., Rudaz S., Guillarme D.* Screening of the most relevant parameters for method development in ultra-high performance hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1282. P. 72–83.
9. *Subirats X., Rosés M., Bosch E.* On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pKa of analytes - A review // *Sep. Purif. Rev.* 2007. V. 36. № 3. P. 231–255.
10. *Padró J.M., Acquaviva A., Tascon M., Gagliardi L.G., Castells C.B.* Effect of temperature and solvent composition on acid dissociation equilibria, I: Sequenced pssKa determination of compounds commonly used as buffers in high performance liquid chromatography coupled to mass spectroscopy detection // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 725. P. 87–94.
11. *Gagliardi L.G., Castells C.B., Rafols C., Roses M., Bosch E.* δ conversion parameter between pH scales (${}_{\text{w}}\text{pH}$ and ${}_{\text{s}}\text{pH}$) in acetonitrile/water mixtures at various compositions and temperatures // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. № 8. P. 3180–3187.
12. *Subirats X., Bosch E., Rosés M.* Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography: XV. Estimation of the pH variation of aqueous buffers with the change of the acetonitrile fraction of the mobile phase // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1059. № 1–2. P. 33–42.
13. *Espinosa S., Bosch E., Rosés M.* Acid-base constants of neutral bases in acetonitrile-water mixtures // *Anal. Chim. Acta.* 2002. V. 454. № 1. P. 157–166.
14. *Espinosa S., Bosch E., Roses M.* Retention of ionizable compounds on HPLC. 5. pH scales and the retention of acids and bases with acetonitrile-water mobile phases // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. № 21. P. 5193–5200.
15. *Rondinini S.* pH measurements in non-aqueous and aqueous – organic solvents – definition of standard procedures // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 374. P. 813–816.
16. *Беймс П.* Определение pH теория и практика. Изд. 2-е и. Л.: Изд. “Химия,” 1972. 378 с.
17. *Измайлов Н.А.* Электрохимия растворов. М.: “Химия,” 1976. 488 с.
18. *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.
19. *Iverson C.D., Gu X., Lucy C.A.* The hydrophilicity vs. ion interaction selectivity plot revisited: The effect of mobile phase pH and buffer concentration on hydrophilic interaction liquid chromatography selectivity behavior // *J. Chromatogr. A*. 2016. V. 1458. P. 82–89.
 20. *McCalley D.V.* Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2010. V. 1217. № 20. P. 3408–3417.
 21. *McCalley D.V.* A study of the analysis of acidic solutes by hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1534. P. 64–74.
 22. *Kadar E.P., Wujcik C.E., Wolford D.P., Kavetskaia O.* Rapid determination of the applicability of hydrophilic interaction chromatography utilizing ACD Labs Log D Suite: A bioanalytical application // *J. Chromatogr. B*. 2008. V. 863. № 1. P. 1–8.
 23. *Subirats X., Casanovas L., Redón L., Rosés M.* Advances in Sample Preparation Effect of the solvent on the chromatographic selectivity in reversed-phase and HILIC // *Adv. Sample Prep*. 2023. V. 6. № 100063.
 24. *McCalley D.V.* Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1171. № 1–2. P. 46–55.
 25. *Gilar M., Berthelette K.D., Walter T.H.* Contribution of ionic interactions to stationary phase selectivity in hydrophilic interaction chromatography // *J. Sep. Sci*. 2022. V. 45. № 17. P. 3264–3275.
 26. *Guo Y.* A survey of polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography and recent progress in understanding retention and selectivity // *Biomed. Chromatogr*. 2022. V. 36. № 4. P. 1–25.
 27. *Jandera P.* Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review // *Analytica Chimica Acta*. 2011. V. 692. № 1–2.
 28. *Zhou T., Lucy C.A.* Separation of carboxylates by hydrophilic interaction liquid chromatography on titania // *J. Chromatogr. A*. 2010. V. 1217. № 1. P. 82–88.
 29. *Kučera R., Kovariková P., Klivicky M., Klimes J.* The retention behaviour of polar compounds on zirconia based stationary phases under hydrophilic interaction liquid chromatography conditions // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. № 39. P. 6981–6986.
 30. *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. № 462229.
 31. *Sýkora D., Řezanka P., Záruba K., Král V.* Recent advances in mixed-mode chromatographic stationary phases // *J. Sep. Sci*. 2019. V. 42. № 1. P. 89–129.
 32. *Shen Y., Geng H., Zhang F., Li Z., Yang B.* A polyethyleneimine-functionalized polymer substrate polar stationary phase // *J. Chromatogr. A*. 2023. V. 1689. № 463711.
 33. *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. № 463934.
 34. *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. 11–16.
 35. *Buszewski B., Gadzala-Kopciuch R., Michel M.* Thermodynamic description of

- retention mechanism in liquid chromatography // *Accredit. Qual. Assur.* 2011. V. 16. № 4–5. P. 237–244.
36. *Buszewski B., Noga S.* Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. № 1. P. 231–247.
37. *Kowalska S., Krupczyńska K., Buszewski B.* The influence of the mobile phase pH and the stationary phase type on the selectivity tuning in high performance liquid chromatography nucleosides separation // *J. Sep. Sci.* 2005. V. 28. № 13. P. 1502–1511.
38. *Žuvela P., Skoczylas M., Liu J.J., Bączek T., Kaliszan R., Wong M.W., Buszewski B.* Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography // *Chem. Rev.* 2019. V. 119. № 6. P. 3674–3729.
39. *Subirats X., Abraham M.H., Rosés M.* Characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography retention by a linear free energy relationship. Comparison to reversed- and normal-phase retentions // *Anal. Chim. Acta.* 2019. V. 1092. P. 132–143.
40. *Dinh N.P., Jonsson T., Irgum K.* Water uptake on polar stationary phases under conditions for hydrophilic interaction chromatography and its relation to solute retention // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1320. P. 33–47.
41. *Wikberg E., Sparrman T., Viklund C., Jonsson T., Irgum K.* A 2H nuclear magnetic resonance study of the state of water in neat silica and zwitterionic stationary phases and its influence on the chromatographic retention characteristics in hydrophilic interaction high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 38. P. 6630–6638.
42. *McCalley D.V., Neue U.D.* Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1192. № 2. P. 225–229.
43. *Guo Y., Bhalodia N., Fattal B., Serris I.* Evaluating the adsorbed water layer on polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography (HILIC) // *Separations.* 2019. V. 6. № 2.
44. *Soukup J., Jandera P.* Adsorption of water from aqueous acetonitrile on silica-based stationary phases in aqueous normal-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1374. P. 102–111.
45. *Gritti F., Pereira A., Sandra P., Guiochon G.* Comparison of the adsorption mechanisms of pyridine in hydrophilic interaction chromatography and in reversed-phase aqueous liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 48. P. 8496–8504.
46. *Amézqueta S., Subirats X., Fuguet E., Roses M., Rafols C.* Octanol-water partition constant // *Liq. Extr.* 2019. P. 183–208.
47. *Рудаков О.Б., Рудакова Л.В.* Гидрофобно-гидрофильный баланс жидкостных хроматографических систем // *Бутлеровские сообщения.* 2011. Т. 24. № 2. С. 22–32.
48. *Chirita R.I., West C., Zubrzycki S., Finaru A., Elfakir C.* Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 35. P. 5939–5963.
49. *Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R.* Gradient elution in high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1979. V. 165. № 1. P. 3–30.
50. *Ratković D.K., Kukobat R., Kasagić-Vujanović I.* Retention mechanisms of amitriptyline and its impurities on amide, amino, diol, and silica columns in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* 2023. V. 47. № 2300949.
51. *Greco G., Grosse S., Letzel T.* Study of the retention behavior in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1235. P. 60–67.

52. *Soczewiński E.* Mechanistic molecular model of liquid-solid chromatography: Retention-eluent composition relationships // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 965. № 1–2. P. 109–116.
53. *Snyder L.R., Poppe H.* Mechanism of solute retention in liquid-solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation. Competition versus "sorption" // *J. Chromatogr.* 1980. V. 184. P. 363–413.
54. *Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D.* A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 20. P. 2871–2879.
55. *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. № 3. P. 522–527.
56. *den Uijl M.J., Schoenmakers P.J., Pirok B.W.J., van Bommel M.R.* Recent applications of retention modelling in liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* 2021. V. 44. № 1. P. 88–114.
57. *Gritti F., Höltzel A., Tallarek U., Guiochon G.* The relative importance of the adsorption and partitioning mechanisms in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1376. P. 112–125.
58. *Guo Y., Fattal B.* Relative significance of hydrophilic partitioning and surface adsorption to the retention of polar compounds in hydrophilic interaction chromatography // *Anal. Chim. Acta.* 2021. Vol. 1184. № 339025.
59. *Guo Y., Baran D., Ryan L.* Insights into the selectivity of polar stationary phases based on quantitative retention mechanism assessment in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2024. V. 1726. № 464973.
60. *Guo Y., Baran D.* Hydrophilic Partitioning or Surface Adsorption? A Quantitative Assessment of Retention Mechanisms for Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) // *Molecules.* 2023. V. 28. № 18.
61. *Pugliano A., Kuhn B., Manevski N., Wagner B., Wittwer M.B.* A novel application of hydrophilic interaction liquid chromatography for the identification of compounds with intramolecular hydrogen bonds // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2025. V. 252. № 116499.
62. *Cox G.B., Stout R.W.* Study of the retention mechanism for basic compounds on silica under "pseudo-reversed-phase" conditions // *J. Chromatogr. A.* 1987. V. 384. P. 315–336.
63. *Ibrahim M.E.A., Lucy C.A.* Mixed mode HILIC/anion exchange separations on latex coated silica monoliths // *Talanta.* 2012. V. 100. P. 313–319.
64. *Takayama N., Lim L.W., Takeuchi T.* Retention behavior of inorganic anions in hydrophilic interaction chromatography // *Anal. Sci.* 2017. V. 33. № 5. P. 619–625.
65. *Jovanović M., Stojanović B.J.* Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1301. P. 27–37.
66. *Liu M., Ostovic J., Chen E.X., Cauchon N.* Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 12. P. 2362–2370.
67. *Guo Y., Baran D., Ryan L.* Quantitative Assessment of Retention Mechanisms for Ionized Compounds in Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) // *Anal. Chem.* 2025. V. 97. №7. P. 4057–4065.
68. *Alpert A.J.* Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. № 1. P. 62–76.

69. 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. № 35. P. 5903–5919.
70. Dinh N.P., Jonsson T., Irgum K. Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. № 35. P. 5880–5891.
71. Chester T.L., Coym J.W. Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1003. № 1–2. P. 101–111.
72. Qiu H., Armstrong D.W., Berthod A. Thermodynamic studies of a zwitterionic stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2013. V. 1272. P. 81–89.
73. Soukup J., Jandera P. Retention dependence on temperature in reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography // *Biologija*. 2011. V. 57. № 2. P. 85–91.
74. Tanase M., Soare A., David V., Moldoveanu S.C. Sources of nonlinear van't Hoff temperature dependence in high-performance liquid chromatography // *ACS Omega*. 2019. V. 4. № 22. P. 19808–19817.
75. Euerby M.R., Hulse J., Petersson P., Vazhentsev A., Kassam K. Retention modelling in hydrophilic interaction chromatography // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. № 30. P. 9135–9152.
76. Guo Y., Gaiki S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1074. № 1–2. P. 71–80.
77. Logotheti M., Theochari K., Kostakis M., Pasiakos I.N., Thomaidis N.S. Development and validation of a HILIC-UV method for the determination of nucleotides in fish samples // *Food Chem.* 2018. V. 248. P. 70–77.
78. Greco G., Letzel T. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations // *J. Chromatogr. Sci.* 2013. V. 51. № 7. P. 684–693.
79. Hao Z., Xiao B., Weng N. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) // *J. Sep. Sci.* 2008. V. 31. № 9. P. 1449–1464.
80. Liu H., Jin P., Jiang M., Duan Y., Zhu G., Yu H., Qiu H. Performance evaluation of silica microspheres functionalized by different amine-ligands for hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2021. V. 1640. № 461967.
81. Boháčová I., Halko R., Jandera P. The effects of temperature and mobile phase on the retention of aliphatic carboxylic acids in hydrophilic interaction chromatography on zwitterionic stationary phases // *J. Sep. Sci.* 2016. V. 39. № 24. P. 4732–4739.
82. Guo Y., Gaiki S. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. № 35. P. 5920–5938.
83. Jandera P., Hájek T. A new definition of the stationary phase volume in mixed-mode chromatographic columns in hydrophilic liquid chromatography // *Molecules*. 2021. V. 26. № 4819.
84. McCalley D.V. Practical examination of flow rate effects and influence of the stationary phase water layer on peak shape and retention in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2024. V. 1715. № 464608.
85. Zhang M., Yang B., Dasgupta P.K. Polymethylmethacrylate open tubular ion exchange columns: Nondestructive measurement of very small ion exchange capacities // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 16. P. 7994–8000.

86. *Connolly D., Paull B.* High-performance separation of small inorganic anions on a methacrylate-based polymer monolith grafted with [2(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride // *J. Sep. Sci.* 2009. V. 32. № 15–16. P. 2653–2658.
87. *Kazarian A.A., Taylor M.R., Haddad P.R., Nesterenko P.N., Paull B.* Ion-exchange and hydrophobic interactions affecting selectivity for neutral and charged solutes on three structurally similar agglomerated ion-exchange and mixed-mode stationary phases // *Anal. Chim. Acta.* 2013. V. 803. P. 143–153.
88. *Pohl C., Saini C.* New developments in the preparation of anion exchange media based on hyperbranched condensation polymers // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1213. № 1. P. 37–44.
89. *Nesterenko P.N., Elefterov A.I., Tarasenko D.A., Shpigun O.A.* Selectivity of chemically bonded zwitterion-exchange stationary phases in ion chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1995. V. 706. № 1–2. P. 59–68.
90. *Kadlecová Z., Kalíková K., Folprechtová D., Tesarová E., Gilar M.* Method for evaluation of ionic interactions in liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2020. V. 1625. № 461301.
91. *Hatambeygi N., Abedi G., Talebi M.* Method development and validation for optimised separation of salicylic, acetyl salicylic and ascorbic acid in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography and response surface methodology // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 35. P. 5995–6003.
92. *Cheng X.D., Zhang Z., Dai X., Li Y.* Retention behavior of nucleosides and nucleobases on a 3 μm undecylenic acid-functionalized silica column in per aqueous liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography separation modes // *J. Chromatogr. A.* 2024. V. 1721. № 464833.
93. *Alpert A.J.* Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2018. V. 1538. P. 45–53.
94. *Craven C.B., Joyce C.W., Lucy C.A.* Effect of nature of electrolytes on retention and selectivity in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2019. V. 1584. P. 80–86.
95. *McCalley D.V.* Effect of mobile phase additives on solute retention at low aqueous pH in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1483. P. 71–79.
96. *Lämmerhofer M., Richter M., Wu J., Nogueira J., Bicker W., Lindner W.* Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes // *J. Sep. Sci.* 2008. V. 31. P. 2572–2588.
97. *Burgos-Gil R., Peris-García E., Ruiz-Angel M.J., Baeza-Baeza J.J., García-Alvarez-Coque M.C.* Protocol to compare column performance applied to hydrophilic interaction liquid chromatography // *Microchem. J.* 2019. V. 149. № 103973.
98. *Marrubini G., Pedrali A., Hemstrom 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 // *J. Sep. Sci.* 2013. V. 36. № 21–22. P. 3493–3502.
99. *Liang T., Fu Q., Shen A., Wang H. Jin Y., Xin H., Ke Y., Guo Z., Liang X.* Preparation and chromatographic evaluation of a newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1388. P. 110–118.
100. *Ferri M., Bäurer S., Carotti A., Wolter M., Alshaar B., Theiner J., Ikegami T., West*

- C., *Lämmerhofer M.* Fragment-based design of zwitterionic, strong cation- and weak anion-exchange type mixed-mode liquid chromatography ligands and their chromatographic exploration // *J. Chromatogr. A.* 2020. V. 1621. P. 17–19.
101. *Lesellier E., West C.* Description and comparison of chromatographic tests and chemometric methods for packed column classification // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1158. № 1–2. P. 329–360.
102. *Eksteen R.* Chromatographic Characterization of Silica C Packing Materials . Correlation between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase // *J. Chromatogr. Sci.* 1989. V. 27. P. 721–728.
103. *Dolci M.* Chromatographic Characterization of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography // *Tech. Note.* 2013. № 20741.
104. *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. № 461850.
105. *Buszewski B., Skoczylas M.* Multi-parametric characterization of amino acid- and peptide-silica stationary phases // *Chromatographia.* 2019. V. 82. № 1. P. 153–166.
106. *Gorbovskaia A.V., Kvachenok I.K., Stavrianidi A.N., Chernobrovkina A.V., Uzhel A.S., Shpigun O.A.* Polyelectrolyte-grafted mixed-mode stationary phases based on poly(styrene–divinylbenzene) // *Microchem. J.* 2024. V. 199. № 110075.
107. *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.
108. *Gargano A.F.G., Leek T., Lindner W., Lämmerhofer M.* Mixed-mode chromatography with zwitterionic phosphopeptidomimetic selectors from Ugi multicomponent reaction // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1317. P. 12–21.
109. *Noga S., Bocian S., Buszewski B.* Hydrophilic interaction liquid chromatography columns classification by effect of solvation and chemometric methods // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1278. P. 89–97.
110. *Van Dorpe S., Vergote V., Pezeshki A., Burvenich C., Peremans K., De Spiegeleer B.* Hydrophilic interaction LC of peptides: Columns comparison and clustering // *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33. № 6–7. P. 728–739.
111. *Hemida M., Barrientos R.C., Singh A.N., Luca G., Wang H., Guillarme D., Larson E., Xu W., Appiah-amponsah E., Regalado L.* Automated multicolumn screening workflow in ultra-high pressure hydrophilic interaction chromatography for streamlined method development of polar analytes. 2024. V. 1733. № 465266.
112. *Arase S., Kimura S., Ikegami T.* Method optimization of hydrophilic interaction chromatography separation of nucleotides using design of experiment approaches I: Comparison of several zwitterionic columns // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. V. 158. P. 307–316.
113. *Attimarad M., Venugopala K.N., Chohan M.S., David M., Ii E., Molina P., Sreeharsha N., Nair A.B., Tratrak C., Altaysan A.I., Balgoname A.A.* An Experimental Design Approach to Quantitative Expression for Quality Control of a Multicomponent Antidiabetic Formulation by the HILIC Method // *Molecules.* 2022. V. 27. № 3135.
114. *Guo Y., Srinivasan S., Gaiki S.* Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment // *Chromatographia.* 2007. V. 66. № 3–4. P. 223–229.
115. *Chirita R.I., West C., Finaru A.L., Elfakir C.* Approach to hydrophilic interaction

- chromatography column selection: Application to neurotransmitters analysis // *J. Chromatogr. A*. 2010. V. 1217. № 18. P. 3091–3104.
116. *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. 245-255.
117. *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. 592–604.
118. *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. 637-647.
119. *Чикурова Н. Ю.* Новые высокоэффективные неподвижные фазы с амидными группами и макромолекулами в функциональном слое для гидрофильной хроматографии, Дисс. ... канд. хим. наук. 2023.
120. *Gorbovskaia A.V., Kvachenok I.K., Chikurova N.Y., Chernobrovkina A. V., Uzhel A.S., Shpigun O.A.* Influence of hydrophilicity and shielding degree on the chromatographic properties of polyelectrolyte-grafted mixed-mode stationary phases // *Microchem. J.* 2024. V. 207. № 111802.
121. *Горбовская А.В., Попкова Е.К., Ужель А.С., Шпигун О.А., Затиреха А.В.* Сорбенты на основе полистирол-дивинилбензола с привитым гидрофилизованным полиэтиленимином для ионной и гидрофильной хроматографии // *Журн. аналит. химии*. 2023. Т. 78. №6. С. 507-519.
122. *Uzhel A.S., Gorbovskaia A.V., Talipova I.I., Chernobrovkina A.V., Pirogov A.V.* Polymer-based mixed-mode stationary phases with grafted polyelectrolytes containing iminodiacetic acid functionalities // *J. Chromatogr. A*. 2025. V. 1756. № 466062.
123. *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. 832-843.
124. *Harris C.R., Millman K.J., Walt S.J. Van Der, Gommers R., Virtanen P., Cournapeau D., Wieser E., Taylor J., Berg S., Smith N.J., Kern R., Picus M., Hoyer S., Kerkwijk M.H.* Array programming with NumPy // *Nature*. 2020. V. 585. P. 357–362.
125. *Virtanen P., Gommers R., Oliphant T.E., Haberland M., Reddy T., Walt S.J. Van Der, Brett M., Wilson J., Millman K.J.* SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python // *Nature Methods* 2020. V. 17. P. 261-272.
126. *Mckinney W.* Data Structures for Statistical Computing in Python // *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*. 2010. V. 1. P. 56–61.
127. *Pedregosa F., Weiss R., Brucher M.* Scikit-learn : Machine Learning in Python // *J. Machine Learning Research*. 2011. V. 12. P. 2825–2830.
128. *Hunter J.D.* Matplotlib: A 2D Graphics Environment // *Comput. Sci. & Eng.* 2007. V. 9. № 03. P. 90–95.
129. *Waskom M.L.* Seaborn : statistical data visualization // *J. of Open Source Software*. 2021. V. 6. P. 1–4.
130. *Maesschalck R. De, Massart D.L.* The Mahalanobis distance // *Chemometrics and*

Intelligent Laboratory Systems. 2000. P. 1-18.

131. *Brereton R.G.* The Mahalanobis distance and its relationship to principal component scores // *J. Chemom.* 2015. V. 2015. P. 143–145.

132. *Mercex A.* Using Generalized Distances in Classification of Groups // *Biom. J.* 1991. V. 83. P. 683–695.

133. *Heaton J.C., Russell J.J., Underwood T., Boughtflower R., McCalley D.V.* Comparison of peak shape in hydrophilic interaction chromatography using acidic salt buffers and simple acid solutions // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1347. P. 39–48.

134. *Santali E.Y., Edwards D., Sutcliffe O.B., Bailes S., Euerby M.R., Watson D.G.* A comparison of silica C and silica gel in HILIC mode: The effect of stationary phase surface area // *Chromatographia.* 2014. V. 77. № 13–14. P. 873–881.

135. *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. № 3. P. 419–425.

136. *Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D.* Study of the behavior of water-soluble vitamins in HILIC on a diol column // *Chromatographia.* 2010. V. 71. № 9–10. P. 751–759.

137. *Fritz J.S., DuVal D.L., Barron R.E.* Organic Acid Eluents for Single-Column Ion Chromatography // *Anal. Chem.* 1984. V. 56. № 7. P. 1177–1182.

138. *Nawrocki J.* The silanol group and its role in liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1997. V. 779. № 1–2. P. 29–71.

139. *Bocian S., Buszewski B.* Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC - A contribution for a better understanding // *J. Sep. Sci.* 2012. V. 35. № 10–11. P. 1191–1200.

140. *Okada T.* Nonaqueous anion-exchange chromatography. I. Role of solvation in anion-exchange resin // *J. Chromatogr. A.* 1997. V. 758. № 1. P. 19–28.

141. *Baptista D.S., Piedade M.F.M., Esteves C.V.* Solubility and crystallization studies of picolinic acid // *Crystals.* 2023. V. 13. № 392.

142. *M.G. Brazhnikova, N.N. Lomakina, T.F. Berdnikova, G.B. Fedorova, N.L. Tokareva, V.N. Borisova.* Eremomycin contains the triphenoxy fragment with two residues of serine instead of alanine found // *J. Antibiotics.* 1989. V. 42. P. 1790-1799.

143. *Reshetova E.* Chromatographic retention and thermodynamics of the adsorption of α -phenylcarboxylic acid enantiomers on a chiral stationary phase with a grafted antibiotic eremomycin: Effect of eluent pH // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2016. V. 39. № 3. P. 145–153.

144. *Gao W., Liu X., Wang Y., Liang C., Lian H., Qiao J.* Insight into the hydrophilic interaction liquid chromatographic retention behaviors of hydrophilic compounds on different stationary phases // *Talanta.* 2020. V. 219. № 121363.

145. *Лусичкин Г.В., Фадеев А.Ю., Сердан А.А., Нестеренко П.Н., Мингалев П.Г., Фурман Д.Б.* Химия привитых поверхностных соединений. М.: Физматлит, 2003.

146. *Chikurova N.Y., 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. № 462804.

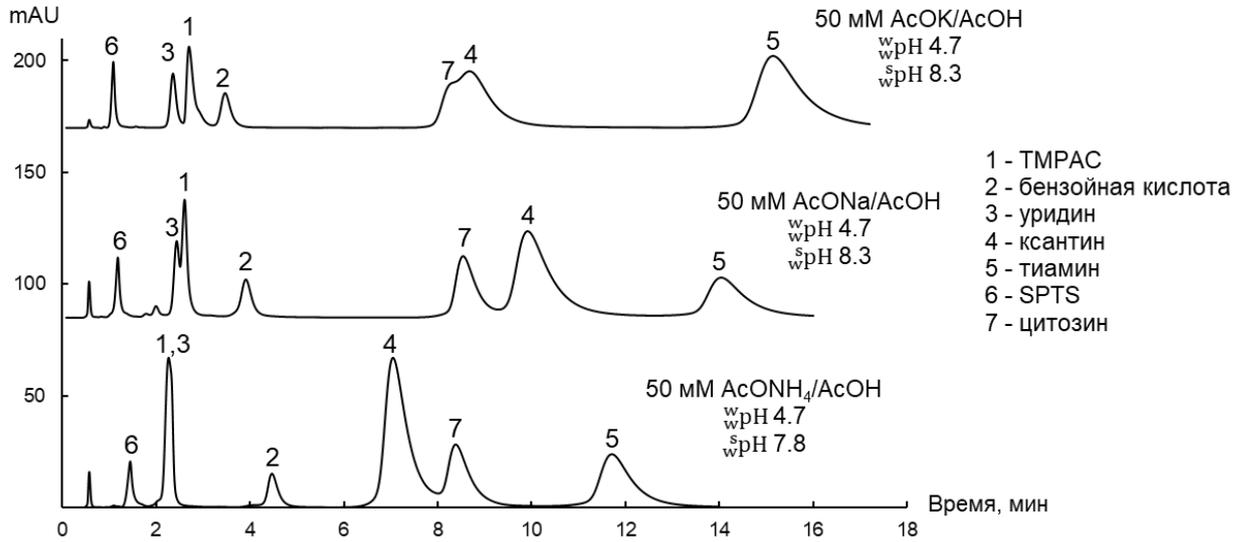
147. *Sýkora D., Záruba K., Butnariu M., Tatar A., Pham H.M., Studenovský M., Řezanka P., Král V.* New multimodal stationary phases prepared by Ugi multicomponent approach // *J. Sep. Sci.* 2020. V. 43. № 22. P. 4178–4190.

148. *Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D.* HILIC separation and quantitation

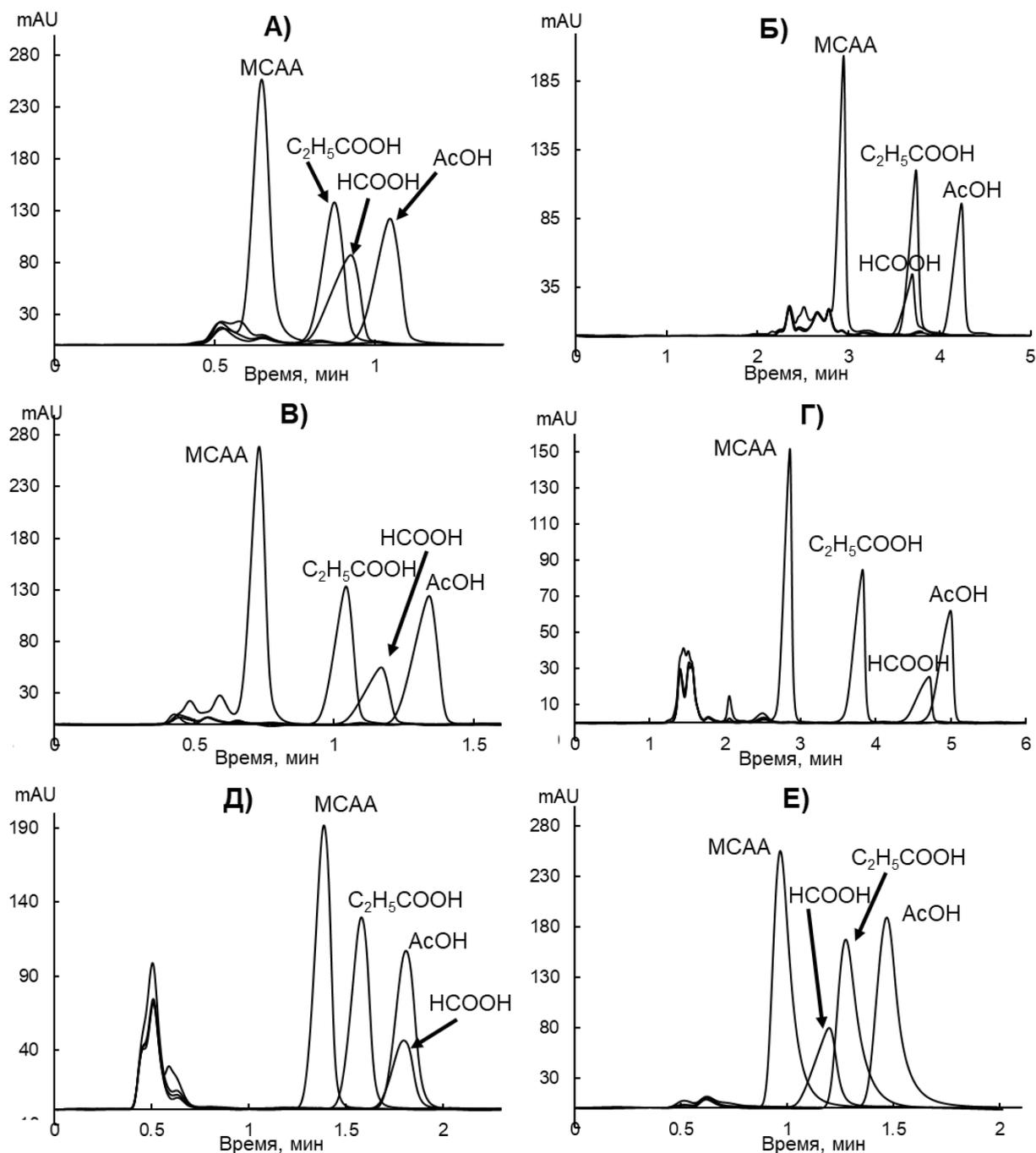
- of water-soluble vitamins using diol column // *J. Sep. Sci.* 2009. V. 32. № 7. P. 909–917.
149. *Sarvin N., Puzankov R., Vasiyarov G., Nesterenko P.N., Staroverov S.M.* Silica Immobilised chloro- and amido-derivatives of eremomycine as chiral stationary phases for the enantioseparation of amino acids by reversed-phase liquid chromatography // *Molecules*. 2023. V. 28. № 85.
150. *Pous-Torres S., Torres-Lapasió J.R., García-Álvarez-Coque M.C.* Performance of markers and the homologous series method for dead time estimation in reversed-phase liquid chromatography // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2009. V. 32, № 8. P. 1065–1083.
151. *Горбовская А.В.* Новые многофункциональные сорбенты с привитыми полимерными слоями для жидкостной хроматографии, Дисс. ... канд. хим. наук. 2023.
152. *Weiss J.* «Handbook of ion chromatography». 4 ed. Weinheim. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2016. 1576 p.
153. *Volkov A.G., Paula S., Deamer D.W.* Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers // *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 1997. V. 42. № 2. P. 153–160.
154. *Osakai T., Ogata A., Ebina K.* Hydration of ions in organic solvent and its significance in the Gibbs energy of ion transfer between two immiscible liquids // *J. Phys. Chem. B.* 1997. V. 101. № 41. P. 8341–8348.
155. *Liu X., Pohl C.A.* HILIC behavior of a reversed-phase/cationexchange/ anion-exchange trimode column // *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33. № 6–7. P. 779–786.
156. *Mingalyov P.G., Fadeev A.Y., Staroverov S.M., Lisichkin G.V., Lunina E.V.* Nitroxide radicals in studies of the fine bonded layer structure of modified silicas // *J. Chromatogr. A.* 1993. V. 646. № 2. P. 267–277.
157. *Nesterenko P.N., Nesterenko E.P.* Hydrophobicity of polymer based anion-exchange columns for ion chromatography // *Heliyon*. 2021. V. 7. № 6. № e07290.

Приложения

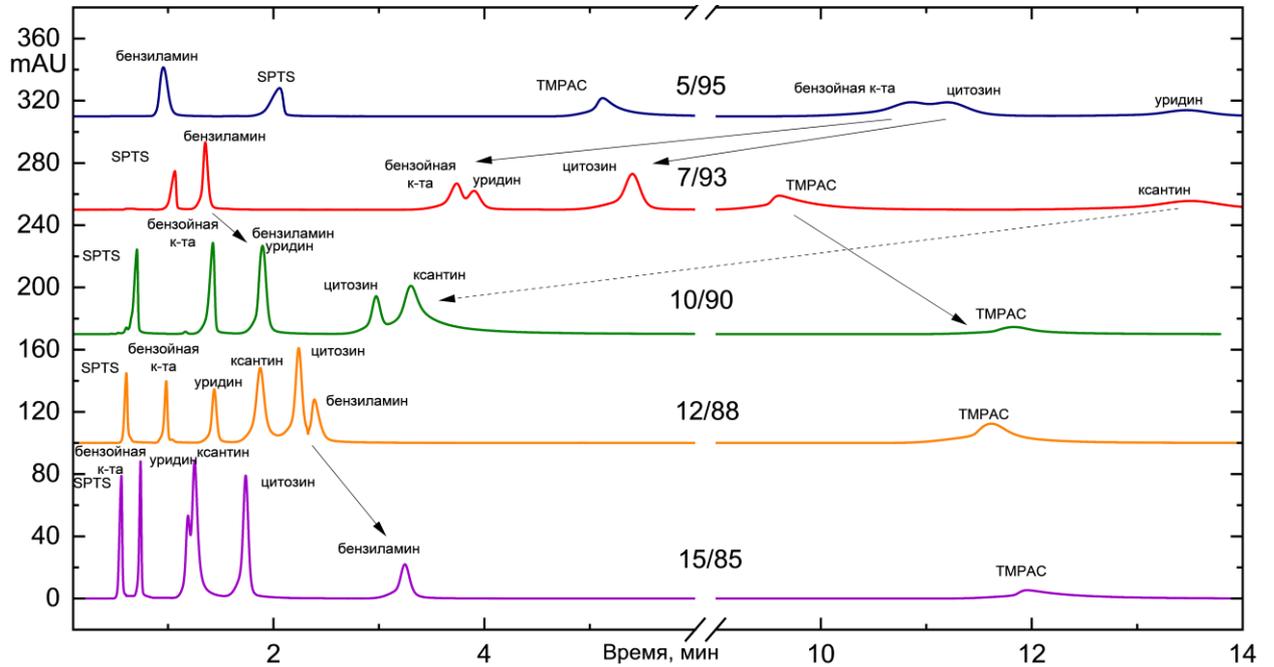
Приложение 1. Влияние катиона буферного раствора (NH_4^+ , Na^+ , K^+) на селективность разделения на неподвижной фазе C2 (50×3 мм). 50 мМ $\text{AcONH}_4/\text{AcOH}$, или AcONa/AcOH , или AcOK/AcOH $w_{\text{pH}} 4.7 / s_{\text{pH}} 8.3$ / CH_3CN 10/90 об.%; скорость потока 0.5 мл/мин, УФ детектирование при 254 нм.



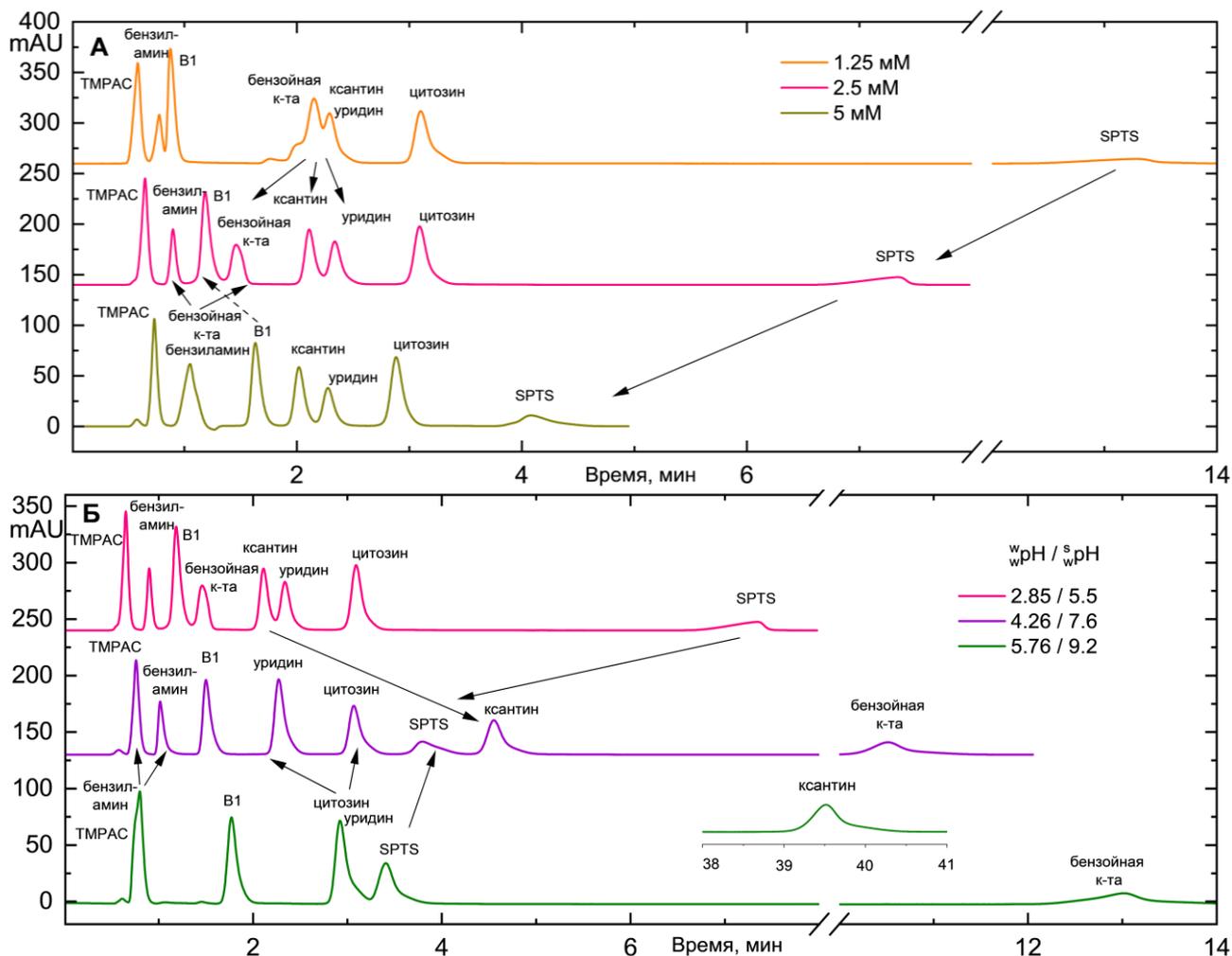
Приложение 2. Хроматограммы карбоновых кислот (100 мг/л) на А) силикагеле С1 (размер колонки 100×3 мм), Б) диоле С3 (250×4.6 мм), В) аминопропилсиликагеле С4 (100×3 мм), Г) полиамине С5 (150×4.6 мм), Д) цвиттер-ионном С6 (100×3 мм), Е) силикагеле, модифицированном эремомицином, С2 (50×3 мм). Условия: 10 мМ калий фосфатный буферный раствор w/pH 7.0 / ацетонитрил 20/80 об.% (s/pH 9.0), скорость потока 1 мл/мин, кроме фазы С2 – 0.5 мл/мин, УФ детектирование при 200 нм.



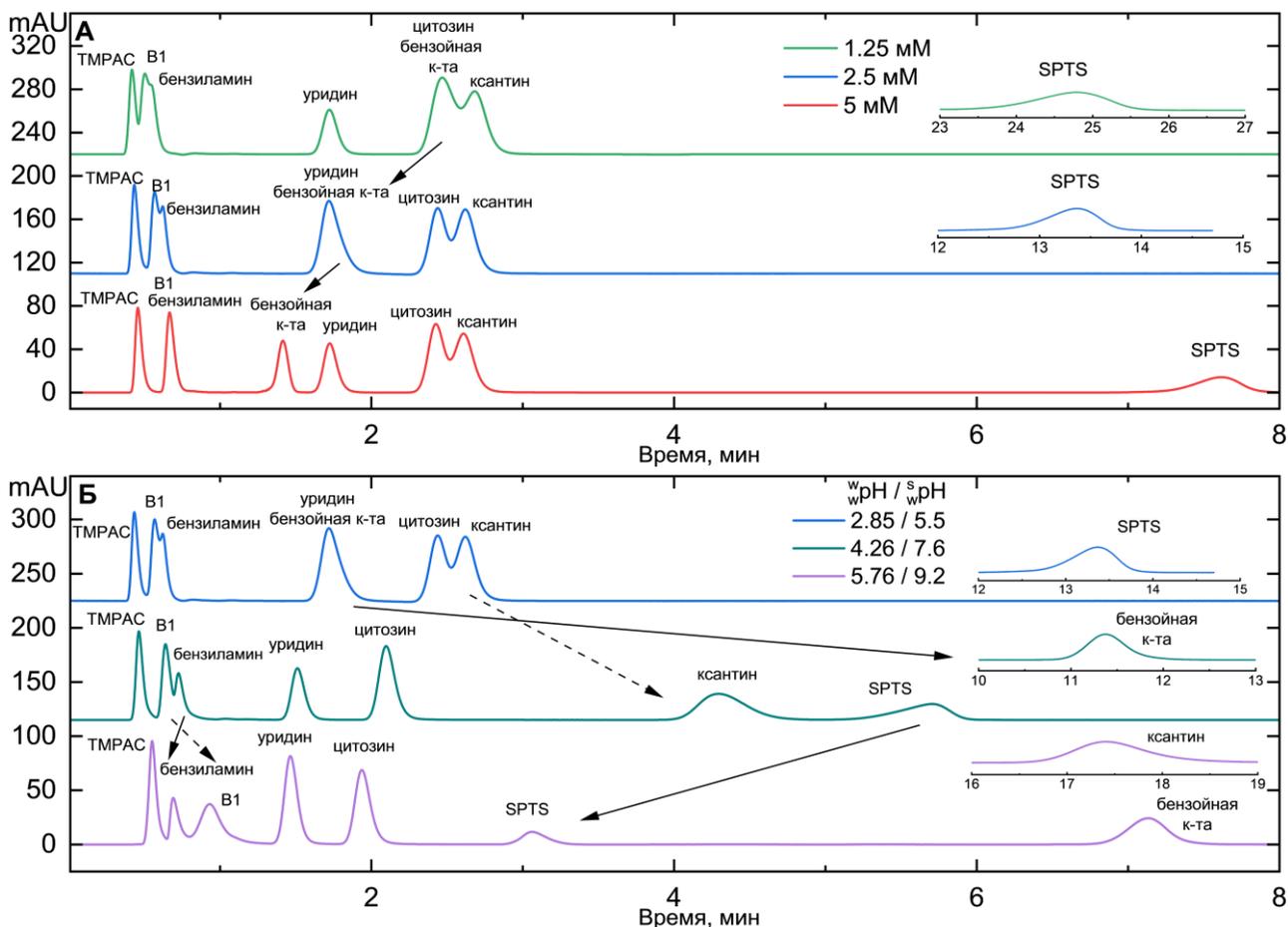
Приложение 3. Хроматограммы модельной смеси, полученные на силикагеле (размер колонки 100×3 мм) при разном соотношении вода/ацетонитрил. Условия: AcONa/AcOH w/pH 5.76 / ацетонитрил; концентрация Na^+ в элюенте – 2.5 мМ; скорость потока 1 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.



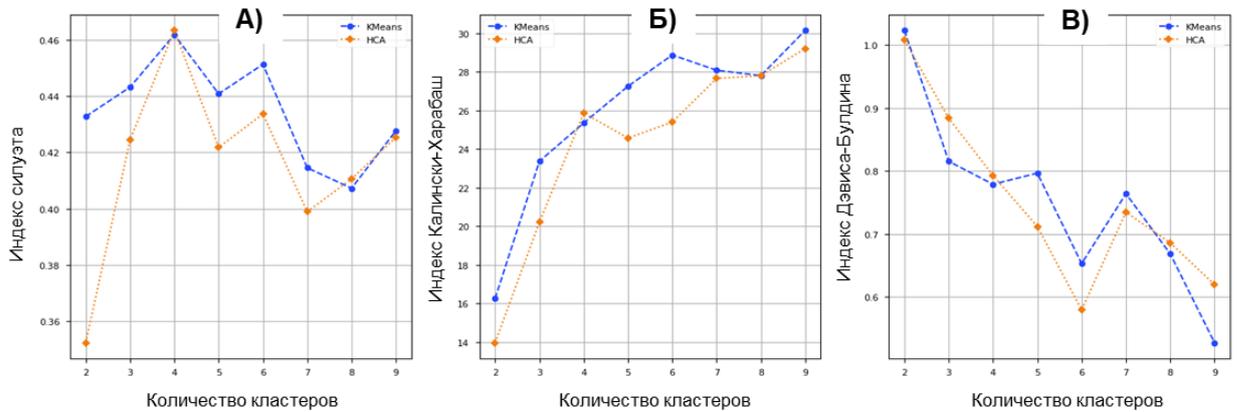
Приложение 4. Хроматограммы модельной смеси соединений, полученные на аминопропилсиликагеле С4 (размер колонки 100×3 мм): А) при разных концентрациях элюирующего иона в подвижной фазе при $w\text{pH}$ 2.85; Б) при разных $w\text{pH}$ от 2.85 до 5.76 ($s\text{pH}$ 5.5-9.2) при концентрации элюирующего иона 2.5 мМ. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%, буферный раствор: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w\text{pH}$ 2.85, AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 4.26, AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 5.76; скорость потока 1 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.



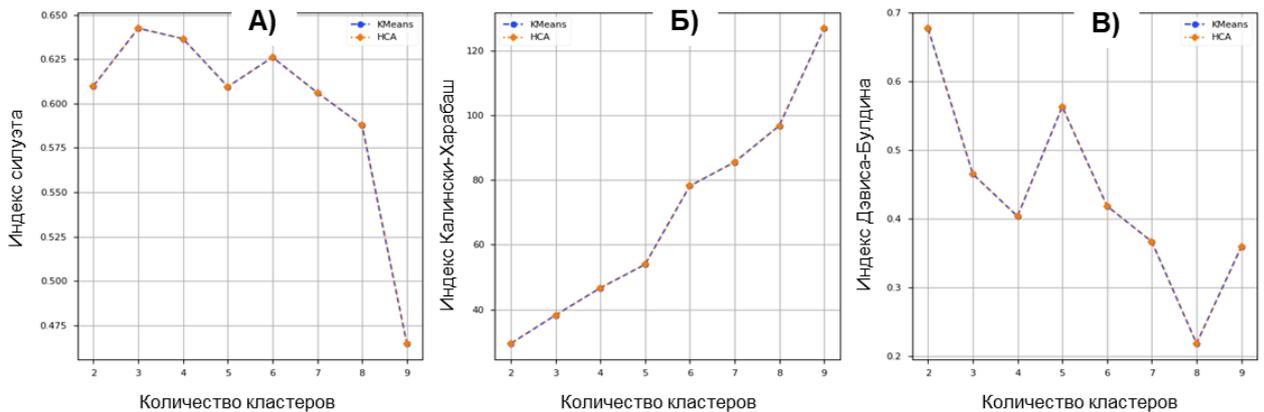
Приложение 5. Хроматограммы модельной смеси соединений, полученные на гиперразветвлённом цвиттер-ионном сорбенте С6 (размер колонки 100×3 мм): А) при разных концентрациях элюирующего иона в подвижной фазе при $w\text{pH}$ 2.85; Б) при разных $w\text{pH}$ от 2.85 до 5.76 ($s\text{pH}$ 5.5-9.2) при концентрации элюирующего иона 2.5 мМ. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%, буферный раствор: $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$ $w\text{pH}$ 2.85, AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 4.26, AcONa/AcOH $w\text{pH}$ 5.76; скорость потока 1 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.



Приложение 6. Оценка количества кластеров для данных теста Танака (ГК 1-4) с помощью разных метрик А) индекса силуэта (чем выше, тем лучше), Б) индекса Калински-Харабаш (чем выше, тем лучше), В) индекса Дэвиса-Булдина (чем ниже, тем лучше).



Приложение 7. Оценка количества кластеров для логарифмов селективностей биологически активных веществ (ГК 1-3) с помощью разных метрик А) индекса силуэта (чем выше, тем лучше), Б) индекса Калински-Харабаш (чем выше, тем лучше), В) индекса Дэвиса-Булдина (чем ниже, тем лучше).



Приложение 8. Хроматограммы сульфонов на аминированных силикагеле (колонка С9) и полистирол-дивинилбензоле (колонка П2). Условия: 150 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор w/pH 4.7 / ацетонитрил 10/90 об.%, скорость потока 1 мл/мин для С9 (размер колонки 100×3 мм) и 1.8 мл/мин для П2 (размер колонки 100×4 мм), детектирование по светорассеянию.

