

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

Хрисанфова Анна Олеговна

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

Специальность 1.4.2. Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:** **Чернобровкина Алла Валерьевна**

*кандидат химических наук*

**Официальные оппоненты:** **Рудаков Олег Борисович**

*доктор химических наук, профессор*

*Воронежский государственный технический университет,  
кафедра химии и химической технологии материалов,  
заведующий кафедрой*

**Курганов Александр Александрович**

*доктор химических наук*

*Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева  
РАН, лаборатория спектральных исследований, главный  
научный сотрудник*

**Зайцева Елена Александровна**

*кандидат химических наук*

*Институт геохимии и аналитической химии  
им. В.И. Вернадского РАН, лаборатория сорбционных  
методов, старший научный сотрудник, ученый секретарь  
по направлению «аналитическая химия»*

Защита диссертации состоится «8» апреля 2026 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр.3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

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

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

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3793>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Ананьева И.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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  ${}^s_pK_a(\text{НА}, \text{ВН}^+)$  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 ( ${}^w_p\text{рН}$  и  ${}^s_p\text{рН}$ ) проявления анионообменных, цвиттер-ионных и катионообменных свойств для силикагеля с привитым эремомицином Диасфер-110-Еге (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'-дезоксисуридин, 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'-дезоксигуанидин, 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.

**Используемые сокращения.** ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГИХ – гидрофильная хроматография; ИХ – ионная хроматография; ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ПС-ДВБ – полистирол-дивинилбензол; УФ – спектрофотометрический детектор УФ-диапазона; МСАА – монохлоруксусная кислота; SPTS – п-толуолсульфонат натрия; ТМРАС – триметилфениламмоний хлорид; ВВТМАС – 4-винилбензилтриметиламмоний хлорид;  $^w\text{pH}$  ( $^w\text{pK}_a$ ) – pH (pKa) в водной среде,  $^s\text{pH}$  ( $^s\text{pK}_a$ ) – pH (pKa) в водно-органической среде.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

### Обзор литературы

В **главе 1** представлен обзор литературы, посвященный особенностям удерживания веществ в режиме гидрофильной хроматографии. В первом разделе рассмотрено влияние органического растворителя подвижной фазы на константы диссоциации аналитов и pH буферных растворов. Во втором разделе отражено многообразие полярных неподвижных фаз. В третьем разделе рассмотрены теоретические аспекты удерживания в гидрофильной хроматографии, приведены основные математические модели, описывающие связь состава элюента и фактора удерживания вещества, а также термодинамические параметры

удерживания. В четвёртом разделе систематизированы способы описания свойств неподвижных фаз в условиях ГИХ, а также варианты их представления. Отмечены недостатки каждого способа, намечены пути их устранения для более правильного изучения закономерностей удерживания веществ и сравнения селективности неподвижных фаз. Пятый раздел посвящен существующим рекомендациям для выбора условий разделения в ГИХ. Сделан вывод о том, что недостаточное описание свойств неподвижных фаз и механизмов удерживания веществ в гидрофильной хроматографии, а также ограниченная информация о константах диссоциации в водно-органической среде существенно затрудняет поиск условий для разделения компонентов реальных объектов, что подтверждает актуальность выбранной темы исследования.

### Экспериментальная часть

**Глава 2** содержит описание используемого оборудования, реактивов, неподвижных и подвижных фаз, тестовых веществ, подходов к измерению водно-органических констант диссоциации, анионообменной ёмкости колонок и подходов к обработке многомерных данных. Для проведения экспериментов использовали ВЭЖХ системы с различными типами детектирования: диодно-матричным Vanquish Flex и Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), испарительным детектором по светорассеянию Shimadzu Prominence (Shimadzu, Япония), рефрактометрическим Agilent (Agilent Technologies, США) и кондуктометрическим Dionex ICS-1600 (Thermo Fisher Scientific, США). Измерение  $pH$  ( ${}^w pH$  и  ${}^s pH$ ) проводили при помощи  $pH$ -метра « $pH$ -420» («Аквилон», Россия), калиброванного по водным стандартным растворам с  $pH$  4.01, 6.86, 9.18.

Систематизирована информация об экспериментальных (база данных  $pK_a$  IUPAC и KOWWIN v1.69) и рассчитанных свойствах  ${}^w pK_a$ ,  $\log P$ ,  $\log D$  (ACD/Labs 12.01, Канада) 38 тестовых соединений. Описана процедура приготовления буферных растворов на основе карбоновых кислот с различными  ${}^w pH$  (табл. 1) с концентрациями, соответствующими концентрациям элюирующего иона в подвижной фазе из диапазона 1.25-7.5 мМ, рассчитана буферная ёмкость подвижной фазы (0.3-10.5 мМ).

Таблица 1. Буферные растворы типа  $HA/NaA$ , используемые в работе, их  ${}^s pH$  и  ${}^s pK_a(HA)$ , измеренные в присутствии 85, 90 и 95 об.% ацетонитрила

Буферный раствор	${}^w pH$	${}^s pH$ (85 об.% $CH_3CN$ )	${}^s pH$ (90 об.% $CH_3CN$ )	${}^s pH$ (95 об.% $CH_3CN$ )
МСAA/МСANa	2.85 ( ${}^w pK_a$ )	5.2 ( ${}^s pK_a$ )	5.6 ( ${}^s pK_a$ )	–
НСООН/НСOONa	2.85	5.1	5.6	6.4
	3.75 ( ${}^w pK_a$ )	6.1 ( ${}^s pK_a$ )	6.6 ( ${}^s pK_a$ )	–
АсОН/АсONa	3.76	6.5	7.1	–
	4.76 ( ${}^w pK_a$ )	7.7 ( ${}^s pK_a$ )	8.3 ( ${}^s pK_a$ )	–
	5.76	8.7	9.3	10.0
$C_2H_5COOH/C_2H_5COONa$	4.88 ( ${}^w pK_a$ )	8 ( ${}^s pK_a$ )	8.7 ( ${}^s pK_a$ )	–

В работе сравнивали свойства 46 неподвижных фаз, промышленно выпускаемых и разработанных в лаборатории хроматографии МГУ. Функциональный слой неподвижных фаз на основе силикагеля («С») и полистирол-дивинилбензола («П») приведен в табл. 2. Также сравнивали свойства 27 неподвижных фаз («С-У» и «С-пУ»), полученных по реакции Уги из 3-аминопропилсиликагеля (C4\_1). Все фазы «П» имели размер частиц  $5.5 \pm 0.5$  мкм,

размер пор 4 нм, размер колонки 100×4 мм. Фазы на основе силикагеля имели размер частиц и пор 5 мкм и 11-12 нм, соответственно, кроме С3 – 6 мкм и 30 нм. Для определения мёртвого времени на фазах на основе силикагеля использовали время удерживания толуола, на ПС-ДВБ – возмущение базовой линии при введении воды.

Таблица 2. Функциональный слой неподвижных фаз на основе силикагеля («С») и полистирол-дивинилбензола («П»), используемых в работе

Коммерческое название/ название в других работах	Обозначение	Функциональный слой
Kromasil 100-5-SIL (Kromasil)*	С1	немодифицированный силикагель
Диасфер-110-Еге (АО «БиоХимМак СТ»)*	С2	эремомицин (амино и карбоксильные группы)
Диасфер-300-диол (АО «БиоХимМак СТ»)*	С3	диол
Диасфер-110-амин (АО «БиоХимМак СТ»)*	С4, другие партии: С4_1, С4_2, С4_3	3-аминопропилсиликагель С4 (2.10% N)**, С4_1 (1.70% N), С4_2 (1.67% N), С4_3(1.52% N)
УМС-Рак Polyamine II (УМС)	С5	полиамин
Т-Б-ИД	С6	гиперразветвлённый слой из диэпоксида***, таурин и иминодиуксусная кислоты, остаточные аминопропильные группы
С <sub>А</sub> -Б	С7	разветвлённый слой из диэпоксида***, остаточные аминопропильные группы
С <sub>А</sub> -Б-Э	С8	разветвлённый слой из диэпоксида***, эремомицин, остаточные аминопропильные группы
С-М	С9	продукт реакции Уги, содержит амидные и остаточные аминопропильные группы
ПАМ 1:0.1	С10	продукт реакции Уги, содержит амидные группы, сополимер акриловой кислоты и амида, остаточные аминопропильные группы
ВРЕI-DMA ****	П1	привитой полиэтиленимин и полиэлектролиты, полученные из диэпоксида*** и диметиламина
ВРЕI-GI 80°C ****	П2	привитой полиэтиленимин, кватернизованный глицидолом
Р-DMA x10 ****	П3	привитые полиэлектролиты, полученные из диэпоксида*** и диметиламина
Р-МЕА ****	П4	привитые полиэлектролиты, полученные из диэпоксида*** и N-метилэтанолamina
Е-MG-DMA-A*****	П5	привитые полиэлектролиты двух типов: первый получен из диэпоксида*** и N-метилглицина, второй – из диэпоксида*** и диметиламина
Е-MG-DMA-B*****	П6	

\* сорбенты предоставлены Староверовым С.М.; \*\* указано содержание азота по результатам элементного анализа; \*\*\* диэпоксид – 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир; \*\*\*\* матрица ПС-ДВБ после ацилирования и восстановительного аминирования метиламином; \*\*\*\*\* матрица ПС-ДВБ после эпоксидирования.

Приведены подходы к оценке  $s_pK_a$ , основанные на измерении  $s_pH$  в смеси, приготовленной из водного раствора, содержащего эквимолярную смесь кислоты и сопряженного основания, и ацетонитрила в нужном соотношении, а также из зависимостей факторов удерживания веществ от  $s_pH$  подвижной фазы. Описаны традиционный и предлагаемые в работе способы установления анионообменной ёмкости колонок (табл. 3).

Таблица 3. 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	деионизованная вода	10 мМ NaNO <sub>3</sub> в деионизованной воде	ИХ* Cl <sup>-</sup>
‘В/А’	10 мМ NaNO <sub>3</sub> в H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN 10/90 об.%	H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN 10/90 об.%	20 мМ NaCl в H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN 10/90 об.%	ГИХ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
‘В/А-В’	20 мМ NaCl в H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN 10/90 об.%	градиентная перемывка колонки от H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN 10/90 об.% до 100% H <sub>2</sub> O	10 мМ NaNO <sub>3</sub> в деионизованной воде	ИХ Cl <sup>-</sup>

\* ИХ – ионная хроматография

Представлено описание методов обработки многомерных данных (метод главных компонент, методы кластерного анализа). Приведены основные формулы, алгоритмы расчёта метрик для оценки количества кластеров и индекса Рэнда, используемого для сравнения двух вариантов кластеризации. Для изучения механизмов удерживания тестовых веществ использовали известные модели, приведенные в табл. 4.

Таблица 4. Модели, используемые в работе, для описания механизмов удерживания

Модель	Уравнение	Параметры*
Ионообменный механизм	$k' = \frac{a}{[M]} + k'(\text{неионные в/д})$	[M] – концентрация элюирующего иона в ПФ; a – коэффициент, связанный с константой ионного обмена и числом заряженных центров НФ
	$\lg k' = s \cdot \lg[M] + \text{const}$	s – угловой коэффициент, отражающий вклад ионного обмена
Распределение	$\lg k' = -S \cdot \varphi_{H_2O} + \text{const}$	$\varphi_{H_2O}$ – объемная доля воды в ПФ
Адсорбция	$\lg k' = -n \cdot \lg X_{H_2O} + \text{const}$	$X_{H_2O}$ – мольная доля воды в ПФ
Модель Гуо (для расчёта вклада распределения и адсорбции для нейтральных веществ)	$k' = D \cdot \frac{V_w}{V_M} + k'(\text{адс.});$ $\frac{V_w}{V_M} = \frac{V_R(\text{толуол}) \text{ в чист } CH_3CN}{V_R(\text{толуол}) \text{ в ПФ}} - 1$	D – коэффициент распределения; $\frac{V_w}{V_M}$ – соотношение фаз; адсорбированного объёма воды и мёртвого объёма колонки.
Уравнение Вант-Гоффа	$\ln k' = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \frac{V_s}{V_M}$	$\Delta H^0$ , $\Delta S^0$ – энтальпия и энтропия переноса вещества из ПФ в НФ.
Связь фактора удерживания с pH подвижной фазы	$k' = \frac{k'_{(HX)} + k'_{(X)} \cdot 10^{(pH-pK_a)}}{1 + 10^{(pH-pK_a)}}$	$k'_{(HX)}$ и $k'_{(X)}$ – факторы удерживания двух форм кислоты, pH и pK <sub>a</sub> должны быть выражены в одной шкале ( $s_pH$ и $s_pK_a$ ).

\* ПФ – подвижная фаза, НФ – неподвижная фаза.

## Результаты и их обсуждение

Основные результаты диссертационной работы и их обсуждение представлены в главах 3-6. Рассмотрены три способа описания свойств полярных неподвижных фаз, основанные: 1) на закономерностях удерживания тестовых веществ при варьировании параметров хроматографической системы (глава 3, 4); 2) на сравнении селективности разделения соединений разных классов (глава 5); 3) на измерении параметров удерживания специально подобранных веществ-маркеров в фиксированных условиях (глава 6).

В главе 3 рассмотрены особенности варьирования компонентов подвижной фазы с целью получения информации о поведении аналитов и неподвижных фаз в ГИХ. Выбраны условия и представлены рекомендации для сокращения нежелательного влияния одновременно изменяющихся параметров помимо варьируемых. Изменяя содержание ацетонитрила в подвижной фазе, поддерживали постоянным  $w_pH$  и концентрацию элюирующего иона. Учитывали, что разная доля органического растворителя влияет на итоговый  $w_pH$  подвижной фазы и константы диссоциации слабых электролитов. Для минимизации изменения количества воды, адсорбированной на неподвижной фазе, негативно влияющего на удерживание заряженных соединений при увеличении концентрации соли в элюенте, предложили проводить изучение механизма ионного обмена в узком диапазоне 1-7.5 мМ в подвижной фазе.

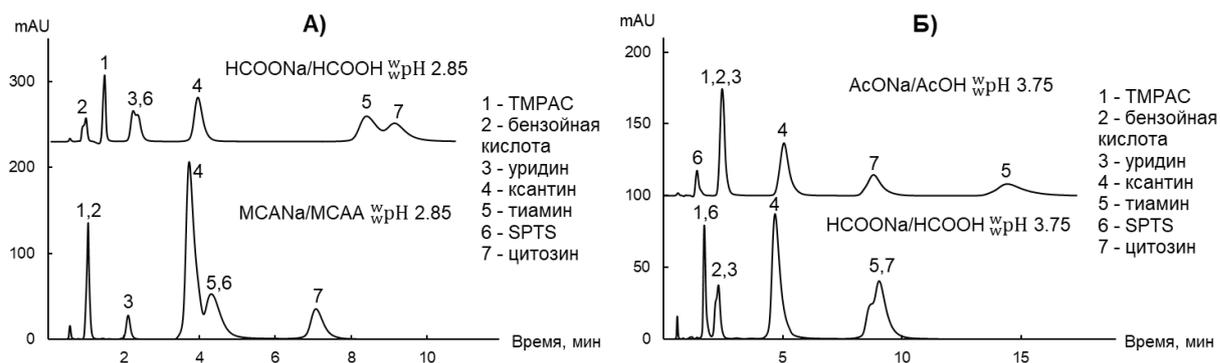


Рис. 1. Влияние природы буферного раствора на селективность разделения на неподвижной фазе C2 (размер колонки 50×3 мм) при 90 об.% ацетонитрила в подвижной фазе. Состав водной части элюента: А) 224 мМ HCOONa/HCOOH  $w_pH$  2.85 ( $s_pH$  5.6), 50 мМ MCANa/MCAA  $w_pH$  2.85 ( $s_pH$  5.6); Б) 275 мМ AcONa/AcOH  $w_pH$  3.75 ( $s_pH$  7.1), 50 мМ HCOONa/HCOOH  $w_pH$  3.75 ( $s_pH$  6.6). Концентрация элюирующего иона в подвижной фазе 2.5 мМ; скорость потока 0.5 мл/мин; УФ детектирование при 254 нм.

Показано, что варьирование pH подвижной фазы необходимо проводить при фиксированной концентрации элюирующего иона для регистрации изменения только степени диссоциации групп сорбента и аналита. Обоснована необходимость замены аммония в буферном растворе на катион щелочного металла, поскольку в присутствии 90 об.% ацетонитрила близки измеренные  $s_pK_a$  уксусной кислоты (8.3) и аммония (8.1), что приводит к отклонению концентрации элюирующего иона в растворе. Для варьирования pH в широком диапазоне необходимы разные буферные системы, поэтому рассматривали влияние природы кислоты-основы буферного раствора на механизм удерживания тестовых аналитов (рис. 1),  $w_pH$  и элюирующую силу подвижной фазы. Последнее свойство предложили оценивать по собственному удерживанию карбоновых кислот на исследуемых

неподвижных фазах. Таким образом, рекомендован способ приготовления буферных растворов на основе карбоновых кислот, удовлетворяющий всем требованиям.

В главе 4 проводили изучение механизмов удерживания разнообразных аналитов в условиях гидрофильной хроматографии на немодифицированном силикагеле – матрице большинства неподвижных фаз, и его производных с различными функциональными группами в системе с высоким содержанием ацетонитрила. Для этого варьировали pH подвижной фазы, концентрацию элюирующего иона и долю ацетонитрила в условиях, установленных в главе 3, при нескольких комбинациях фиксированных параметров.

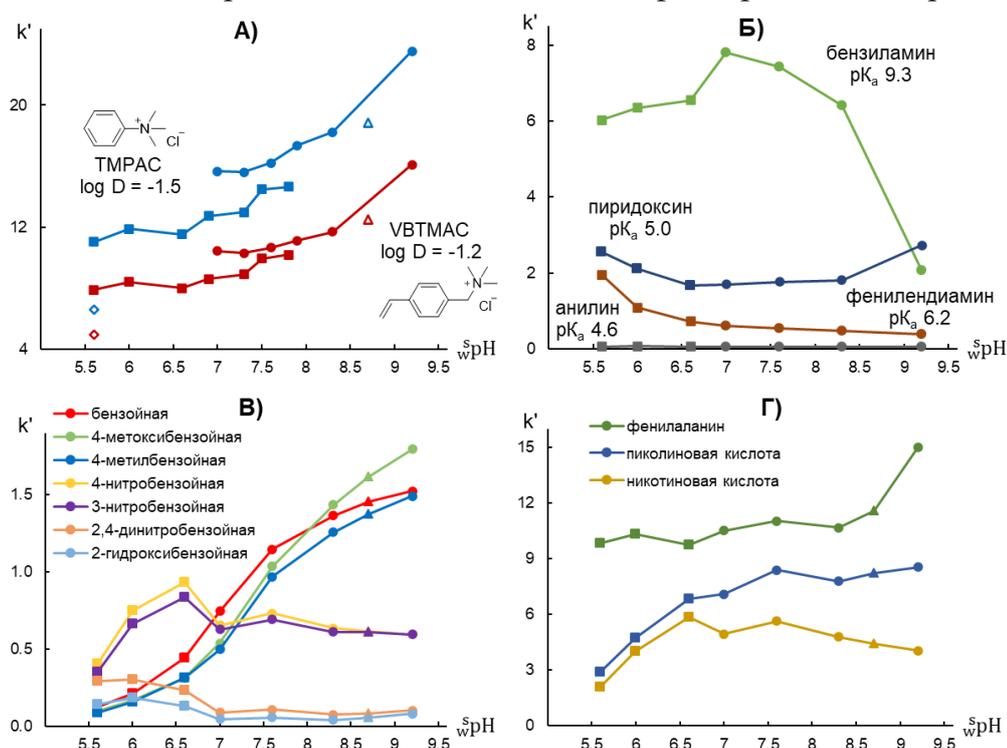


Рис. 2. Зависимости факторов удерживания А) четвертичных аминов, Б) слабых оснований, В) слабых кислот и Г) амфолитов от  $pH_w$  подвижной фазы на немодифицированном силикагеле С1. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%; буферный раствор (форма маркера):  $\text{HCOONa}/\text{HCOOH}$  (квадрат),  $\text{AcONa}/\text{AcOH}$  (круг),  $\text{MCANa}/\text{MCAA}$  (ромб),  $\text{C}_2\text{H}_5\text{COONa}/\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$  (треугольник), диапазон  $pH_w$  2.85-5.76. Концентрация элюирующего иона  $\text{Na}^+$  в подвижной фазе 2.5 мМ.

Для силикагеля продемонстрировано, что увеличение  $pH_w$  подвижной фазы, содержащей 90 об.% ацетонитрила, от 2.85 до 5.76 ( $pH_w$  5.6-9.2) приводит к росту удерживания четвертичных аминов (рис. 2А). С опорой на модели для ионного обмена (рис. 3, табл. 4) и с учётом вероятного концентрирования карбоксилат-ионов буферного раствора в приповерхностном водном слое показано, что происходит увеличение катионообменной ёмкости, вызванное возрастанием степени диссоциации силанольных групп. Это приводит к росту соотношения фаз  $\frac{V_w}{V_m}$  (табл. 5) и увеличению удерживания нейтральных соединений за счёт распределения. Кроме того, усиливается удерживание за счёт адсорбции, показанное в рамках методологии Гуо (табл. 5). Для цитозина при  $pH_w$  2.85 обнаружен 100 % вклад адсорбции.  $pK_a(\text{BH}^+)$  для сопряжённой к цитозину кислоте оценили величиной  $\sim 4$ .

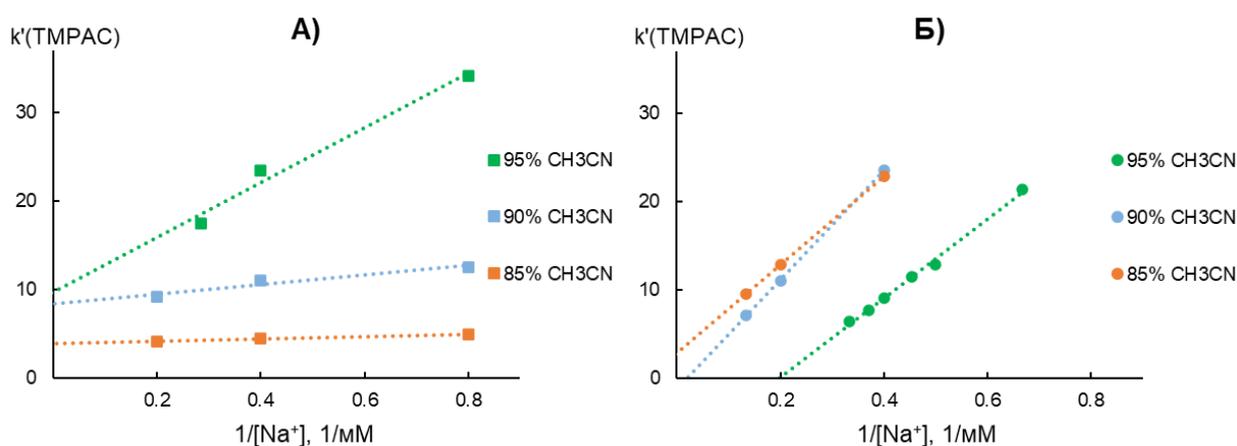


Рис. 3. Зависимости фактора удерживания катиона TMPAC на силикагеле С1 от концентрации элюирующего иона в подвижной фазе в координатах  $k'-1/[Na^+]$  при разных содержаниях ацетонитрила и  $w_{pH}$ . Условия А): HCOONa/HCOOH  $w_{pH}$  2.85 / ацетонитрил 5/95, 10/90 и 15/85 об.%, диапазон концентраций  $Na^+$  в элюенте 1.25-5 мМ; Б): AcONa/AcOH  $w_{pH}$  5.76/ацетонитрил 5/95, 10/90 и 15/85 об.%, диапазон концентраций  $Na^+$  в элюенте 1.5-7.5 мМ.

Таблица 5. Коэффициенты распределения  $D$ , вклады распределения  $k'_{распр.}$  и адсорбции  $k'_{адсорбция}$  в удерживание нейтральных соединений при двух  $w_{pH}$  на немодифицированном силикагеле С1. Условия: HCOONa/HCOOH  $w_{pH}$  2.85 или AcONa/AcOH  $w_{pH}$  5.76; 90 об.% ацетонитрила, концентрация  $Na^+$  в элюенте 2.5 мМ

Вещество	HCOONa/HCOOH $w_{pH}$ 2.85				AcONa/AcOH $w_{pH}$ 5.76			
	$\frac{V_W}{V_M}$	$D$	$k'_{распр.}^*$	$k'_{адс.}^{**}$	$\frac{V_W}{V_M}$	$D$	$k'_{распр.}$	$k'_{адс.}$
Урацил	0.065	5.5	0.36 (69%)	0.17 (32%)	0.094	6.5	0.61 (60%)	0.41 (41%)
2'-дезоксиринидин		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%)

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

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

Показано, что степень диссоциации силанольных групп силикагеля, а также природа буферного раствора, влияет на зависимости удерживания катионов от содержания ацетонитрила в элюенте (рис. 3). Для нейтральных соединений закономерности удерживания имеют вид, характерный для ГИХ, при этом изменение их удерживания с ростом доли воды существеннее при большей степени диссоциации силанольных групп ( $w_{pH}$  5.76). Продемонстрировано влияние содержания органического растворителя в подвижной фазе на механизм удерживания тестовых веществ. При  $w_{pH}$  2.85 изменение концентрации  $[Na^+]$  оказывает больший эффект на удерживание катионов с увеличением содержания ацетонитрила в элюенте (рис. 3), что связано с ростом числа доступных для взаимодействия диссоциированных силанольных групп за счёт меньшей адсорбции воды и более высокого  $s_{pH}$  подвижной фазы (табл. 1). Зависимости  $k'-1/[Na^+]$  при 90 и 95 об.% ацетонитрила и  $w_{pH}$  5.76 имеют нетипичный вид (рис. 3), поскольку при конечной

концентрации ацетата натрия в элюенте катионы перестают удерживаться. Это, вероятно, отражает образование ионных пар катион-ацетат.

Получены закономерности удерживания слабых оснований, кислот и амфолитов на немодифицированном силикагеле в ГИХ (рис. 2Б,В,Г). Особенности удерживания оснований заключаются в снижении их факторов удерживания с увеличением рН, несмотря на возрастание отрицательного заряда сорбента (рис. 2Б). Это связано с уменьшением доли протонированных молекул, подтвержденное меньшим вкладом ионного обмена в их удерживание, несмотря на  ${}^w pK_a(BH^+) > {}^w pH + 2$  для ряда соединений. Оценено, что  ${}^s pK_a(BH^+) < {}^w pK_a(BH^+)$ , которые для 4-диметиламинопиридина, 4-аминопиридина и бензиламина составляют ~8-9 в среде, содержащей 90 об.% ацетонитрила.

Для слабых кислот показано влияние их силы на вид зависимости фактора удерживания от  ${}^s pH$  подвижной фазы (рис. 2В). Для производных бензойной кислоты с  ${}^w pK_a \sim 4.2-4.5$  зависимости имеют возрастающую S-образную форму. С опорой на уравнение из табл. 4 установлены значения  ${}^s pK_a$  при 90 об.% ацетонитрила (7.1-7.5), что отлично согласуется с литературными данными. Возрастание факторов удерживания кислот с увеличением рН, несмотря на усиление отталкивания от отрицательно заряженных силанолов, связано с увеличением их гидрофильности, способствующей распределению между элюентом и адсорбированным водным слоем. Ксантин, несмотря на  ${}^w pK_a > {}^w pH + 2$ , показывает поведение, подобное производным бензойной кислоты с  ${}^w pK_a \sim 5$ , что позволило оценить его  ${}^s pK_a$  (~9 при 90 об.% ацетонитрила). Наряду с распределением отмечено образование водородных связей для данной группы соединений. Закономерности удерживания фенилаланина аналогичны таковым для нейтральных соединений (рис. 2Г), что говорит о преобладании его цвиттер-ионной формы в рассматриваемых условиях. Зависимости удерживания для пиколиновой и никотиновой кислот отличаются между собой и фенилаланина, что вызвано их электростатическим отталкиванием от силикагеля, а также, вероятно, образованием внутримолекулярных водородных связей пиколиновой кислотой.

Таким образом, показано влияние состава элюента на свойства силикагеля, а также установлено, что закономерности удерживания слабых электролитов определяются степенью диссоциации силанольных групп сорбента, константами диссоциации соединений в среде с соответствующим содержанием ацетонитрила, их гидрофильностью и способностью образовывать водородные связи.

На следующем этапе проведено подробное изучение свойств силикагеля с привитым эремомицином в условиях гидрофильной хроматографии. С учётом влияния природы буферного раствора при увеличении  ${}^s pH$  по удерживанию органических ионов показано изменение его ионообменных свойств (рис. 4А). По влиянию рН элюента на механизм ионного обмена (рис. 4Б) определены диапазоны рН преобладания анионообменных ( ${}^w pH < 3.75$ ,  ${}^s pH < 6.6$ ), цвиттер-ионных ( $3.75 < {}^w pH < 4.76$ ,  $6.6 < {}^s pH < 8.3$ ) и катионообменных ( ${}^w pH > 4.76$ ,  ${}^s pH > 8.3$ ) свойств сорбента при 90 об.% ацетонитрила в элюенте. При этом удерживание урацила и уридина не зависит от рН и возрастает с увеличением концентрации соли в подвижной фазе, отражая реализацию механизма распределения. Для цитозина зависимости имеют иной характер, демонстрируя существенный вклад специфических взаимодействий в его удерживание. Факторы

удерживания ксантина и бензойной кислоты на силикагеле, модифицированном эремомицином, возрастают с увеличением рН элюента по аналогии с силикагелем, согласуясь с установленными в работе  ${}^s_pK_a$ , однако эффект от варьирования концентрации элюирующего иона отличается (рис. 4Б). Полученные закономерности факторов удерживания тестовых веществ и вкладов электростатических взаимодействий от  ${}^s_pH$  сохраняются при увеличении доли воды от 10 до 15 об.%.  ${}^s_pK_a$  бензойной кислоты и ксантина при 85 об.% ацетонитрила оценили величинами  $\sim 6.5$  и  $\sim 8.5$ , соответственно.

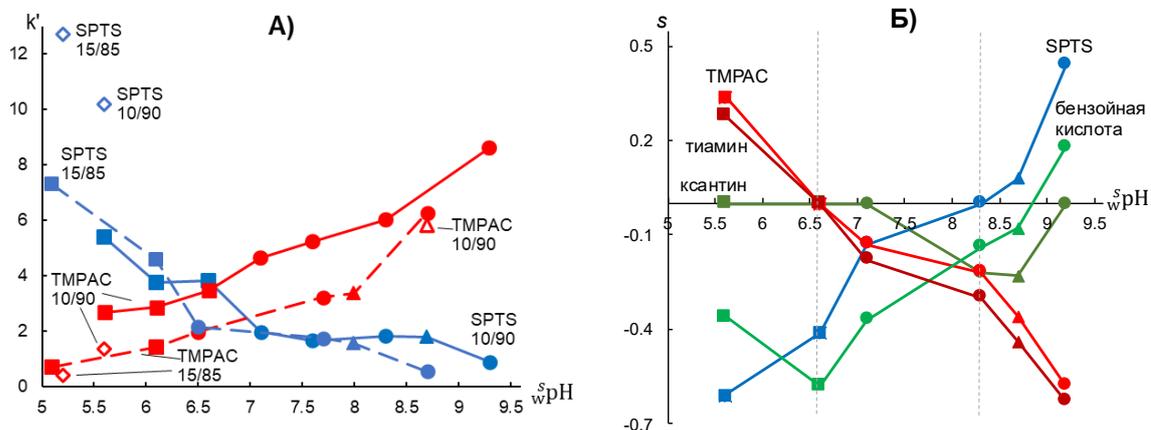


Рис. 4. Влияние  ${}^s_pH$  элюента на А) удерживание катиона TMPAC и аниона SPTS при постоянной концентрации элюирующего иона 2.5 мМ в подвижной фазе, Б) вклада электростатических взаимодействий на сорбенте С2. Условия: буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.% (сплошная линия) или 15/85 об.% (пунктирная линия), остальные условия указаны в подписи к рис. 2.

Поскольку отмечено сходство закономерностей удерживания кислот и катионов при варьировании рН на силикагеле и силикагеле с привитым эремомицином, предположили, что они будут сохраняться на других фазах. Проверку гипотезы проводили с использованием неподвижных фаз с отличающимися функциональными слоями (диол С3, аминопропил С4, полиамин С5, цвиттер-ион С6) при трёх  ${}^w_pH$  2.85, 4.26, 5.76 и варьировании концентрации соли при  ${}^w_pH$  2.85 и 5.76 в элюенте, содержащем 90 об.% ацетонитрила. Действительно, закономерности изменения удерживания тестовых веществ с увеличением рН на разных фазах имеют одинаковый вид: удерживание катионов и ксантина – возрастает, анионов – уменьшается, бензиламина – проходит через максимум. Для бензойной кислоты удерживание возрастает при переходе от  ${}^w_pH$  2.85 к 4.26 или 5.76. Тренды связаны с тем, что увеличение отрицательного заряда неподвижной фазы за счёт диссоциации кислотных групп, включая силанольные, равноценно уменьшению положительного из-за депротонирования аминогрупп. Закономерности для слабых кислот и оснований,  ${}^s_pK_a$  которых входят в рассматриваемый диапазон  ${}^s_pH$ , в первую очередь вытекают из изменения собственной степени диссоциации, которая определяет их гидрофильность. Абсолютные величины факторов удерживания веществ зависят от кислотно-основных свойств функциональных групп неподвижных фаз, количества адсорбированной воды, а также размера пор.

Показано влияние условий (рН, концентрации элюирующего иона и природы неподвижной фазы) на термодинамические параметры удерживания тестовых веществ

(табл. 5). Их определяли для силикагеля и аминопропилсиликагеля по уравнению Вант-Гоффа путём варьирования температуры колонки в диапазоне 25-55°C. 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 ( $\Delta H^\circ < 0$ ,  $\Delta S^\circ < 0$ ). Сравнивая термодинамические параметры для слабых электролитов и ионов, удалось подтвердить сходство или различие их механизмов удерживания.

Таблица 5. 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:  $HCOONa/HCOOH$   $w_pH$  2.85,  $AcONa/AcOH$   $w_pH$  5.76. Диапазон варьирования температуры колонки 25-55°C.  $n=5$ ,  $P=0.95$

Вещество	Силикагель С1		Аминопропилсиликагель С4			
	$w_pH$ 2.85	$w_pH$ 5.76	$w_pH$ 2.85		$w_pH$ 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
ТМРАС	0.3±0.2	3.3±0.3	-19±1	-12.3±0.5	н/л*	н/л
ВБТМАС	2.1±0.2	7.0±0.9	-70±30	-16±1	н/л	н/л
Бензиламин	2.0±0.1	-23.0±0.9	0	-1.8±0.5	-15±2	-21±2
SPTS	-6±4	-8±2	6.3±0.3	9±2	н/л	н/л; 5±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.

Рассмотренные закономерности удерживания разнообразных веществ дают представление о способах воздействия на удерживание и селективность разделения многокомпонентных смесей. Ключевым параметром является рН подвижной фазы. С опорой на полученные тренды удерживания веществ показана возможность прогнозирования условий разделения компонентов реального объекта. Для демонстрации выбрали спортивный напиток «ISOCARB» (Sport Technology Nutrition, Россия), который по информации производителя содержал 12 полярных органических соединений: 3 аниона, 5 слабых кислот, катион, 2 слабых основания и цвиттер-ион. Поскольку 8 соединений имели кислотные свойства, предложили использовать фазу с анионообменными свойствами. Предполагали, что высокогидрофильный катион будет удерживаться за счёт механизма распределения, особенно при высоких концентрациях соли в элюенте, экранирующей заряд сорбента, а слабые основания будут преимущественно находиться в нейтральной форме в среде с высоким содержанием ацетонитрила (90 об.%). Таким образом, выбрали самую гидрофильную фазу с высокой анионообменной ёмкостью из нашего набора – силикагель, модифицированный полиамином. Низкий рН выбран для того, чтобы слабые кислоты находились преимущественно в нейтральной форме. Выбранные условия позволили сразу разделить 8 соединений из 12, для остальных необходим выбор условий детектирования. В

напитке в данных условиях было обнаружено 5 соединений. Предложены рекомендации по дальнейшей доработке условий разделения и детектирования для проведения одновременного определения водорастворимых витаминов, искусственных подсластителей, регуляторов кислотности и консервантов.

**Глава 5** посвящена применению хемометрических подходов для сравнения селективности неподвижных фаз в ГИХ. Рассматривали 28 сорбентов, включающих аминопропилсиликагель (C4\_1) и полученные на его основе по реакции Уги фазы с низкомолекулярными («С-У») и полимерными («С-пУ») функциональными слоями. Селективность фаз характеризовали по тесту Танака и с использованием 33 биологически активных соединений (нуклеозидов, азотистых оснований, углеводов, карбоновых кислот и водорастворимых витаминов). Каждый класс веществ тестировали при определённом составе элюента, обеспечивающем приемлемые времена удерживания и форму пиков. Для выяснения сходств и различий в свойствах 28 неподвижных фаз данные обрабатывали с использованием хемометрических подходов: метода главных компонент, иерархической кластеризации и метода К-средних. Индекс Рэнда применяли для сравнения результатов кластеризации двумя способами. Использование двух подходов для кластеризации позволило увеличить надёжность группировки неподвижных фаз.

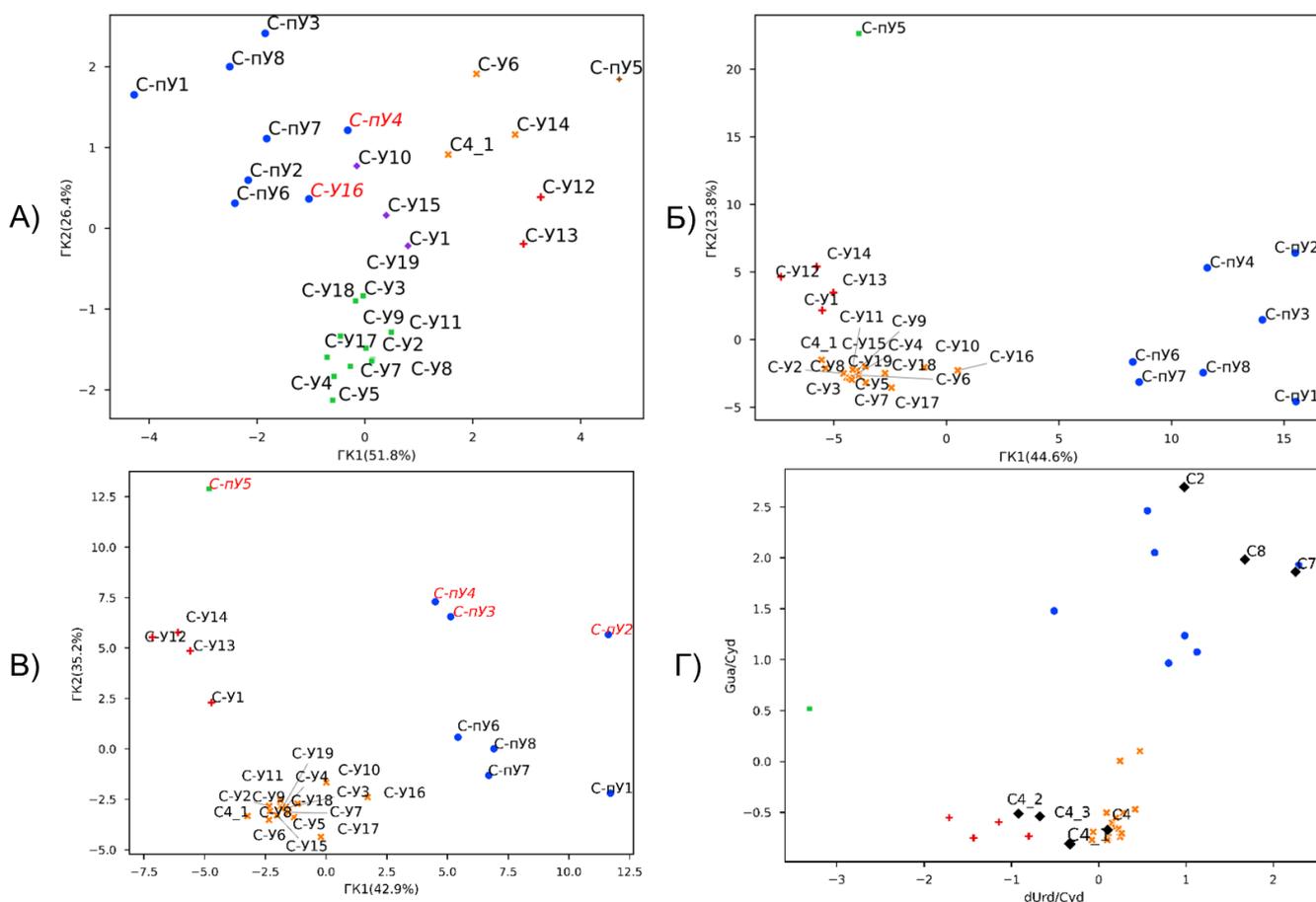


Рис. 5. График счетов по двум первым главным компонентам ГК1-ГК2 для данных А) теста Танака, Б) 119 логарифмов селективностей модельных веществ, В) 55 логарифмов селективности азотистых оснований и нуклеозидов, Г) двумерный график по выбранным парам веществ. Кластеры, отмеченные разными цветами, установлены по методу К-средних.

В результате обработки данных теста Танака обнаружено, что неподвижные фазы образуют 6 кластеров (рис. 5А). Однако их состав отличается для двух методов кластерного анализа (индекс Рэнда равен 0.87) из-за близости внутри- и межкластерных расстояний. Неподвижные фазы с полимерами в функциональном слое расположены на существенном расстоянии от исходной матрицы в пространстве главных компонент, подтверждая различие в селективности. Однако они находятся близко к другим неподвижным фазам. Это отражает ограничения теста Танака.

Из данных удерживания 33 биологически активных соединений на 28 неподвижных фазах предварительно рассчитывали логарифмы попарных селективностей (всего 119 логарифмов селективности). Даже без применения кластерного анализа на графике счетов ГК1-ГК2 отчётливо видны 4 группы сорбентов (рис. 5Б). Стоит отметить, что кластеры, включающие «С-ПУ» фазы, расположены на существенном расстоянии от всех неподвижных фаз с низкомолекулярными модификаторами на графике счетов. Это иллюстрирует существенное влияние полимеров в функциональном слое на хроматографические свойства фаз, которое заключается, по-видимому, в проявлении гидрофобных взаимодействий. Различия в селективности, наблюдаемые среди некоторых неподвижных фаз с низкомолекулярными модификаторами (кластеры, отмеченные красным и оранжевым на рис. 5Б), привели к выявлению условий реакции Уги, позволяющих существенно изменить свойства матрицы.

Поскольку для тестирования неподвижных фаз с использованием 33 биологически активных веществ и нескольких составов элюента требовалось проведение длительных стадий переуравновешивания колонки, то выявление сокращенного набора соединений, могло бы существенно сократить время и расход растворителя при установлении различий между модифицированными фазами. Показано, что по данным удерживания азотистых оснований и нуклеозидов достигается близкое к полному набору веществ разбиение неподвижных фаз на кластеры (рис. 5В). Из этого класса соединений выбраны гуанин (Gua), цитидин (Cyd), 2'-деоксиуридин (dUrd), которые дают схожую группировку фаз по свойствам. Результаты характеристики по трём веществам можно представить в виде двумерного графика, где по осям откладываются автошкалированные значения параметров, рассчитываемые из их удерживания:  $\log \alpha(dUrd/Cyd)$  и  $\log \alpha(dUrd/Gua)$  или  $\log \alpha(Gua/Cyd)$  (рис. 5Г). С использованием трёх аналитов тестирование одной колонки занимает значительно меньше времени, около 3 рабочих часов вместо недели, благодаря сокращению числа тестовых веществ и отсутствия стадии переуравновешивания колонки. Показано, что предложенный вариант экспрессного тестирования подходит для характеристики свойств других неподвижных фаз с низко- и макромолекулярными модификаторами (рис. 5Г). Таким образом, сокращенный набор из трёх веществ может служить для экспрессного сравнения селективности неподвижных фаз, а также быть важным дополнением для существующих хроматографических тестов.

В главе 6 рассмотрена проблема выбора веществ-маркеров для оценки гидрофильности, анионообменной и метиленовой селективности неподвижных фаз в условиях ГИХ. Показано, что существующие параметры гидрофильности ( $k'$ (уридин) и  $\alpha$ (цитозин/урацил)), применяемые для полярных неподвижных фаз, описывают разные

свойства. Из них фактор удерживания уридина из теста Танака даёт более корректную оценку количества воды, адсорбированной на фазе ( $r=0.902$  для зависимости  $k'$ (уридин) и соотношения объёмов фаз  $\frac{V_W}{V_M}$ ). В качестве альтернативного вещества-маркера выбрана тиомочевина благодаря большому коэффициенту корреляции между её фактором удерживания и соотношением объёмов фаз ( $r=0.939$ ). За счёт более простой структуры по сравнению с уридином, а также возможности её детектирования спектрофотометрически, тиомочевина может позволить улучшить качество оценки свойств полярных неподвижных фаз.

В ряде работ отмечено, что параметр анионообменных свойств фаз из теста Танака (коэффициент селективности п-толуолсульфонат/уридин) не коррелирует с фактором удерживания хлорида в ионной хроматографии для сорбентов на основе полимера. Для выяснения причин провели сравнение механизмов удерживания веществ-маркеров на аминированных силикагеле и ПС-ДВБ. Предложены более гидрофильные алкансульфонаты (бутан-, пропан-, этан-, метан-) и неорганические ионы ( $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ) в качестве альтернативных маркеров, для работы с ними использовали хроматографическую систему с испарительным детектором по светорассеянию. С опорой на закономерности удерживания анионов на неподвижных фазах на основе разных матриц подтверждено влияние гидрофильных взаимодействий для п-толуолсульфоната на аминированных силикагелях и гидрофобных на аминированных ПС-ДВБ в условиях теста Танака (20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор  $pH$  4.7/ацетонитрил 10/90 об.%), что проясняет причины некорректной оценки анионообменных свойств фаз во втором случае. В качестве маркера анионообменных свойств неподвижных фаз на основе силикагеля и полимера на данном этапе выбран метансульфонат, удерживающийся преимущественно за счёт ионного обмена в данных условиях.

Для оценки правильности описания анионообменных свойств фаз предложили сравнить параметры с ёмкостью колонок. Для учёта влияния органического растворителя на свойства оценивали ёмкость методом вытеснительной хроматографии в присутствии ацетонитрила. Сравнили значения количеств заряженных центров, полученные тремя способами (табл. 3). Способ 'В/А-В' выбран для определения числа заряженных групп, доступных для взаимодействия в условиях ГИХ. Однако для сорбентов на основе силикагеля необходим контроль pH, проще реализуемый в водной среде (способ 'В').

Таким образом, тестировали набор неподвижных фаз с использованием известного маркера анионообменных свойств п-толуолсульфоната, предлагаемого метансульфоната, а также уридина в условиях теста Танака. Результаты сравнивали с ёмкостью колонок. Установили, что коэффициенты селективности анион/уридин не коррелируют с числом заряженных центров в отличие от факторов удерживания анионов. Показано, что по фактору удерживания метансульфоната возможно одновременное сравнение аминированных сорбентов на основе полимера и силикагеля (рис. 6), что подтверждено высоким коэффициентом корреляции с ёмкостью колонок, установленной по хлориду в водной среде ( $r=0.961$ ). Дополнительно оценивали роль гидрофобных взаимодействий на неподвижных фазах по метиленовой селективности  $\alpha(CH_2)$ , рассчитываемой из факторов удерживания

гомологов бутан- и пропансульфонатов. По данному параметру однозначно показана большая гидрофобность сорбентов на основе полимера по сравнению с модифицированными силикагелями: для первых  $\alpha(\text{CH}_2) \geq 0.97$ , для вторых –  $\leq 0.89$ . Такой вывод нельзя сделать по коэффициенту селективности пары уридин/5-метилуридин из теста Танака.

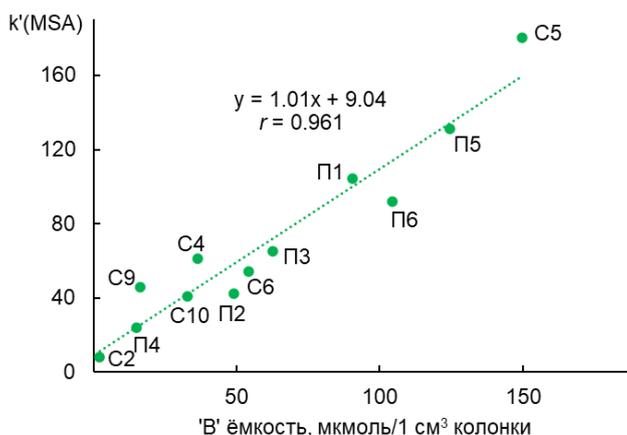


Рис. 6. Корреляция между ёмкостью колонок и фактором удерживания метансульфоната (MSA) для неподвижных фаз на основе силикагеля («С») и ПС-ДВБ («П»). Факторы удерживания измерены в элюенте 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор  $w_{\text{pH}} 4.7$  / ацетонитрил 10/90 об.%.

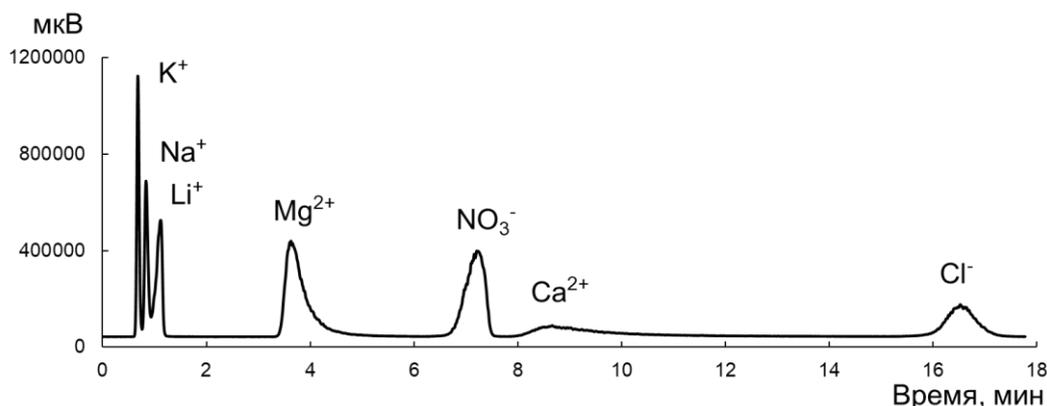


Рис. 7. Хроматограмма модельной смеси неорганических ионов на неподвижной фазе на основе полистирол-дивинилбензола П2 (размер колонки 100×4 мм). Условия: 65 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор  $w_{\text{pH}} 4.7$ /ацетонитрил 15.4/84.6 об.%, скорость потока 1.8 мл/мин, испарительный детектор по светорассеянию. Концентрации ионов в смеси: K<sup>+</sup> – 60 мг/л, Na<sup>+</sup> – 50 мг/л, Li<sup>+</sup> – 30 мг/л, Mg<sup>2+</sup> – 60 мг/л, Ca<sup>2+</sup> – 120 мг/л, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – 500 мг/л, Cl<sup>-</sup> – 570 мг/л.

Впервые обнаружено, что в рассматриваемых условиях на положительно заряженных неподвижных фазах удерживаются неорганические катионы. Их порядок элюирования одинаков на всех аминированных фазах (рис. 7) и противоположен типичному для катионообменной хроматографии в водной среде. Для катионов щелочных металлов показано, что на удерживание влияют распределение и электростатическое отталкивание, для щелочноземельных – распределение и комплексообразование. За счёт этого продемонстрировано одновременное разделение 7 неорганических ионов на анионообменниках в условиях ГИХ с эффективностью до 45000 тт/м.

## 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  $w$ рН, концентрация которой соответствует требуемой равновесной концентрации элюирующего иона:  $c_{к-ты} = c_{буф} = [M]/\alpha_A$ . 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'-дезоксирин, 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.

По результатам диссертационной работы можно сформулировать следующие **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, а также выборе новых веществ-маркеров для экспрессной оценки ёмкости сорбентов.
2. Выбраны условия варьирования рН подвижной фазы в диапазоне  $w_pH$  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  $w^s pK_a(НА, ВН^+)$  в водно-органических средах (85 и 90 об.% ацетонитрила) для муравьиной, уксусной, монохлоруксусной, пропионовой, 4-метил-, 4-метоксibenзойной, 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'-дезоксигуанидин 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  $\alpha$ (п-толуолсульфонат/уридин) и  $\alpha$ (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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук:

- 1) *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: BJZWHR. – 1.27 п.л. Вклад автора 50%. Импакт-фактор **0.7** (JIF)
- 2) *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. – 1.96 п.л. Вклад автора 30%. Импакт-фактор **0.18** (SJR)
- 3) *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. – 1.04 п.л. Вклад автора 60%. Импакт-фактор **2.1** (JIF)
- 4) *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. – 1.16 п.л. Вклад автора 50%. Импакт-фактор **4.0** (JIF)
- 5) *Смагина М.А., Хрисанфова А.О., Иванова Е.Д., Каринская Э.А., Статкус М.А., Шпигун 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: KLJAИH. – 1.16 п.л. Вклад автора 30%. Импакт-фактор **0.18** (SJR)

## БЛАГОДАРНОСТИ

*Автор выражает благодарность коллективу лаборатории хроматографии за помощь в выполнении работы; д.х.н., проф., чл.-корр. РАН Шпигуну Олегу Алексеевичу и д.х.н., проф. Пирогову Андрею Владимировичу за консультации по тематике работы; д.х.н. Староверову Сергею Михайловичу за любезно предоставленные сорбенты и колонки для исследования; д.х.н. Статкусу Михаилу Александровичу и д.х.н., проф. Цизину Григорию Ильичу за помощь в работе с оборудованием с испарительным детектором по светорассеянию; д.х.н., проф. Нестеренко Павлу Николаевичу за ценные замечания и комментарии по физико-химической составляющей работы; д.х.н. Ставрианиди Андрею Николаевичу за ценные советы по тематике работы; к.х.н. Самохину Андрею Сергеевичу за неоценимую помощь в обработке данных; к.х.н. Гармаю Андрею Владимировичу за помощь в проведении анализов на ионном хроматографе; к.х.н. Нуриеву Вячеславу Назимовичу за любезно предоставленные соединения.*

*Автор искренне благодарен студентам, внесшим свой вклад в данное исследование.*

*Автор выражает искреннюю признательность и благодарность семье, друзьям и коллегам за поддержку.*

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках проектов: РНФ № 20-13-00140, ЦИТИС АААА-А20-120121190066-3, «Новые сепарационные материалы для ионной и гидрофильной хроматомасс-спектрометрии»; РНФ № 23-73-01145, ЦИТИС 123083100048-2, «Новые универсальные цвиттер-ионные сорбенты для различных видов жидкостной хроматографии», РНФ № 25-13-00132, ЦИТИС 125071608623-3, «Новые многофункциональные сепарационные материалы для высокоэффективной жидкостной хроматографии». Исследование проводили с использованием оборудования ЦКП МГУ «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование», приобретенного МГУ по программе обновления приборной базы в рамках национального проекта «Наука» и в рамках Программы развития МГУ.*