

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

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ПРОСУНЦОВА ДАРЬЯ СЕРГЕЕВНА

**СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ
СОПОЛИМЕРА СТИРОЛА И ДИВИНИЛБЕНЗОЛА,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА,
ДЛЯ ВЭЖХ**

Специальность – 1.4.2 – Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель
к.х.н. Ананьева И.А.

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список используемых сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1 Наноматериалы в жидкостной хроматографии	13
2 Наночастицы золота в хроматографических методах анализа	17
2.1 Несвязанные НЧЗ в методах ВЭЖХ	18
2.2 Сорбенты, модифицированные НЧЗ, в методах ВЭЖХ	22
2.3 НЧЗ на носителе в варианте капиллярной ВЭЖХ	22
2.4 Использование в варианте колоночной ВЭЖХ	23
3 Нанокompозитные сорбенты на основе полимерной матрицы в жидкостной хроматографии	28
3.1 Сорбенты на основе полимеров, модифицированных НЧЗ, для ВЭЖХ	30
4 Хиральные неподвижные фазы	38
4.1 Хиральные неподвижные фазы с макроциклическими антибиотиками	39
4.2 Полимерные неподвижные фазы с наночастицами в хиральной жидкостной хроматографии	53
4.3 Хиральные неподвижные фазы с наночастицами, стабилизированными антибиотиками	56
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	58
1 Исходные вещества, аппаратура, методики эксперимента, техника эксперимента	58
1.1 Реактивы и материалы	58
1.2 Аппаратура	59
1.3 Методики эксперимента	61
1.4 Техника эксперимента	65
Глава 3. Результаты и их обсуждение	67
1 Сополимер стирола и дивинилбензола, модифицированный наночастицами золота с аминокислотами	67
1.1 Синтез сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота с аминокислотами	68
1.2 Изучение физико-химических свойств сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота с аминокислотами	74
1.3 Исследование хроматографических свойств сорбентов ПС-ДВБ-Au-L-цистеин и ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys	81

2 Сополимер стирола и дивинилбензола, модифицированный наночастицами золота, стабилизированными макроциклическим антибиотиком	111
2.1 Синтез и характеристика наночастиц золота, стабилизированных макроциклическим антибиотиком.....	112
2.2 Синтез и характеристика сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота, стабилизированными макроциклическим антибиотиком.....	126
2.3 Изучение физико-химических свойств сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота, стабилизированными макроциклическим антибиотиком.....	130
2.4 Исследование хроматографических свойств сорбентов ПС-ДВБ, модифицированного НЧЗ, стабилизированными эремомицином	135
2.5 Разделение энантиомеров кетопрофена в препарате «Кетонал»	156
2.6 Определение энантиомерного состава напроксена	157
2.7 Сополимер стирола и дивинилбензола, модифицированный эремомицином без НЧЗ	159
Заключение	162
Выводы	164
Список литературы	166

Список используемых сокращений

ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ОФ ВЭЖХ	Обращённо-фазовая ВЭЖХ
ПО ВЭЖХ	Полярно-органическая ВЭЖХ
ПС-ДВБ	Полистирол-дивинилбензол
НЧ	Наночастицы
НЧЗ	Наночастицы золота
НЧЗЭ	Наночастицы золота, стабилизированные эремоницином
ХНФ	Хиральная неподвижная фаза
ДО	Диффузное отражение
ПЭМ	Просвечивающая электронная микроскопия
СЭМ	Сканирующая электронная микроскопия
АЭС	Атомно-эмиссионная спектроскопия
БЭТ	Метод Брунауэра-Эмметта-Теллера
БДХ	Метод Барретта-Джойнера-Халенда
СОМ	Самоорганизованные монослои
БОК	Трет-бутоксикарбонил-
КБЗ	Бензилоксикарбонил-
НФ	Неподвижная фаза
ПФ	Подвижная фаза
ТЕА	Триэтиламин
ФБ	Фосфатный буферный раствор
ББ	Боратный буферный раствор
АСН	Ацетонитрил
АсОН	Уксусная кислота
ТЭАА	Триэтиламиноацетат
МеОН	Метанол
ТРИС	Трис(гидроксиметил)-аминометан

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – наиболее востребованный метод разделения различных классов органических веществ. В современном мире ставятся все более сложные научные и практические задачи по разделению органических веществ. Это касается таких областей как фармацевтика, медицина, анализ окружающей среды, допинг-контроль и другое. Постоянно возрастают требования к чувствительности и селективности определения, к экспрессности и универсальности методов. Также в приоритет ставится удешевление и упрощение анализа. Все это говорит о необходимости усовершенствования существующих методов разделения и поиска новых подходов. Поэтому разработка неподвижных фаз для ВЭЖХ с использованием новых подходов и современных технологий очень *актуальна*.

Одним из решений может быть использование функциональных материалов для создания новых универсальных сорбентов, селективных к различным группам органических соединений. Последние десятилетия в сепарационных методах анализа идет интенсивное развитие функциональных наногибридных материалов, в том числе широко исследуются наночастицы золота (НЧЗ). НЧЗ химически инертные наночастицы, они хорошо изучены и могут быть получены определенного размера и формы путем восстановления солей Au (III). Иммобилизация НЧЗ на поверхности носителя приводит к увеличению площади поверхности и образованию слоя золота, который можно использовать для дальнейшей модификации лигандами. Серосодержащие вещества образуют на поверхности золота самоорганизованные монослои тиолятов за счет образования прочной ковалентной связи Au-S. Достоинством данной модификации является то, что она позволяет быстро и без специального оборудования получать однородные пленки на поверхности с заданными свойствами. Варьирование природы серосодержащих соединений позволяет синтезировать сорбенты, подходящие для конкретных аналитических задач.

В жидкостной хроматографии обычно отдают предпочтение силикагелевым носителям. Тем не менее, неподвижные фазы на основе диоксида кремния имеют недостаток, силикагель легко гидролизуются в условиях с высокими значениями pH.

Традиционно органические полимеры являются альтернативными субстратами в качестве неподвижной фазы для жидкостной хроматографии, поскольку они могут переносить широкий диапазон pH. Наиболее распространенным органическим полимером, применяемым для жидкостной хроматографии, является сополимер стирола и дивинилбензола (ПС-ДВБ).

Отдельной важной задачей является разработка так называемых хиральных неподвижных фаз, предназначенных для разделения энантиомеров, что особенно важно для фармацевтики. Хорошо известно, что энантиомеры многих основных лекарственных средств обладают различной фармацевтической активностью. В настоящее время многие лекарственные средства, имеющие хиральные центр(ы), продаются в виде рацемических смесей. Получение чистых оптических изомеров не является тривиальной задачей. По этой причине разделение энантиомеров является важной частью органического синтеза и медицинской химии. Высокоэффективная жидкостная хроматография широко используется для разделения и количественного определения различных классов органических соединений, включая оптические изомеры. В последнем случае успешное разделение энантиомеров требует использования хроматографических систем, содержащих так называемые хиральные селекторы, то есть вещества, обладающие оптической активностью, в подвижной или неподвижной фазах. Для минимизации использования дорогих хиральных селекторов практичнее использовать их в иммобилизованной форме. Соответствующие адсорбенты называются хиральными неподвижными фазами (ХНФ), а режим разделения получил название хиральной ВЭЖХ. Не существует универсальной ХНФ, позволяющей разделить все возможные энантиомеры различных лекарств, поэтому есть множество различных типов неподвижных фаз, разработанных или настроенных на разделение конкретных энантиомеров или групп энантиомеров. Следовательно, существует большой спрос на новые селективные ХНФ, но, как правило, синтез новых ХНФ представляет собой сложную исследовательскую задачу, особенно на стадии иммобилизации хиральных селекторов на поверхность подходящего субстрата. Перспективным вариантом закрепления хиральных селекторов на хроматографических носителях без сложного многостадийного синтеза может быть использование НЧЗ.

Цель работы – разработка новых хроматографических сорбентов для ВЭЖХ на основе наногибридных полимерных материалов с наночастицами золота и их применение для разделения органических соединений различных классов, в том числе оптически активных лекарственных средств.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- разработать метод иммобилизации наночастиц золота, стабилизированных различными органическими лигандами, на поверхность матрицы ПС-ДВБ с различными характеристиками площади поверхности, степени сшивки, размером пор;
- разработать метод синтеза наночастиц золота, стабилизированных макроциклическими антибиотиками эремомицином, ванкомицином;
- исследовать строение синтезированных сорбентов физико-химическими методами;
- исследовать синтезированные полимерные наногибридные сорбенты в качестве неподвижных фаз в ВЭЖХ для разделения разных классов органических соединений;
- изучить разделение оптически активных соединений на полученных полимерных наногибридных сорбентах методом ВЭЖХ;
- провести анализ лекарственных препаратов на синтезированных неподвижных фазах.

Научная новизна

Научная новизна работы заключается в получении новых полимерных наногибридных сорбентов с наночастицами золота и их применении для ВЭЖХ.

Предложен способ функционализации полимерных матриц ПС-ДВБ наночастицами золота, стабилизированными различными лигандами. Впервые синтезированы полимерные наногибридные сорбенты ПС-ДВБ с НЧЗ, с аминокислотами L-лизином и L-цистеином. Установлены закономерности

удерживания на полученных неподвижных фазах групп органических веществ, входящих в состав лекарственных средств.

Разработан и оптимизирован синтез наночастиц золота, стабилизированных макроциклическими антибиотиками эремомицином и ванкомицином, с использованием двух подходов: первый – путём восстановления HAuCl_4 напрямую макроциклическим антибиотиком при нагревании; второй – с добавлением триэтиламина к смеси HAuCl_4 и антибиотика при комнатной температуре.

Оптимизированы условия сорбции HCl_3 , стабилизированных эремомицином ($\text{HCl}_3\text{Э}$), на полистирол-дивинилбензольные матрицы с различными характеристиками. Впервые синтезированы и использованы в качестве неподвижных фаз для ВЭЖХ полимерные наногибридные сорбенты с $\text{HCl}_3\text{Э}$. Установлены закономерности удерживания на синтезированных сорбентах различных групп веществ – нитроанилины, ароматические углеводороды, профены, β -блокаторы, аминокислоты и их производные. Показано, что сорбент ПС-ДВБ с $\text{HCl}_3\text{Э}$ возможно использовать в вариантах обращённо-фазовой и гидрофильной хроматографии. Показана энантиоселективность сорбента ПС-ДВБ, модифицированного $\text{HCl}_3\text{Э}$, к различным классам соединений.

Практическая значимость

Предложенный подход синтеза наногибридных полимерных сорбентов с ПС-ДВБ и HCl_3 , стабилизированных различными лигандами, позволяет получить новый класс хроматографических сорбентов различного предназначения в зависимости от свойств лигандов.

Предложенный способ закрепления хиральных селекторов через наночастицы золота позволяет упростить синтез хиральных неподвижных фаз по сравнению с коммерчески доступными.

Полимерная матрица устойчива в широком диапазоне pH, что открывает возможности работы с экстремальными подвижными фазами. Показана возможность экспрессного разделения смеси β -блокаторов в условиях сильнощелочной среды на сорбенте ПС-ДВБ с HCl_3 .

Предложен подход экспрессного определения энантиомеров профенов, входящих в состав лекарственных средств, на сорбенте ПС-ДВБ с НЧЗ, стабилизированными липоевой кислотой с привитым L-лизином.

Проведен анализ энантиомерного состава лекарственного средства «Кетонал» содержащий в своем составе действующее вещество кетопрофен.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методы синтеза наночастиц золота с макроциклическими антибиотиками эремомицином и ванкомицином путём восстановления HAuCl_4 напрямую макроциклическим антибиотиком при нагревании или с добавлением триэтиламина к смеси HAuCl_4 и антибиотика при комнатной температуре позволяют получить стабилизированные НЧЗ размером 15-20 нм.
2. Результаты комплексного исследования синтезированных сорбентов физико-химическими методами (методы спектроскопии диффузного отражения (ДО), низкотемпературной адсорбции азота, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), элементного анализа) позволяют подтвердить модифицирование исходного ПС-ДВБ; отметить, что большее покрытие наночастицами золота осуществляется для матриц с большим диаметром пор и меньшим размером частиц; показать, что частицы получаемых сорбентов имеют размер 3-6 мкм сферическую форму, площадь функциональной поверхности 300-600 м²/г, что делает их подходящим материалом для хроматографических колонок в ВЭЖХ.
3. Разработанный способ синтеза нового наногибридного сорбента на основе микрочастиц сополимера стирола и дивинилбензола с наночастицами золота, стабилизированными липоевой кислотой с привитым L-лизином, позволяет легко функционализировать полимерную матрицу и приводит к увеличению площади поверхности сорбента по сравнению с исходным ПС-ДВБ.
4. Исследование хроматографических свойств неподвижной фазы и влияния состава подвижной фазы на удерживание нитроанилинов, профенов, β -блокаторов и других биологически активных веществ на сорбенте ПС-ДВБ с НЧЗ, стабилизированными липоевой кислотой с привитым L-лизином,

позволили провести анализ смеси шести β -блокаторов за 14 минут, разделить диастереомеры новых биологически активных производных спироиндолинонов, достичь экспрессного разделения энантиомеров профенов с селективностью 1.28-1.45 в условиях ОФ ВЭЖХ.

5. Способ закрепления эремомицина и ванкомицина на полимерной матрице посредством наночастиц золота позволяет упростить синтез неподвижных фаз с макроциклическими антибиотиками и получить хроматографические сорбенты, подходящие для обращённо-фазового и гидрофильного вариантах хроматографии.
6. Исследование хроматографических свойств неподвижной фазы и влияния состава подвижной фазы на удерживание профенов, β -блокаторов, аминокислот и их производных на сорбентах ПС-ДВБ с НЧЗ, стабилизированными эремомицином, позволили провести разделение смеси четырёх профенов за 10 минут и смеси четырёх β -блокаторов за 15 минут, разделить энантиомеры исследованных веществ, провести анализ энантиомерного состава лекарственного препарата.

Степень достоверности полученных результатов исследований обеспечивалась использованием реагентов высокой степени чистоты и стандартных веществ, анализом экспериментальных наблюдений, выполненных современными методами исследования, применением современного хроматографического и спектрального оборудования, а также данными результатов практической апробации.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует 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 лекарственных препаратов.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на следующих конференциях:

2022 год: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», Москва, Россия, 11-22 апреля 2022; XXV Всероссийская конференция молодых ученых-химиков с международным участием, Нижний Новгород, Россия, 19-21 апреля 2022.

2021 год: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2021», Москва, Россия, 12-23 апреля 2021; VI Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, Краснодар, Россия, 26 сентября - 2 октября 2021.

2020 год: IV Всероссийская Конференция с международным участием "Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез", Краснодар, Россия, 27 сентября - 3 октября 2020.

2019 год: XI Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «ЭКОАНАЛИТИКА-2019», Пермь, Россия, 27 мая - 1 июня 2019; XI International Conference on Chemistry for Young Scientists "Mendeleev 2019", Санкт-Петербург, Россия, 9-13 сентября 2019.

2018 год: 32nd International Symposium on Chromatography, ISC-2018, Мандельё-Канны, Франция, 23 сентября - 27 октября 2018; V Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, Краснодар, Россия, 7-13 октября 2018.

2017 год: III Всероссийская Конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием, г. Краснодар, Россия, 21-27 мая 2017.

Публикации. По результатам проведённого исследования опубликовано 15 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ, представлено 10 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключался в поиске, систематизации и анализе данных литературы по теме работы, планировании, постановке и проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, а также в подготовке к публикации результатов проведенных

исследований. Представленные результаты исследования получены лично автором или под его руководством. Элементный анализ сорбентов проводил к.х.н., н.с. А. В. Гармай. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю, за исключением работы [Чикурова, Н. Ю., Просунцова, Д. С., Ставрианиди, А. Н., Староверов, С. М., Ананьева, И. А., Смоленков, А. Д., Чернобровкина, А. В. // Журнал аналитической химии. 2023. Т. 78. № 5. С. 1–14.], в которой вклад автора состоял в выполнении части экспериментов, подготовки результатов к публикации.

Структура и объём работы. Представленная диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, общих выводов, списка использованных сокращений и списка использованной литературы. Материал диссертационной работы изложен на 179 страницах машинописного текста, содержит 96 рисунков и 42 таблицу, в списке цитируемой литературы 133 наименований.

1 Наноматериалы в жидкостной хроматографии

Термин «наноматериалы» обычно связывают со структурами размером от 1 до 100 нм, обуславливающим их уникальные химические, физические и электрические свойства [1]. Нанотехнологии активно применяют в различных областях науки, особенно большой скачок в развитии они принесли в инженерию, материаловедение, химию и биохимию. Можно говорить о влиянии нанотехнологий почти на каждую отрасль современной науки и техники. В аналитической химии наноматериалы активно применяют в области спектроскопии, для создания биохимических датчиков (в том числе для биомедицинской диагностики), в масс-спектрометрии и для пробоподготовки [2]. Не стали исключением и методы разделения в аналитической химии [3, 4]. В методах разделения наночастицы (НЧ) нашли применение для создания широкого спектра новых сорбентов, обладающих исключительными преимуществами с точки зрения эффективности разделения, селективности и разрешающей способности [5, 6]. До настоящего времени использование наноразмерных материалов в электродиффузионных методах разделения, таких как капиллярный электрофорез и капиллярная электрохроматография, привлекло больше внимания, чем в системах с ламинарным потоком: жидкостной и газовой хроматографии (ЖХ и ГХ) [7]. Однако в последние десятилетия интерес к возможностям наноматериалов и в этих методах возрастает – в частности, в высокоэффективной жидкостной хроматографии [8, 9, 10].

Можно выделить несколько основных причин перспективного использования наночастиц для разработки новых неподвижных фаз.

НЧ имеют высокое отношение площади поверхности к объему, что позволяет создавать сорбенты с более развитой поверхностью. Чем меньше размер наночастиц, тем выше адсорбционная площадь поверхности полученных материалов. Для непористых наночастиц сферической формы с диаметром d_p (мкм) удельная поверхность S (м²/г) может быть рассчитана как $S = 6/\rho d_p$, где ρ (г/см³) - плотность твердого наноматериала [9]. По общепринятому определению максимальный размер частиц, который может считаться наноразмерным, составляет 100 нм или 0.1 мкм, при использовании этого значения как d_p и плотности ρ , например, у золота она составляет

19.3 г/см³, можно оценить площадь поверхности S соответствующих наночастиц золота как 3.1 м²/г.

НЧ относительно легко могут быть синтезированы однородными по размеру, что позволяет создавать неподвижные фазы с более однородной поверхностью. Это особое преимущество по сравнению с нанопористыми материалами, для которых требуется сложный синтез матрицы.

Свойства НЧ можно контролировать, изменяя их размер и форму. Это может быть достигнуто путем варьирования условий, используемых для синтеза НЧ.

НЧ благодаря уникальным адсорбционным свойствам обладают способностью изменять селективность определения веществ.

Поверхность сорбентов может быть легко модифицирована для получения заданных свойств с помощью широкого спектра различных функциональных групп, наиболее популярными на сегодняшний день являются аминогруппы (NH₂), тиолы (SH) и карбоксилы (COOH). Ковалентное закрепление органических лигандов на поверхности НЧ позволяет добиться стабильности такого сорбента, не теряющего своих свойств в процессе работы.

Использование НЧ в качестве покрытия матрицы позволяет изменять её механические свойства и химическую устойчивость.

В методах разделения были исследованы различные наночастицы и наноструктуры, включая фуллерены, нанотрубки, НЧ диоксида кремния, полимерные НЧ, НЧ углерода, цеолиты, липиды, латексы, НЧ диоксида титана и другие металлоксиды, молекулярно-импринтированные полимеры, молекулярные мицеллы и дендримеры, а также НЧ серебра и золота [6, 3, 11].

В жидкостной хроматографии наночастицы чаще всего применяют для создания неподвижных или псевдонеподвижных фаз [12, 13]. Наиболее подробно изучены неподвижные фазы с углеродными наночастицами. Для модифицирования используют фуллерены, наноалмазы, углеродные нанотрубки (УНТ) и НЧ. Углеродные нанотрубки были исследованы в качестве неподвижной фазы в ВЭЖХ [14]. Также есть примеры использования набивных колонок с многослойными УНТ для работы в обращённо-фазовом режиме ВЭЖХ [15]. В работе [16] использовали 3-аминопропилсиликагель, модифицированный монослоем УНТ в качестве неподвижной фазы для разделения полиароматических углеводородов (ПАУ). Результаты показали, что УНТ сильнее

взаимодействуют с ароматической группой. Монослойные УНТ могут также усиливать энантиоселективность, например, трисфенилкарбамата целлюлозы [17]. Авторами [18] было достигнуто разделение в ВЭЖХ изомеров полихлорированных бифенилов (ПХБ) и терпенов (линалоол, гераниол, тимол, терпинеол) путем иммобилизации функционализированного аминогруппой монослоя УНТ на поверхность аминопропил-силикагеля.

Силикагель с привитым фуллереном C₆₀ был использован для разделения нейтральных молекул [19]. Исследование показало, что модифицированные таким образом сорбенты обладают уникальными возможностями молекулярного распознавания, а также сильными стерическими взаимодействиями с нейтральными молекулами (ПАУ, ПХБ, хининов). В сравнении со стандартными обращенными неподвижными фазами для ВЭЖХ (например, с привитым C₁₈) фуллерены более селективны.

В литературе есть пример использования НЧ диоксида кремния для ВЭЖХ [20]. Был использован одностадийный золь-гель процесс для синтеза кремнийорганических НЧ. Синтезированная фаза показала отличную химическую стабильность и быстрое разделение аналитов с высокой эффективностью. Другой пример - применение НЧ диоксида циркония. Они взаимодействуют с микросферами силикагеля с образованием самоорганизующихся монослоев [21]. Модификация повышает химическую стабильность силикагеля, устраняя один из главных его недостатков.

В работе [22] получен новый композитный материал типа ядро-оболочка, состоящий из микросфер кремнезема в качестве ядра и наночастиц диоксида титана в качестве поверхностного покрытия. Материал был приготовлен методом жидкофазного осаждения. Авторы показали, что полученный композит типа ядро-оболочка позволяет получить более эффективное и селективное разделение моно- и мультифосфопептидов, чем коммерчески доступные сферы оксида титана без какого-либо модификатора. Материал показал благоприятные характеристики для ВЭЖХ, в том числе узкое распределение пор по размерам, большую площадь поверхности и объем пор. Композит типа ядро-оболочка позволил эффективно разделять соединения аденозинфосфата благодаря кислотно-основному взаимодействию Льюиса между двуокисью титана и фосфатной группой при использовании в качестве НФ для ВЭЖХ. Покрытие сфер силикагеля диоксидом титана способствует закрытию силанольных

групп на поверхности силикагеля, что даёт возможность применения НФ в условиях экстремальных pH.

Предложен новый материал на основе диоксида кремния, покрытого наночастицами оксида алюминия, для использования в качестве хроматографической подложки для обращённо-фазовой ВЭЖХ [23]. Наночастицы оксида алюминия были синтезированы с помощью золь-гель процесса в обращенных мицеллах, состоящих из бис(2-этилгексил)сульфосукцината натрия, а материал носителя был сформирован путем самосборки слоев оксида алюминия на сферах силикагеля. Силикагель после включения оксида алюминия сохраняет морфологические свойства исходного силикагеля, необходимые для хроматографических целей. Исследования стабильности показали, что чистый силикагель показал высокую степень растворения (83%), в то время как алюминизированный кремнезем оставался практически неизменным (99%) после пропускания одного литра щелочной подвижной фазы, что указывает на его высокую стабильность в щелочных условиях. На основе матрицы алюминизированного силикагеля приготовлена обращённо-фазовая НФ с привитой группой C18, которая имеет хорошие перспективы для использования в ВЭЖХ для разделения тестовых соединений в обращённо-фазовом режиме.

В работе [24] сравнивается удерживание 40 ароматических соединений, включая пиридины, фенолы, анилины, бензойные кислоты и другие, на синтезированных неподвижных фазах: меркаптопропилсиликагеле (Si-RSH) и меркаптопропилсиликагеле, покрытыми наночастицами серебра диаметром 2 нм, меркаптопропил-функционализированном силикагеле с НЧ серебра диаметром 2 нм (Si-RSH-AgNP). Большинство аналитов сильнее удерживались на Si-RSH-AgNP, что связано с небольшим (5,9%) увеличением площади поверхности исходного Si-RSH после покрытия наночастицами серебра и в основном за счет специфических взаимодействий с НЧ серебра. Для обеих хроматографических фаз выявлены умеренные гидрофобные и водородные связи, в то время как на колонке Si-RSH-AgNP наблюдалось гораздо более сильное удерживание ароматических оснований (пиридины, анилины) за счет донорно-акцепторных взаимодействий. Анализ графиков ортогональности, полученных для разных классов соединений, показывает также существенную разницу в механизме удерживания бензойных кислот, а также отсутствие корреляции для неионогенных соединений. Таким образом исследование

демонстрирует возможность использования колонки, покрытой НЧ серебра, для селективного выделения и разделения различных биомолекул, включая пептиды, белки, нуклеотиды и другие.

Для получения неподвижных фаз жидкостной хроматографии используют также другие типы углеродных наночастиц (углеродные нанотрубки, графен, углеродные точки) [25], оксидов металлов (диоксид титана, оксид алюминия, цирконий, оксиды железа) [4], гидроксиапатитов [26], латексов [27] и наночастиц металлов [28].

2 Наночастицы золота в хроматографических методах анализа

НЧЗ являются наиболее изучаемыми и популярными НЧ [29]. Частица коллоидного золота представляет собой мицеллу следующего вида: $\{[Au]_m(AuCl_4)^-(n-x)H^+[xH^+]\}^{x-}$. На поверхности кристаллического кластера $[Au]_m$ адсорбированы ионы $AuCl_4^-$, то есть частица несёт отрицательный заряд. Наиболее частый способ получения НЧЗ путём восстановления $HAuCl_4$. В качестве химических восстановителей используют различные органические и неорганические соединения (формальдегид, этанол, белый фосфор, аскорбиновая кислота, боргидрид натрия и др.) [30]. Литературные данные также демонстрируют возможность получения НЧЗ с использованием синтетических полимеров, биополимеров и малых биомолекул как в сочетании с другими восстановителями, так и в качестве единственных восстановителей и, одновременно, стабилизаторов наночастиц. В настоящее время восстановление может проводиться как в водных растворах, так и в органических растворителях [31]. Развиваются подходы зелёной химии по получению НЧЗ [32]. Способ получения сферических НЧЗ заданного размера путём восстановления $HAuCl_4$ цитрат-ионами в водном растворе получил название метод Туркевича и является наиболее популярным [30, 31].

У НЧЗ следует отметить ряд достоинств: они химически стабильны, нетоксичны, хорошо поглощают и рассеивают свет, биосовместимы [33]. Золото - инертный металл, с ним можно спокойно работать в открытом виде, так как он не взаимодействует с кислородом воздуха и большинством химических реагентов. Ещё одним преимуществом является лёгкость получения коллоидного золота [34]. НЧЗ могут быть легко функционализированы. Связывание молекул с поверхностью золота может быть

достигнуто путем физической сорбции или за счет хемосорбции. Частицы золота могут быть функционализированы молекулами, которые «переворачивают» отрицательный поверхностный заряд НЧЗ на положительный. Частицы также могут быть функционализированы для получения реакционноспособных групп (например, поверхностей с концевыми амино- или карбоксигруппами). Цитрат слабо связывается с поверхностью наночастиц и часто используется в качестве стабилизирующего агента при синтезе, он обеспечивает долговременную стабильность и легко замещается рядом других молекул, включая амины, полимеры, биомолекулы [33]. НЧЗ спонтанно реагируют с тиолами без каких-либо побочных реакций с образованием высокоупорядоченных и плотно упакованных монослоев. Связывание происходит путем самосборки. Прочные ковалентные связи Au-S обеспечивают высокую стабильность таких модификаторов [35]. Во-многом благодаря этому факту НЧЗ столь популярны.

НЧЗ нашли своё применение в области медицины, биологии и спектроскопических методах [29, 30, 33, 34, 36]. Широко развито их использование для создания биологических и высокоэффективных химических датчиков [37, 38]. НЧЗ используют в катализе, очистке воды, для определения катионов тяжелых металлов, анализа белков и ДНК, при анализе ферментативной активности, в клеточном анализе [29, 39]. В хроматографических методах анализа (газовая хроматография, капиллярная электрохроматография, капиллярная жидкостная хроматография) НЧЗ используют для создания неподвижных и псевдонеподвижных фаз, что способствует высокой эффективности разделения аналитов и появлению новых селективных свойств [40, 41, 32].

Рассмотрим подробнее применение НЧЗ в вариантах ВЭЖХ.

2.1 Несвязанные НЧЗ в методах ВЭЖХ

Опубликованы работы по использованию несвязанных НЧЗ. В работе [28] авторы использовали золотые микросферы размером 3.5 мкм, стабилизированные н-октадекантиолом, как замену материалов на основе диоксида кремния в качестве неподвижной фазы для ВЭЖХ. Синтезированный сорбент исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Микрочастицы золота монодисперсны и в основном имеют сферическую форму с диаметром 3.5 мкм.

Удельная площадь поверхности частиц золота, рассчитанная с использованием стандартного метода Брунауэра-Эмметта-Теллера (БЭТ) по данным адсорбции, составляет 49.4 м²/г. Средний диаметр пор составляет 4.8 нм (рис.1).

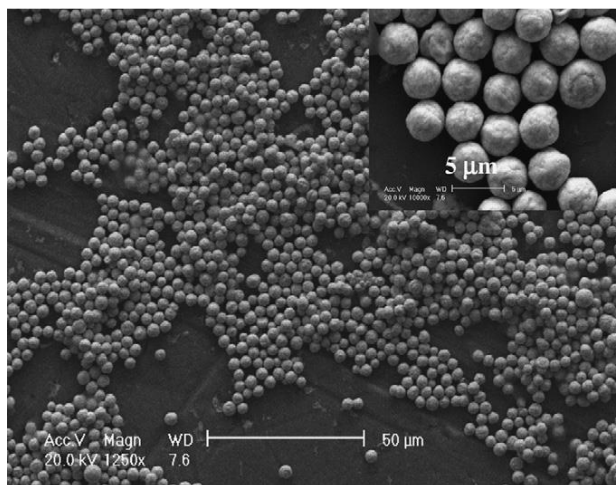


Рис. 1. Микрофотография микросфер золота, стабилизированных н-октадекантиолом, полученная методом СЭМ [15].

Вклад микросфер золота в разделение оценивали на капиллярной колонке, заполненной немодифицированными частицами золота с использованием тестовой смеси урацила и нафталина. На этой неподвижной фазе компоненты смеси не разделялись. Дальнейшее исследование проводили на колонке, заполненной НЧЗ, стабилизированными н-октадекантиолом. Пять веществ (урацил, бензол, нафталин, 2-метилнафталин, аценафтен) были исследованы на подвижных фазах с варьируемым содержанием метанола от 70 до 85 (об. %) в воде (рис.2). Эффективность разделения возрастала по мере снижения концентрации метанола, а порядок элюирования оставался неизменным. Наилучший результат получен для 75 об. % МеОН. Исследуемые вещества имеют более низкие факторы ёмкости по сравнению с коммерческой колонкой с октадецилсиланом, что может быть связано с низкой степенью покрытия золотых микросфер C18 (0.55 масс. %). Как отмечают авторы, это произошло вследствие неполного гидролиза при синтезе гуммиарабика, который образовывал тонкий слой на поверхности золота, что мешало реакции н-октадекантиола с поверхностью золота.

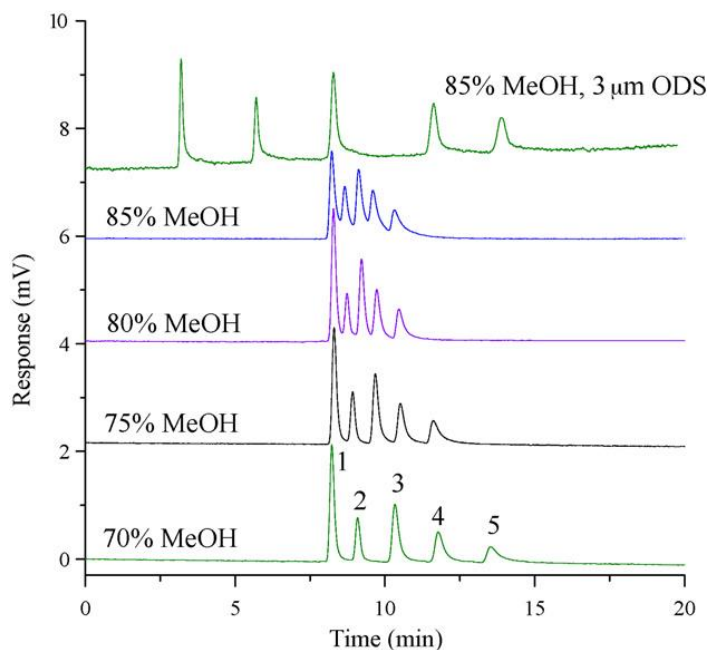


Рис. 2. Хроматограммы, демонстрирующие влияние соотношения MeOH/H₂O (об. %) в подвижной фазе при разделении ароматических углеводов. Колонка: 45 см (эффективная длина 25 см) × 100 мкм I.D. – капилляр, заполненный микросферами золота 3.5 мкм, модифицированными н-октадекантиолом. Подвижная фаза: метанол-вода. Расход: 245 нл / мин. Обнаружение: УФ 254 нм. Пики: (1) урацил; (2) бензол; (3) нафталин; (4) 2-метилнафталин; (5) аценафтен [28].

Фактор удерживания (k') веществ снижается при увеличении концентрации метанола, что говорит об обращено-фазовом механизме удерживания. Однако, нелинейность графиков зависимости логарифма коэффициента удерживания от добавки метанола свидетельствует о дополнительных стерических взаимодействиях для ПАУ.

Также были исследованы основные вещества (анилин, *n*-толуидин, толуол, этилбензол). Для них наблюдали несимметричные пики. Этот результат указывает на то, что поверхность C18-Au отрицательно заряжена, что вызывает вторичные взаимодействия с основными соединениями и приводит к увеличению их удерживания и размытию пиков.

Авторами изучена химическая стабильность микросфер C18-Au путем пропускания подвижной фазы MeOH:NaOH (pH 12) (80:20 об.%) в течение 140 ч. Периодически получали хроматограммы тестируемых веществ на ПФ MeOH:H₂O (75:25, об.%), предварительно кондиционировав колонку в течении 30 мин. Результаты показали, что сорбент стабилен в сильно щелочной среде, так как хроматографические параметры тестируемых веществ заметно не изменялись. Преимуществом такой

неподвижной фазы может быть ее стабильность в широком диапазоне pH, механическая стабильность и, особенно, простота и универсальность химических модификаций.

НЧЗ в ВЭЖХ могут применяться не только в качестве новых сорбентов для набивных колонок. Другой пример использования несвязанных НЧЗ, модифицированных пеницилламином, – энантиселективное определение ментона, хирального соединения, содержащегося в маслах мяты и герани [43]. Как правило, хиральные соединения определяют методом жидкостной хроматографии на хиральных неподвижных фазах с использованием УФ-детектирования. Однако такие колонки являются весьма дорогостоящими, а образцы требуют трудоемкой пробоподготовки. Предложен альтернативный подход, который включает использование детектора кругового дихроизма для прямого определения оптической чистоты и использования модифицированных НЧЗ для достижения соответствующей селективности и чувствительности.

НЧЗ были модифицированы рацемической смесью пеницилламина и энантиомерно чистым D- и L-пеницилламином. Было выбрано это вещество, поскольку тиолы способны хорошо адсорбироваться на поверхности золота. Тиольная группа пеницилламина депротонируется, образуя с золотом прочную тиолятную связь, причем дополнительное взаимодействие с поверхностью идет через аминогруппу.

В этой работе наглядно продемонстрирован потенциал модифицированных НЧЗ для усиления сигнала дихроизма и повышения чувствительности при энантиоселективном определении ментонов. Отделение ментонов от других аналитов, присутствующих в масляных экстрактах перечной мяты, проводили с использованием метода ВЭЖХ. Элюирование проводили в изократическом режиме с использованием подвижной фазы, содержащей смесь $C_2H_5OH : H_2O$ (60:40, об.%). После выхода из колонки энантиомеры ментона смешивались в системе непрерывного потока с растворами НЧЗ и подавались в детектор. Сигнал детектирования усиливался в ряду: свободные энантиомеры ментона < энантиомеры в присутствии НЧЗ < энантиомеры в присутствии НЧЗ, модифицированных пеницилламином. Наибольший сигнал наблюдался для энантиомеров ментона в присутствии НЧЗ, модифицированных рацемической смесью DL-пеницилламина.

2.2 Сорбенты, модифицированные НЧЗ, в методах ВЭЖХ

НЧЗ широко используются не только как самостоятельные частицы, но и как составные части многочисленных материалов, полученных путем связывания их с веществом-носителем. Эти материалы обладают всеми уникальными химическими и физическими характеристиками наночастиц наряду с преимуществами матрицы. Использование микроструктур, содержащих иммобилизованные наночастицы, более практично, чем свободные наночастицы, поскольку частицы, прикрепленные к носителю, приобретают дополнительную стабильность благодаря сниженной подвижности.

Силикагель является отличным выбором среди различных типов матриц, используемых для создания неподвижных фаз в ВЭЖХ. Это объясняется рядом преимуществ, которыми он обладает, включая механическую стабильность, узкий диапазон размеров частиц, относительно высокую удельную поверхность и объем пор. Следовательно, разработка новых усовершенствованных сорбентов на основе силикагеля, наряду с повышением их эффективности, стабильности и экономичности, стала одним из основных направлений в современной хроматографии. Так, покрытие силикагеля НЧЗ, позволит увеличить поверхность адсорбции, откроет новые возможности для модификации, расширит диапазон рН, в котором можно будет работать с сорбентом [44].

2.3 НЧЗ на носителе в варианте капиллярной ВЭЖХ

Чтобы объединить преимущества неподвижных фаз на основе силикагеля и НЧЗ, в работе [45] частицы диоксида кремния размером 1.3 мкм были синтезированы и покрыты наночастицами золота, модифицированными н-октадекантиолом. Данный сорбент использовали в качестве неподвижной фазы (НФ) для капиллярной жидкостной хроматографии и капиллярной электрохроматографии под давлением. Число теоретических тарелок на метр составило $6.1 \cdot 10^4$ по бензолу. Отрицательный наклон линейной зависимости $\log k'$ от содержания MeOH (об. %) в подвижной фазе (ПФ) метанол-вода указывает на то, что для неподвижной фазы C18-Au-SiO₂ характерен обращённо-фазовый механизм удерживания. Были исследованы полиароматические углеводороды: бензол, нафталин, 2-метилнафталин, аценафтен, а урацил использовали для определения мертвого времени удерживания

хроматографической колонки. Все вещества разделялись и элюировались в течение 38 мин в режиме ВЭЖХ. Аналогичные результаты были получены, когда смеси разделяли на стандартной колонке для ВЭЖХ с пористыми частицами октадецилсилана размером 5 мкм, что подтверждает модификацию золота октадекантиолом и обращено-фазовый механизм удерживания. Уменьшение времени удерживания аналитов с увеличением напряжения в варианте капиллярной электрохроматографии показало, что НЧЗ на поверхности силикагеля отрицательно заряжены. Об этом же можно судить, исходя из размытых пиков, полученных для основных веществ (анилин, 4-толуидин, кофеин, N,N-диметиланилин). Для проверки химической стабильности неподвижной фазы C18-Au-SiO₂ колонку промывали подвижной фазой MeOH / NaOH (pH 12) (70:30, об.) и MeOH / HCl (pH 1) (70: 30, об.) в течение 60 ч. Факторы емкости изученных веществ заметно не изменялись, что говорит о стабильности сорбента во всем диапазоне pH.

2.4 Использование в варианте колоночной ВЭЖХ

Колонки, заполненные зернами сорбента, являются наиболее часто используемыми для хроматографического разделения методом ВЭЖХ.

В качестве неподвижной фазы для разделения энантиомеров дансил-норвалина было исследовано использование силикагеля с НЧЗ и молекулами бычьего сывороточного альбумина (БСА). Для этого поверхность силикагеля была модифицирована 3-меркаптопропилтриметоксисиланом, затем НЧЗ и, наконец, пришивали БСА посредством 3-меркаптопропионовой кислоты, образуя амидные связи с молекулами БСА. Полученный сорбент адсорбировал 1.71 мг Au на 1 г SiO₂ и показал энантиоселективность при разделении энантиомеров дансил-норвалина. Способность БСА к энантиоселективному разделению дансил-норвалина сохраняется для данного способа иммобилизации. Оптимальное разделение энантиомеров (RS = 1.3) был достигнут с помощью подвижной фазы, состоящей из 95 об.% 30 мМ фосфатного буферного раствора с pH 7.4 и 5 об.% MeOH.

В работе [47] использовали стабилизированные хитозаном наночастицы для модифицирования силикагеля с целью разделения азотсодержащих соединений с помощью ВЭЖХ. Основной функцией наночастиц является иммобилизация хитозана на силикагеле, при этом учитывались и дополнительные полезные эффекты. Полученный сорбент на основе хитозана действует как полярная неподвижная фаза.

Наилучшая селективность для орто-, мета- и пара-нитроанилинов при наибольшей эффективности была достигнута на ПФ гексан-изопропанол. Удерживание аналитов увеличивалось при уменьшении полярности добавке к гексану. На удерживание нитроанилинов влияло положение заместителя, при этом орто-нитроанилин элюировался первым, за ним следовали мета- и пара-нитроанилины, что соответствует НФ механизму удерживания. Однако авторы также отмечают взаимодействие аналитов не только с иммобилизованным хитозаном, но и с незранированными силанольными группами силикагеля, вследствие чего эффективность колонки была относительно не велика (около 3000 тт на метр). Для дополнительного экранирования силанольных групп в ПФ осуществлялась добавка триэтиламина, что повышало эффективность колонки.

Авторы также исследовали поведение анилинов, аминопиридинов и их производных. Нитроанилины, содержащие метильные группы и атомы галогенов, элюировались с мёртвым объёмом. Для пиридинов положение аминогруппы в кольце влияет на удерживание, при этом 2-аминопиридин демонстрирует наименьшее удерживание, а 4-аминопиридин - наибольшее. Увеличение коэффициента емкости аминопиридинов хорошо коррелирует с полярностью исследуемых соединений. Исследовали также разделение триазолов и их оптических изомеров. Несмотря на свою гидрофобную природу, эти соединения удерживались на колонке благодаря своим структурным характеристикам. Число атомов хлора в бензольном кольце (молекулы с двумя атомами хлора удерживались сильнее) и жесткость молекул (более жесткие структуры имели более короткое время удерживания) играли определенную роль в удерживании. Как и при разделении анилинов и пиридинов, время удерживания триазольных фунгицидов уменьшалось с увеличением концентрации и полярности добавки. На исследуемой колонке пропиконазол и дифеноконазол элюировались двумя пиками, соответствующими двум стереоизомерам. Таким образом, на НФ с хитозан-стабилизированными наночастицами золота было достигнуто разделение полярных азотосодержащих соединений, а также некоторая энантиоселективность.

В литературе описаны сорбенты с НЧЗ, модифицированными и другими лигандами. Например, был синтезирован и подробно проанализирован наногибридный функциональный материал для ВЭЖХ, состоящий из наночастиц золота, стабилизированных L-цистеином [48]. По методу Туркевича были получены

наночастицы золота со средним размером 7-8 нм. Поверхностная концентрация золота составила 30-60 мкг/г силикагеля. Авторами работы было проведено сравнение удерживания нитроанилинов, аминопиридинов и их производных, а также триазольных пестицидов в НФ режиме на трёх сорбентах: силикагеле, силикагеле, модифицированном НЧЗ, стабилизированными цитрат-ионами и стабилизированными цистеином. В табл. 1 приведены коэффициенты емкости для нитроанилинов на трех исследованных сорбентах. На всех трёх сорбентах нитроанилины выходили в одинаковом порядке, в соответствии с НФ механизмом удерживания. Более полярным оказался силикагель, модифицированный наночастицами золота, стабилизированными цитрат-ионом, для него наблюдались наибольшие факторы удерживания нитроанилинов.

Таблица 1. Факторы удерживания нитроанилинов для исследованных сорбентов. Подвижная фаза: гексан/изопропанол (90/10, об. %). Спектрофотометрический детектор, $\lambda_{\text{макс}} = 230$ нм [48]

Сорбент	о-Нитроанилин	м-Нитроанилин	п-Нитроанилин
SiO ₂ – Au – L-цистеин	0.5	2.0	2.7
SiO ₂ – Au – цитрат	0.6	2.6	3.9
SiO ₂	0.6	1.9	3.1

Были протестированы также некоторые триазолы, время удерживания сорбатов увеличивалось в ряду диниконазол < тебуконазол < дифеноконазол < пенконазол. Авторы наблюдали некоторую энантиоселективность сорбентов, так как дифеноконазол элюировался двумя пиками, соответствующими двум стереоизомерам.

На силикагеле, модифицированном наночастицами золота и L-цистеином изучали разделение энантиомеров β -блокаторов в ПО режиме. Для получения наилучшего разделения варьировали добавку метанола, уксусной кислоты и триэтиламина в ацетонитрильную ПФ. Для разных β -блокаторов оптимальным был различный состав ПФ. Так, было достигнуто частичное разделение алпренолола и окспренолола ($\alpha = 1.16$ и 1.2 , соответственно) (рис. 3). Однако, повышение добавки триэтиламина и уксусной кислоты приводило к потере энантиоселективности к этим β -блокаторам, но появлялось частичное разделение энантиомеров пиндолола.

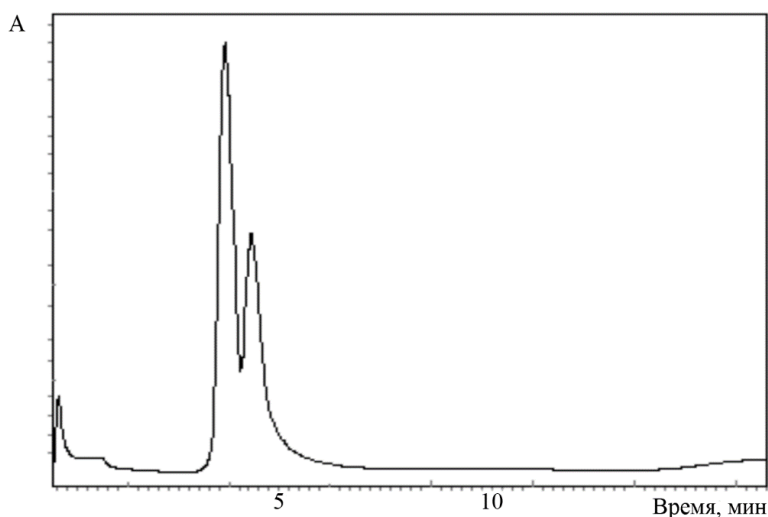


Рис. 3. Хроматограмма разделения пиндолола. Неподвижная фаза: $\text{SiO}_2\text{--Au--L-цистеин}$ (150×2.1 мм). Подвижная фаза: $\text{CH}_3\text{CN/MeOH/Et}_3\text{N/CH}_3\text{COOH}$ 95/5/0.1/0.05 об. %. Спектрофотометрический детектор, $\lambda_{\text{макс}} = 276$ нм [48].

Исследование, описанное в работе [49] продолжило изучение силикагеля, модифицированного L-цистеином, с акцентом на механизм связывания соединений. Был синтезирован сорбент с использованием метилового эфира цистеина вместо цистеина для оценки реакционной способности группы COOH- , и два сорбента были использованы для анализа моделей удерживания замещенных аминопиридинов, которые содержат пиридиновый атом азота и аминогруппу. Порядок удерживания аминопиридинов хорошо коррелировал с увеличением дипольного момента молекул, но не с изменением их pK_a . Для замещенных 2-аминопиридинов наоборот наблюдалась четкая корреляция между коэффициентом емкости и значениями pK_a : время удерживания увеличивалось с ростом pK_a . Галогензамещенные аминопиридины удерживались слабее из-за ослабления дисперсионных взаимодействий и образования водородных связей с поверхностью сорбента, что происходит из-за электроноакцепторной природы галогенов. Такой же эффект был отмечен для замещенных анилинов и пестицидов. Метилловый эфир L-цистеина является более полярным, в соответствии с НФ режимом удерживание аналитов было больше для сорбента с эфиром по сравнению с сорбентом с цистеином. Согласно квантово-механическому моделированию, основной вклад в удерживание молекул аминопиридина на $\text{SiO}_2\text{--Au--L-цистеине}$ вносят дисперсионные взаимодействия и образование водородных связей между водородом карбонильной группы цистеина и пиридиновым атомом азота сорбатов. Для сорбента с метилловым эфиром L-цистеина

идёт связывание аминопридинов по атому золота, что также приводит к увеличению удерживания аминопиридинов.

В работе [50] использовали модифицированный силикагель, содержащий наночастицы золота, стабилизированные L-цистеином, для разделения гидразина (Ги), метилгидразина (МГ) и 1,1-диметилгидразина (МДМГ) в виде производных с 2,3-нафталиндикарбокс-альдегидом (НДА). Для разделения использовалась фосфорная кислота с pH 2.5 с добавлением ацетонитрила (2-5 %). Наблюдали следующий порядок выхода соединений на данном сорбенте: НДА < НДМГ-НДА < Ги-НДА < МГ-НДА. На модифицированном силикагеле эффективность разделения всех производных была выше по сравнению с исходным силикагелем (рис.4). Однако наблюдалось некоторое размытие пика МГ из-за неполного покрытия поверхности силикагеля НЧЗ и наличия неэкранированных силанольных групп. Авторы продемонстрировали использование модифицированного НЧЗ силикагеля для определения гидразина и МГ в образцах окружающей среды на примере воды из озера Имандра.

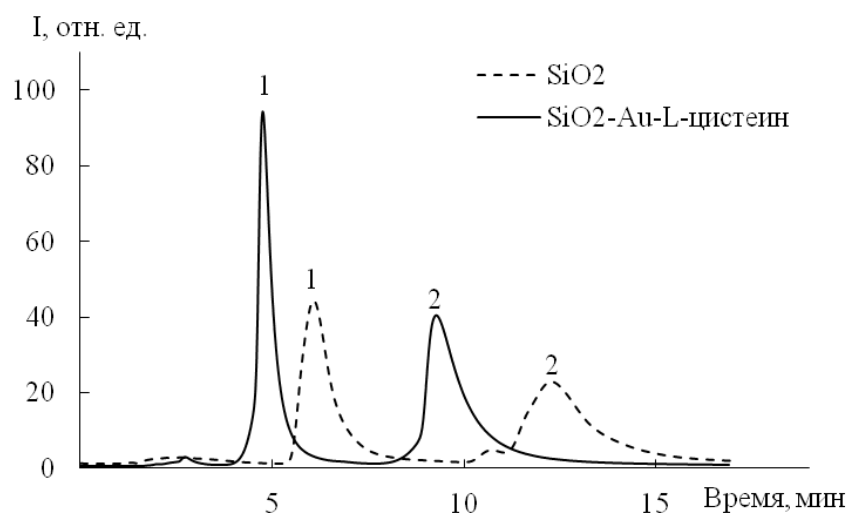


Рис. 4. Хроматограмма НДА-производных гидразина (1), МГ (2) и НДМГ (3). Подвижная фаза: 98% H_3PO_4 (10 мМ, pH 2.5) – 2% CH_3CN . Скорость потока 0.8 мл/мин. Флуоресцентный детектор, $\lambda_{\text{возб}} = 273$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 500$ нм. [50].

Предложена простая стратегия, основанная на самосборке наночастиц золота (размером 60–10 нм) на поверхности аминифункционализированных сфер пористого силикагеля в мягких условиях [51]. Полученный материал имел структуру ядро-оболочка, в которой НЧЗ были оболочкой, а сферы силикагеля - ядром. Затем к НЧЗ ковалентно присоединяли тиолированный β -циклодекстрин в качестве хирального селектора для энантиоразделения. Полученный сорбент оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение девяти пар энантиомеров

различных соединений было достигнуто с использованием новой хиральной неподвижной фазы в режиме обращённо-фазовой жидкостной хроматографии. Результаты показали, что новый ХНФ имеет более эффективное взаимодействие с аналитами из-за наличия НЧЗ на поверхности силикагеля, что приводит к более высокой скорости массопереноса по сравнению с колонкой с модифицированным силикагелем β -циклодекстрином. Кроме того, новая НФ также использовалась в жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия для разделения полярных соединений и соединений с высокой гидрофильностью.

В качестве матриц для НЧЗ в жидкостной хроматографии могут быть использованы не только силикагелевые. В [52] для создания сорбента проводили иммобилизацию НЧЗ на подложку оксида алюминия с последующей стабилизацией наночастиц молекулами цистеина. Полученный наногибридный материал был испытан в качестве неподвижной фазы в ВЭЖХ. Производные аминопиридинов были протестированы, чтобы понять свойства функциональных групп на поверхности. При увеличении полярности соединения удерживание возрастало. Авторы отмечают следующие преимущества полученного сорбента: простота синтеза сорбента, использование доступных коммерческих прекурсоров, стабильность и воспроизводимость результатов.

3 Нанокompозитные сорбенты на основе полимерной матрицы в жидкостной хроматографии

Из проанализированных выше работ видно, что модификация силикагеля НЧЗ дает целый ряд положительных эффектов, и эти сорбенты имеют хороший потенциал для применения в методах ВЭЖХ. Однако, такие неподвижные фазы обнаруживают мешающее влияние остаточных силанольных групп силикагеля. Полимеры наряду с силикагелем находят широкое применение в качестве неподвижных фаз в ВЭЖХ. Они обладают высокой химической, физической и термической стабильностью, их возможно синтезировать однородными по размеру, а также легко модифицировать, программируя нужные свойства. Полистирол-дивинилбензол является одним из наиболее распространённых полимеров, применяемых в жидкостной хроматографии. Новый подход, позволивший получить макропористые структуры, не набухающие в органических растворителях, впервые предложен В. А. Даванковым [53]. Жёсткие,

устойчивые в диапазоне pH 0-14, совместимые со 100% органическими фазами, полимерные частицы нашли широкое применение в хроматографических методах [54]. В литературе довольно много исследований полимеров в качестве матриц для закрепления наночастиц [55]. Причин этому несколько: полимерные цепи гибкие и могут содержать множество функциональных групп, что позволяет эффективно иммобилизовать наночастицы различными способами: посредством дисперсионных и Ван-дер-Ваальсовых сил, с помощью электростатических, водородных или ковалентных связей. Также для многих задач важен химический состав носителя, а полимерных платформ имеется практически неограниченное количество, от натуральных до синтетических. Гомополимеры, сополимеры и блочные полимеры могут быть синтезированы из нескольких мономеров и смесей мономеров различной природы. Кроме того, длина полимерной цепи и многочисленные комбинации мономеров, составляющих полимерные носители, могут варьироваться для оптимизации окончательной архитектуры полимерного материала и его характеристик. Иммобилизация металлических наночастиц на полимерные носители может быть достигнута с использованием двух методов. Первый – синтез *in situ* из иона металла, предварительно хелатированного на полимерном носителе, путем его восстановления непосредственно в полимерных цепях. В этом случае превращение ионов металлов в наночастицы может осуществляться либо только с полимерными цепями, играющими роль восстановителя, либо путем добавления любого восстановителя, например, NaBH_4 . Получение гибридного полимерного материала также может осуществляться путем иммобилизации готовых металлических НЧ посредством электростатических или химических взаимодействий. К настоящему времени многие типы функциональных неорганических наночастиц были иммобилизованы на полимерные микросферы с получением органических/неорганических композитных частиц. Такие материалы в последнее время активно изучаются и находят свое применение в различных областях науки. Не стали исключением и хроматографические методы анализа. Хуанг и др. получили новую неподвижную фазу для ВЭЖХ путём гибридизации полистирол-дивинилбензольных частиц с окисленными наноалмазами (ОНА) [56]. Добавление ОНА повышало механическую стабильность микросфер. Микросферы ПС-ДВБ-ОНА использовали в качестве неподвижной фазы в обращённо-фазовом варианте хроматографии для разделения шести производных бензола, таких

как толуол, бензальдегид, фенол, бензойная кислота, 1,4-гидрохинон и метил-*n*-гидроксibenзоат. В ходе дальнейшей модификации на основе ПС-ДВБ-ОНА получали анионит после дополнительной кватернизации метиламином и диглицидиловым эфиром 1,4-бутандиола. На полученной НФ в условиях ионной хроматографии разделяли смесь неорганических анионов, таких как F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} и SO_4^{2-} , до базовой линии. В ходе исследований показано, что гибридные микросферы ПС-ДВБ и окисленных наноалмазов можно использовать в качестве неподвижной фазы в жидкостной хроматографии при высоком давлении и экстремальных условиях pH.

Уист и др. показали применение микросферических частиц с углеродными ядрами и детонационными наноалмазами (ДНА) с оболочками, в качестве неподвижной фазы в ВЭЖХ [57,58]. Добавление ДНА повышало механическую стабильность и теплопроводность приготовленной неподвижной фазы типа ядро-оболочка. В работе [59] сообщается о получении полимерного монолитного сорбента с наночастицами платины, сгенерированными в мезопорах носителя. Pt-гибридные монолиты использовали для гидросилилирования терминальных алкенов с применением как периодических, так и непрерывных проточных условий.

3.1 Сорбенты на основе полимеров, модифицированных НЧЗ, для ВЭЖХ

Гибридная структура с полимерами позволяет наночастицам благородных металлов сохранять высокую устойчивость к агрегации. Ли и др. разработали простую и контролируемую стратегию получения композитных частиц, состоящих из полистирольных микросфер, модифицированных наночастицами благородных металлов (Au, Ag, Pt и Pd) с использованием эмульсии Пикеринга [60]. Метод позволяет легко и эффективно контролировать размер и покрытие поверхности НЧ на полистирольных микросферах.

Однако в литературе мало примеров использования полимерных матриц, модифицированных НЧЗ в ВЭЖХ. Одна из работ описывает применение в хроматографии композитной неподвижной фазы, включающей не только полимер [61]. Джанг с сотр. синтезировали новую цвиттер-ионную неподвижную фазу для хроматографии гидрофильного взаимодействия, обладающую большой гидрофильностью для увеличения удерживания гликопептидов и отделения их от

матрицы сложного состава. Оксид графена (GO) представляет собой новый нанопласт толщиной в один атом углерода с различными гидроксильными и эпоксидными группами на графитовой плоскости и карбоксильными группами на краях листа, что обеспечивает его отличную гидрофильность. Синтез композитного материала состоял из нескольких этапов. Во-первых, полиэтилеимин (PEI), катионный полимер, был закреплен на поверхности анионных нанослоев оксида графена путем электростатических взаимодействий, что позволило значительно улучшить гидрофильность GO. Во-вторых, поверхность GO-PEI была модифицирована НЧЗ методом их роста *in situ*, тогда как полиэтилеимин выступал в роли стабилизирующего агента и восстановителя. В завершение, L-цистеин (LCys), типичный цвиттерион, был закреплен на GO-PEI-Au путем образования самоорганизующихся монослоев по связи Au-S. Оптимальное время для иммобилизации L-цистеина – 24 ч. На рис. 5 показана схема синтеза композитного материала GO-PEI-Au-L-Cys.

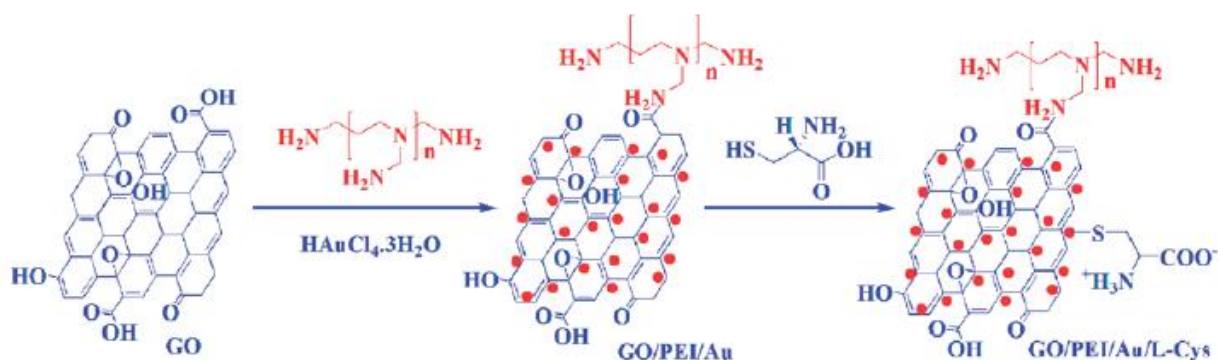


Рис. 5. Схема синтеза композитного материала GO-PEI-Au-L-Cys [23].

По расчётам метода рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС), в полученном композите 3.86 ммоль/г L-цистеина. Такое значительное количество L-цистеина может быть связано с большой площадью поверхности GO и обилием якорных НЧЗ. С помощью просвечивающего электронного микроскопа показано, что НЧЗ покрывают поверхность GO-PEI с высокой плотностью, а их средний диаметр – 15 нм. Полученный GO-PEI-Au-L-Cys далее использовали в качестве новой неподвижной фазы в хроматографии для обогащения гликопептидами. На рис. 6 показаны спектры, полученные с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации и времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) стандартных гликопротеинов до и после обогащения на композите GO-PEI-Au-L-Cys.

Как видно, после обогащения мешающие вещества почти полностью удаляются, и сигналы 14 гликопептидов с повышенной интенсивностью доминируют в спектрах МС.

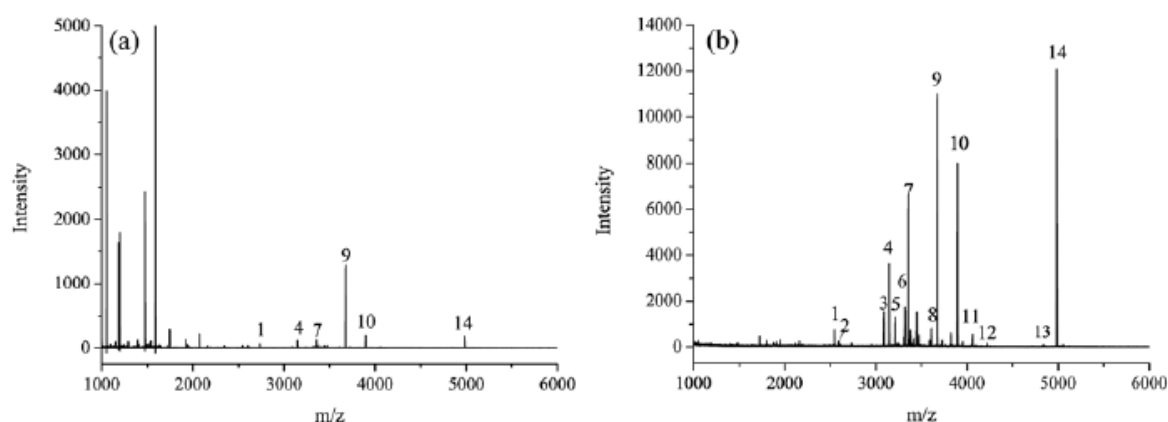


Рис. 6. Спектры MALDI-TOF MS (a) до и (b) после обогащения. Гликопептидные пики помечены цифрами [61].

В работе было проведено сравнение обогащения гликопептидами на GO, GO-PEI, GO-PEI-Au и GO-PEI-Au-L-Cys. Никакой селективности по отношению к гликопептидам путем обогащения на GO не было получено, что говорит о том, что сам по себе оксид графена недостаточно гидрофилен. После введения полиэтиленимина гидрофильность композита увеличилась и 5 гликопептидов были соответственно идентифицированы после обогащения на GO-PEI и GO-PEI-Au. Однако наибольшее обогащение гликопептидов наблюдается для GO-PEI-Au-L-Cys, что свидетельствует о его чрезвычайной гидрофильности за счет иммобилизации L-цистеина на большую поверхность НЧЗ.

В литературе встречается пример монолитных полимерных колонок с НЧЗ [62]. Разработанные пористые полимерные монолитные капиллярные колонки, модифицированные золотыми наночастицами, покрытыми заменяемыми функциональными группами, позволяют легко переключать режимы разделения с помощью простого процесса замены лиганда. Эти колонки получают из монолита сополимера глицидилметакрилата и этилендиметакрилата посредством реакции его эпоксидных фрагментов с цистеамином с получением монолита, богатого тиольными группами на поверхности. Наночастицы золота, полученные путем восстановления *in situ* золотохлористоводородной кислоты в колонке, прикрепляются к поверхности пор монолита. В качестве альтернативы раствор коллоидных наночастиц золота можно прокачать через модифицированную тиолом колонку для их прикрепления. Хотя

первый подход быстрее, он обеспечивает меньшее покрытие наночастицами, чем второй, при этом оба метода сохраняют превосходные гидродинамические свойства, типичные для монолитных колонок. Затем проводят функционализацию поверхности связанных наночастиц золота с использованием низкомолекулярных тиолсодержащих поверхностных лигандов. Динамический характер связи между золотом и этими поверхностными лигандами позволяет заменять один поверхностный лиганд другим посредством простого процесса замены раствора. Этот новый подход расширяет область применения монолитов, поскольку теперь одну колонку можно использовать в различных режимах разделения. Применение колонок с заменяемыми химическими лигандами продемонстрировано в варианте капиллярного электрохроматографического разделения пептидов и разделении белков методом жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) как в обращённо-фазовом, так и в ионнообменном режимах.

Одно из популярных направлений – создание капиллярных колонок с НЧ для разделения пептидов. Увеличивая благодаря наночастицам площадь поверхности колонки, можно получить лучшее разделение пептидов. В работе [63] поверхность пор монолитных капиллярных колонок из поли(глицидилметакрилата--этилендиметакрилата) функционализировали тиолами и покрывали наночастицами золота. Поверхность НЧЗ модифицировали одностадийным добавлением алкантиолов, меркаптоалкановых кислот и их смесей. Использование этих смесей позволило точно настроить гидрофобный/гидрофильный баланс свойств сорбентов. Количество иммобилизованных наночастиц золота по данным термогравиметрического анализа составило 44.8 масс. %. Композитная природа этих монолитных неподвижных фаз была продемонстрирована при разделении белков, которое могло быть достигнуто на одной и той же колонке с использованием условий градиентного элюирования, типичных для обращённо-фазовой и ионообменной хроматографии.

В работе [64] старались получить пористые полимерные монолиты с более плотным покрытием поверхности пор наночастицами золота. Монолит поли(глицидилметакрилат-этилендиметакрилат) подвергали взаимодействию с цистамином с последующим высвобождением тиоловых групп. Затем через функционализированные монолиты прокачивали суспензии наночастиц золота размером от 5 до 40 нм. Количество присоединенного золота зависит от размера

наночастиц, при этом максимальное связывание, составлявшее более 60 масс. %, достигается с наночастицами размером 40 нм. Поверхность связанного золота была функционализирована 1-октантиолом и 1-октадекантиолом, и эти монолитные колонки успешно использовали для разделения белков на обращенной фазе. Наилучшие разделения были получены при использовании монолитов, модифицированных наночастицами размером 15, 20 и 30 нм, поскольку эти размеры обеспечивали наиболее плотное покрытие золотом поверхности пор.

Разработана пористая полимерная монолитная капиллярная колонка, модифицированная наночастицами золота для селективного захвата цистеинсодержащих пептидов, для уменьшения сложности пептидных смесей, в протеомном анализе [65]. Колонку получают из богатого поверхностными тиольными группами монолита поли(глицидилметакрилат-этилендиметакрилат) после взаимодействия некоторых из его эпоксидных фрагментов с цистеамином. Проводили восстановление золотохлористоводородной кислоты в колонке для образования НЧЗ, прикрепленных к поверхности пор монолита. Этот процесс сохраняет превосходные гидродинамические свойства монолитной колонки, обеспечивая при этом средства для селективного удержания цистеинсодержащих пептидов из аналита благодаря их высокому сродству к золоту.

Пористая монолитная полимерная цвиттерионная колонка с гиперразветвленной структурой была синтезирована путем иммобилизации НЧЗ в слоистой структуре [66]. Комбинация сверхсшитого гидрофобного поли(4-метилстирол-винилбензилхлорид-дивинилбензола) с образованием гидрофильной слоистой структуры, включающей наночастицы золота, внедренные в полиэтилениминовый слой и функционализированные цистеином, позволило получить очень эффективные монолитные неподвижные фазы для разделения малых молекул в режиме хроматографии гидрофильного взаимодействия. Хроматографические характеристики этих гидрофильных монолитных колонн были продемонстрированы разделителем смесей нуклеозидов и пептидов. Эффективность колонки достигала 51 000 тт/м.

Единственный в литературе пример использования в ВЭЖХ в качестве неподвижной фазы полимерного сорбента, модифицированного наночастицами золота, представлен статьей [67]. Авторы разработали капиллярную колонку,

заполненную частицами полистирола диаметром 5 мкм, покрытыми НЧЗ, которые были модифицированы тиольными соединениями для создания различных вариантов неподвижных фаз. Также были проведены исследования различий в селективности для ароматических соединений на модифицированных тиолом частицах полистирола с золотым покрытием и на стандартном октадецилсилановом сорбенте.

Кобаяши с сотр. для упаковки хроматографической колонки в качестве матрицы использовали коммерческие частицы полистирола, покрытые наночастицами золота (диаметр 5 мкм). Для их модификации частицы выдерживали в течение часа в 60% азотной кислоте, затем промывали этанолом и дистиллированной водой в ультразвуковой ванне. После, частицы смачивали 24 часа при температуре 30°C раствором этанола, содержащим 20 мМ тиола для образования самоорганизующихся монослоёв. Были использованы три тиола: 1-октадекантиол, тиофенол, 2-фенилэтантиол. В завершение полученные соединения промыли этанолом и дистиллированной водой. С помощью сканирующего электронного микроскопа получили фотографии частиц полистирола, покрытого НЧЗ (рис. 7). Как видно, НЧЗ не совсем равномерно адсорбируются на поверхность полимера.



Рис. 7. Микрофотография полистирола, модифицированного наночастицами золота, полученная методом СЭМ [67].

На хроматограмме (рис. 8) видно, что на колонке с С18-Аи разделяются урацил и нафталин, чего не происходит на сорбенте с чистым золотом. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил/вода в соотношении 50/50 (об.).

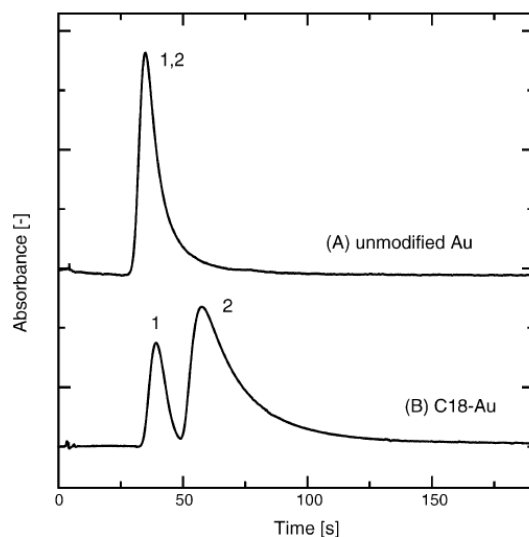


Рис. 8. Хроматограмма разделения урацила и нафталина на колонках (А) полистирол-НЧЗ и (В) полистирол-НЧЗ-С18 [67].

Далее были исследованы ряд полиядерных аренов с конденсированными кольцами (нафталин, антрацен, фенантрен) и бензол на колонке с С18-Аu и на колонке с октадецилсиланом (рис. 9). Использовали элюент ацетонитрил/вода в соотношении 50/50 (об. %). В целом времена удерживания были выше для полимерного сорбента.

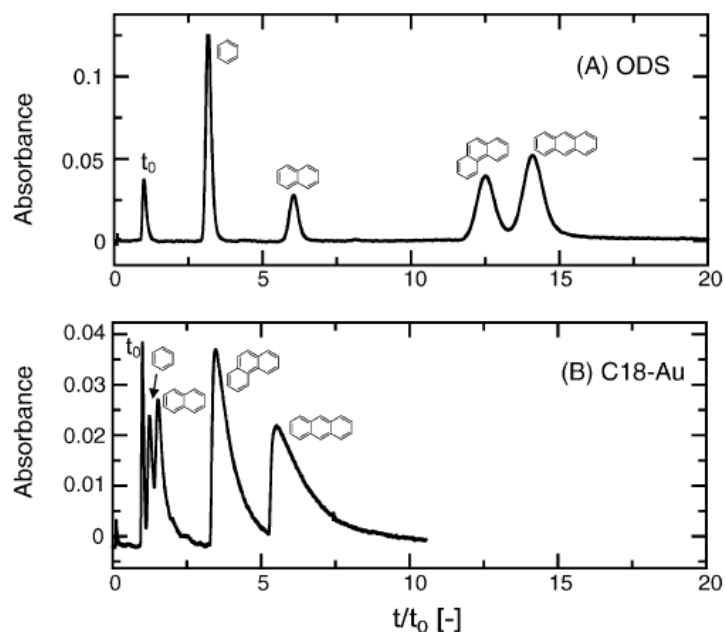


Рис. 9. Хроматограммы разделения ароматических соединений на полимерном сорбенте с наночастицами золота, модифицированными 1-октадекантиолом (А), и на модифицированном С18 силикагеле (В) [67].

Коэффициенты селективности для бензола и нафталина близки по значениям для обеих колонок. Однако для нафталина и фенантрена эти показатели различаются уже в два раза: 4.77 на С18-Аu колонке и 2.28 на октадецилсилановой колонке, соответственно. Коэффициент селективности антрацен/фенантрен на колонке С18-Аu

в 1.6 раза выше, чем на колонке с октадецилсиланом. Из этого следует, что на полимерном сорбенте селективность за счет стерических взаимодействий выше, чем на сорбенте на основе силикагеля. Авторы статьи предположили, что это может быть связано с тем, что плотность октадециловых групп выше на поверхности наночастиц золота, нежели на поверхности силикагеля, а этот фактор влияет на удерживание в неподвижной фазе плоских молекул, таких как определяемые арены. Между тем, пики фенантрена и антрацена на колонке C18-Au несимметричны, что свидетельствует о дополнительных механизмах удерживания.

В дальнейшем проводили хроматографирование тех же ароматических соединений и, дополнительно, нитробензола и хлорбензола на трёх колонках с наночастицами золота, иммобилизированными тиолами (C18-Au, Phe-Au, PheEt-Au), а также сравнивали полученные результаты со стандартной октадецилсилановой колонкой. Для монозамещённых бензолов в качестве подвижной фазы использовали смесь метанола и воды (70/30, об. %), а для остальных аренов – смесь ацетонитрила и воды (50/50, об. %). Факторы удерживания для всех аналитов на колонках Phe-Au и PheEt-Au такие же, как и для колонки C18-Au, и меньше, чем для октадецилсилановой колонки. Значение фактора удерживания бензола для колонок с тиол-модифицированными НЧЗ практически не различается, однако антрацен удерживается на Phe-Au и PheEt-Au колонках значительно меньше, чем на колонке C18-Au. В целом, для сорбентов с модификаторами тиофенолом и 2-фенилэтантиолом наблюдается меньшее сродство к полиароматическим соединениям, чем для модификатора 1-октадекантила. Кроме того, на обеих колонках Phe-Au и PheEt-Au не происходит разделения бензола и нафталина. На колонке Phe-Au не разделяются фенантрен и антрацен, тогда как на колонке PheEt-Au эти соединения разделяются хорошо, значение коэффициента селективности 1.53, из чего можно сделать вывод, что этильная группа играет роль в появлении стерических взаимодействий. Сравнивая хроматографические параметры для бензола, хлорбензола и нитробензола, можно увидеть, что на октадецилсилановой колонке все три соединения разделяются, а на колонке C18-Au они выходят одновременно. Другая картина для колонок Phe-Au и PheEt-Au: на них все три арена разделяются, однако бензол элюируется первым, в отличие от октадецилсилановой колонки, где порядок выхода следующий: нитробензол - бензол - хлорбензол. Коэффициент селективности бензол/нитробензол

существенно выше для колонки PheEt-Au, чем для остальных (2.75 против 0.66 для октадецилсилановой колонки). Полученные результаты показывают наличие новых, специфических закономерностей удерживания для полимерных сорбентов с НЧЗ, модифицированных тиолами, которые могут быть использованы в высокоэффективной жидкостной хроматографии при дальнейшем их изучении.

Таким образом, анализ литературных данных показал, что полимеры обладают рядом преимуществ: они термически, механически и химически стабильны и могут быть использованы в широком диапазоне рН. Полимерная матрица вносит вклад в удерживание аналитов, но не в селективность хроматографического разделения. НЧ лучше иммобилизуются на поверхности полимера, чем на силикагеле, занимают большую площадь поверхности и равномернее распределяются. Последующее ковалентное закрепление органических соединений, содержащих серу, на поверхности НЧ позволяет получить сорбенты, которые являются стабильными и сохраняют свои свойства в течение всего срока эксплуатации.

На основании вышесказанного можно сделать вывод, что полимеры, такие как матрица неподвижной фазы в ВЭЖХ, — это новое перспективное направление для исследования.

4 Хиральные неподвижные фазы

Хиральные неподвижные фазы являются важным компонентом жидкостной хроматографии для разделения энантиомеров веществ, которые нельзя разделить традиционными методами жидкостной хроматографии. Дизайн ХНФ основан на иммобилизации хиральных селекторов на неподвижной фазе, которая взаимодействует с хиральными аналитами различным образом. ХНФ для ВЭЖХ можно классифицировать по типу хирального селектора на природные (хиральными селекторами являются белки, алкалоиды, олигосахариды, антибиотики), полусинтетические (модифицированные олигосахариды, полисахариды, низкомолекулярные природные соединения) и синтетические (полимеры, низкомолекулярные молекулярная масса синтетических соединений). ХНФ нашли применение в различных областях, таких как фармацевтика, биотехнология, пищевая промышленность, сельское хозяйство и науки об окружающей среде, где

энантиомерная чистота имеет решающее значение для безопасности, эффективности и контроля качества продуктов [68, 69].

4.1 Хиральные неподвижные фазы с макроциклическими антибиотиками

Макроциклические антибиотики – это класс циклических соединений, в состав которых входят функциональные группы различной природы, также их молекулярные структуры содержат множество хиральных центров. Механизмы распознавания энантиомеров включают в себя различные типы взаимодействий между аналитом и веществом. Эти взаимодействия перечислены в табл. 2 в порядке убывания силы.

Таблица 2. Сила и направление молекулярных взаимодействий [69]

Тип взаимодействия	Сила	Направление
Электростатическое	Очень сильное	Притяжение (+/-), отталкивание (+/+, -/-)
Водородная связь	Очень сильное	Притяжение
Стерическое	Очень сильное	Отталкивание
π - π	Сильное	Притяжение, отталкивание
Ион-дипольное	Сильное	Притяжение
Диполь-дипольное	Среднее	Притяжение
Диполь-индуцированный ион	Слабое	Притяжение
Ван дер Ваальсовое	Очень слабое	Притяжение

Макроциклические антибиотики впервые представлены в качестве хиральных селекторов для энантиоразделения ВЭЖХ Армстронгом в 1994 году [70]. С тех пор эти соединения привлекли большое внимание в области хирального разделения.

Макроциклические антибиотики условно можно разделить на категории: ансамицины, полипептиды, гликопептиды и аминогликозиды. Они используются в качестве ХНФ для энантиоселективного разделения рацематов [70, 71, 73]. В частности, хиральные селекторы, принадлежащие к гликопептидам, такие как ванкомицин, колистин сульфат, норванкомицин, ристоцетин А, тейкопланин, эремомицин и др., успешно применялись в различных хроматографических установках [71, 74, 75] для достижения энантиоселективного разделения рацемических

соединений производных аминокислот и профенов [76, 77, 78, 79]. Наиболее широко используемые из них макроциклические гликопептидные антибиотики, такие как ванкомицин, тейкопланин, ристоцетин А и авопарцин. Они демонстрируют хорошее разделение. Многие из этих антибиотиков широко используются в коммерческих колонках [80]. В настоящее время коммерчески доступны некоторые хиральные колонки для ВЭЖХ на основе макроциклических антибиотиков, такие как Chirobiotic V, Chirobiotic T, Chirobiotic A и Chirobiotic R [67] (ASTEC, США), а также Nautilus-E (эремомицин), Nautilus-R [81] (ООО «БиоХимМак СТ», Россия).

Эффективность и селективность колонки можно улучшить, уменьшая размер частиц. Доказано, что разработка ХНФ, размером менее 2 мкм, является наиболее перспективным для хирального разделения. Это продемонстрировал в 2010 году Гаспаррини и его соавторы [82, 83]. Однако, уменьшение размера частиц ведёт к увеличению давления в системе, это связано со снижением проницаемости колонки. Как следствие, такие частицы не могут быть использованы в обычных системах ВЭЖХ, а требуют систем УВЭЖХ [82]. Однако, частицы с оболочкой ядра, то есть поверхностно пористые частицы, позволили достичь эффективности колонки, сравнимой с полностью пористыми частицами размером менее 2 мкм, при этом они позволяют использовать обычные системы ВЭЖХ и являются преимуществом для сверхбыстрых разделений.

Последние разработки новых ХНФ на основе макроциклических антибиотиков направлены, как раз, на использование новых хроматографических основ, а именно поверхностно-пористых частиц, а не на введение новых антибиотиков в качестве хиральных селекторов [84, 85]. Основной целью является улучшение хроматографических характеристик за счет сокращения времени анализа, повышения разрешения и энантиоселективности. Например, авторы данной статьи [85] недавно синтезировали поверхностно-пористые частицы на основе ванкомицина для быстрого энантиоселективного разделения различных классов новых психоактивных веществ (производных пировалерона, бензофурана, фенидина и фенидата) в сверхкритической флюидной хроматографии и жидкостной хроматографии. Результаты показали высокий энантиоселективный потенциал колонок на основе ванкомицина в обоих хроматографических методах; 88% протестированных веществ энантиоразделены с помощью сверхкритической ЖХ, а 69% протестированных соединений разделены с

помощью ЖХ. Более того, в оптимизированных условиях было достигнуто одновременно энантиоразделение нескольких соединений, что указывает на большую пригодность колонок на основе ванкомицина для этой цели (рис. 10).

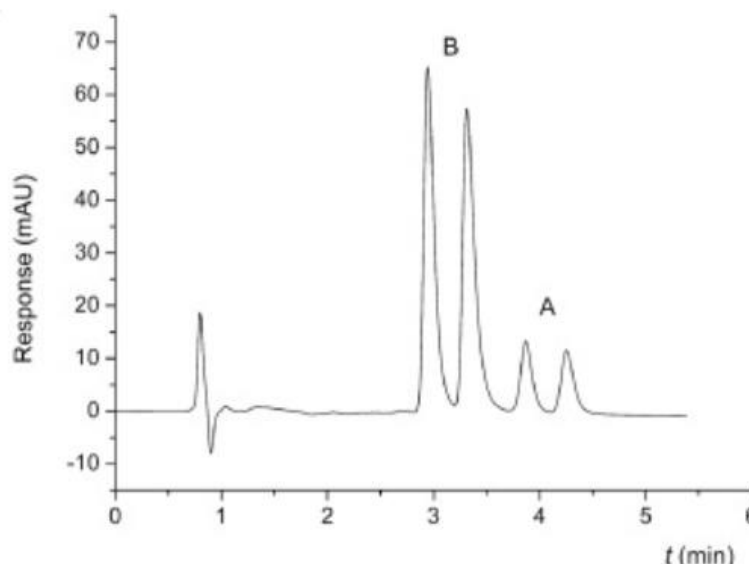


Рис. 10. Хроматограммы одновременного энантиоразделения 4-(2-метиламинопропил) бензофуран (A) и 4-(2-аминопропил) бензофуран (B) в ВЭЖХ.

Условия: ПФ - MeOH/CH₃COOH/TEA (100/0.1/0.05 об. %), скорость потока 0.5 мл/мин, УФ-детектирование 220 нм [85].

Разработаны множество поверхностно-пористых (ядро-оболочка) колонок на основе частиц размером менее 2 мкм для сверхбыстрого хирального разделения в ВЭЖХ [86, 87, 88, 89]. Хиральные колонки на основе таких гликопептидных антибиотиков, как тейкопланина, ванкомицина и агликона тейкопланина с использованием поверхностно-пористых частиц в качестве ХНФ стали коммерчески доступными (TeicoShell, VancoShell и TagShell). Кроме того, в последние годы изучалось получение макроциклических ХНФ на основе антибиотиков с помощью различных стратегий связывания [90, 91]. Конг и соавторы приготовили ХНФ на основе ванкомицина с помощью фотохимии [90]. Этот метод является экологичным и эффективным, и ХНФ продемонстрировала превосходное хиральное разделение хиральных соединений. Авторы исследовали влияние состава подвижной фазы на разделение веществ. Установлено, что добавление ТЕАА (0.3% рН 4.0) в состав ПФ позволяет разделить энантиомеры хлорфенирамина малеата (рис. 11). R_s увеличивается с увеличением концентрации ТЕАА.

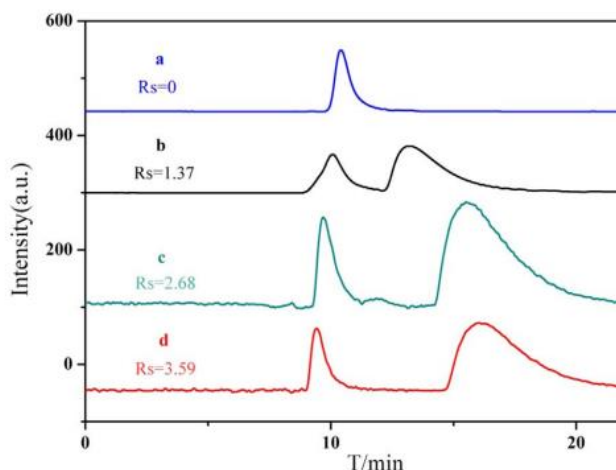


Рис. 11. Хроматограммы разделения энантиомеров хлорфенирамин малеата при различных концентрациях ТЕАА и АСН (15 см × 4.6 мм): (а) АСН 100 об. %, (b) ТЕАА:АСН (10:90 об.%), (с) ТЕАА:АСН (20:80 об.%), (d) ТЕАА:АСН (30:70 об.%); при 25 °С, 0.2 мл/мин, 254 нм [90].

Таким образом, удалось разделить вещества (хлортриметона и бензоина) с помощью ВЭЖХ (рис. 12).

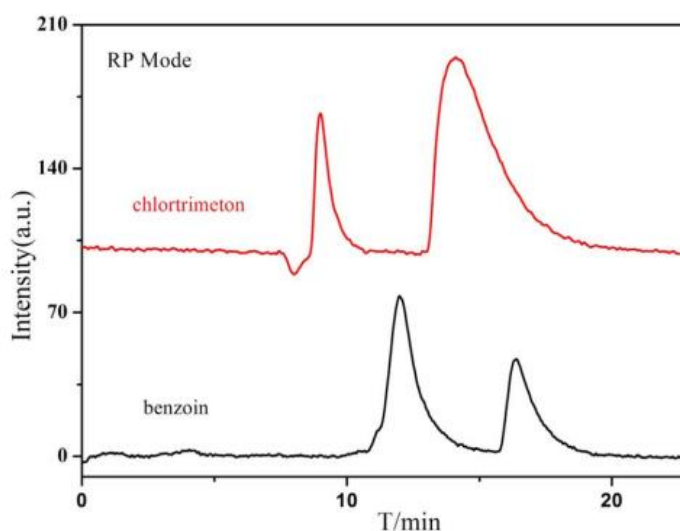


Рис. 12. Разделение энантиомеров хлорфенирамин малеата (ПФ АСН:ТЕАА (1%, рН 4.0) =70:30 об.%) и бензоина (ПФ АСН:Н₂О=50:50) на колонке (15 см × 4.6 мм) при 25 °С, 0.2 мл/мин, 254 нм [90].

Ли и соавторы в своей статье сообщают о получении новой тейкоплинин-связанной ХНФ с помощью реакции щелчка "тиолен" [91].

Схема синтеза тейкоплинин-связанной хиральной неподвижной фазы показан на рис. 13. Процесс приготовления включал три этапа: синтез тейкоплинина, содержащего алкенильную группу (C=C); приготовление меркаптопропилсиликагеля; получение ХНФ, связанной с тейкоплинином, с помощью реакции присоединения тиолен.

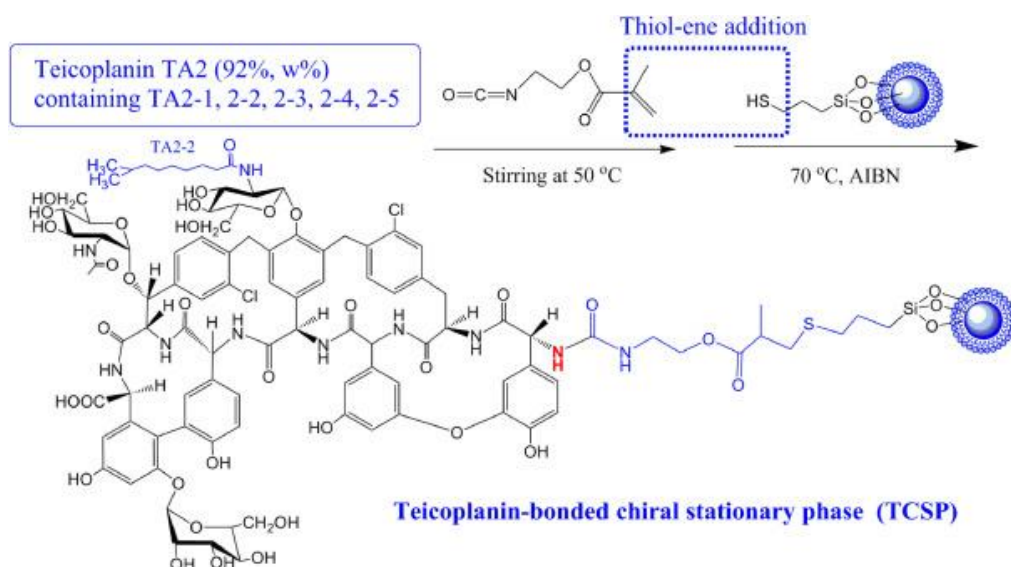


Рис. 13. Схема синтеза тейкоплин-связанной хиральной неподвижной фазы (ТХНФ) [91].

Удалось разделить энантиомеры кленбутерола и сальбутамола в мясе с помощью ТХНФ [91].

В настоящее время НФ на основе макроциклических антибиотиков активно применяются в хроматографии для разделения энантиомеров [92, 93, 94]. Область применения включает хиральную ВЭЖХ и капиллярный электрофорез, где используют колонки на основе силикагеля с макроциклическими антибиотиками [95, 96, 97].

Некоторые антибиотики, такие как ванкомицин, рифамицин В, тиострептон, были ковалентно закреплены на силикагелевых фазах для создания ХНФ [70, 98]. Эти антибиотики продемонстрировали высокую энантиоселективность по отношению к различным соединениям как в режиме ОФ, так и НФ-хроматографии. В частности, авторы смогли разделить энантиомеры 70 соединений, таких как аминокислоты, их производные, β -блокаторы и лактоны. Ещё одни сорбенты такого вида с макроциклическим тейкоплином и агликоном тейкоплина проявили высокую хиральную активность [99, 100]. Были изучены закономерности удерживания производных аминокислот на неподвижных фазах Chirobiotic T, Chirobiotic Tag и Chirobiotic V. В режиме ОФ хроматографии энантиоселективность данных НФ в большей степени зависела от состава ПФ: концентрации и природы органического растворителя, значения pH элюента [101]. Природа и концентрация используемого буферного раствора оказывают меньшее влияние. На хиральные свойства колонки влияет структура макроциклических антибиотиков, что может быть связано со стерическими помехами, создаваемыми остаточными сахарами, ограничивающими

доступ к молекулам. Так разделение энантиомеров наибольшего числа производных аминокислот было получено на колонке Chirobiotic T. На колонке Chirobiotic V было получено лишь частичное разделение производных аминокислот. В целом, ХНФ на основе макроциклических антибиотиков показывают большие перспективы в хиральном разделении, и их эффективность может варьироваться в зависимости от режима работы и природы разделяемых веществ.

Эремомицин, российский антибиотик, в меньшей степени изучался как хиральный селектор. Он отличается от распространённого ванкомицина одним атомом хлора и имеет дополнительный углеводный остаток, содержащий первичную аминогруппу [102]. Сорбент с эремомицином в качестве хирального селектора был впервые синтезирован в 2006 году, проводили ковалентное закрепление эремомицина на эпоксидированной силикагелевой матрице [76]. Неподвижная фаза продемонстрировала высокую энантиоселективность к аминокислотам с использованием водно-метанольных ПФ, содержащих различные буферные растворы или с добавлением уксусной кислоты [103].

Актуальной областью применения макроциклических антибиотиков является оценка оптической чистоты фармацевтических препаратов [75, 104]. Широко изучено энантиоразделение профенов и β -блокаторов, которые применяются в виде рацемических смесей в лекарственных препаратах. Сорбенты с ванкомицином, эремомицином, эремозаминилагликоном и ристомицином А исследовали для разделения энантиомеров профенов [100, 105]. Среди рассмотренных антибиотиков эремомицин проявил более высокую энантиоселективность по отношению к профенам. Разделение ибупрофена и индопрофена в ОФ режиме хроматографии показано на рис. 14, а в ПО на рис. 15. Как видно, при работе в ПО режиме разделение энантиомеров происходит за меньшее время, а получаемые пики более узкие, что говорит о большей эффективности.

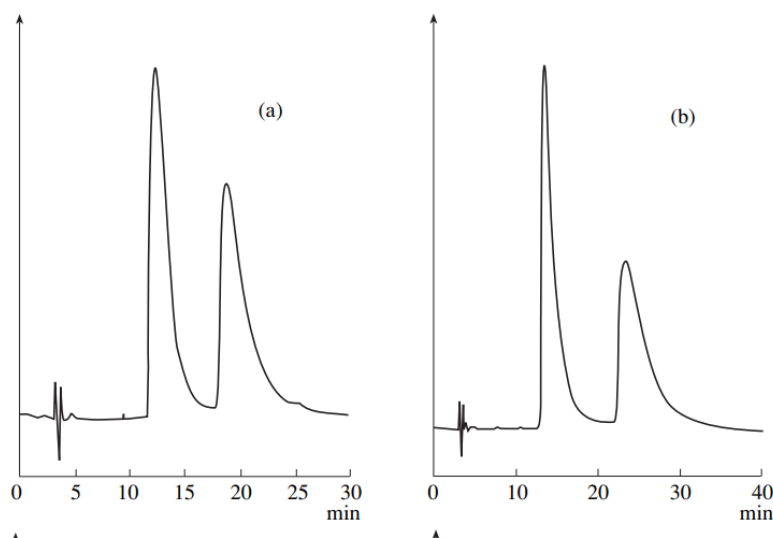


Рис. 14. Разделение энантиомеров ибупрофена (а) и индопрофена (б). ПФ: MeOH:KH₂PO₄ (0.1 M, pH 6.5); 40:60 об. %. Скорость потока: 0.7 мл/мин, $\lambda = 220$ нм [100].

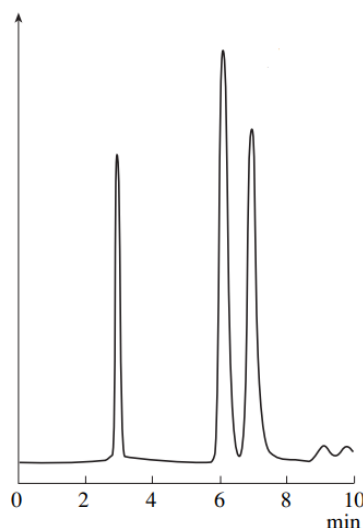


Рис. 15. Разделение энантиомеров ибупрофена. ПФ: 100% MeOH с добавлением 0.1% ТЕА, 0.2% АсОН. Скорость потока: 0.7 мл/мин, $\lambda = 220$ нм [100].

Использование 100% метанола, дополненного уксусной кислотой и органическими основаниями (например, триэтиламин), в качестве элюента позволяет подавить нежелательные ионообменные взаимодействия между сорбатом и хиральной НФ. В результате улучшается форма хроматографических пиков [79].

Разделение β -блокаторов, соединений, входящих в состав лекарственных препаратов, блокирующих действие адреналина и норадреналина на сердце, было получено на НФ, где в качестве хиральных селекторов использовали тейкопланин и ванкомицин [106, 107]. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрила, метанола и буферного раствора ТЭАА. Для получения наилучшего разделения энантиомеров варьировали содержание метанола от 10 об. % до 20 об. %, а содержание

буферного раствора в диапазоне 1–5 об. % и его концентрацию от 0.01 до 0.2 %. Исследовали также влияния природы буферного раствора на разделение пиков (рис. 16).

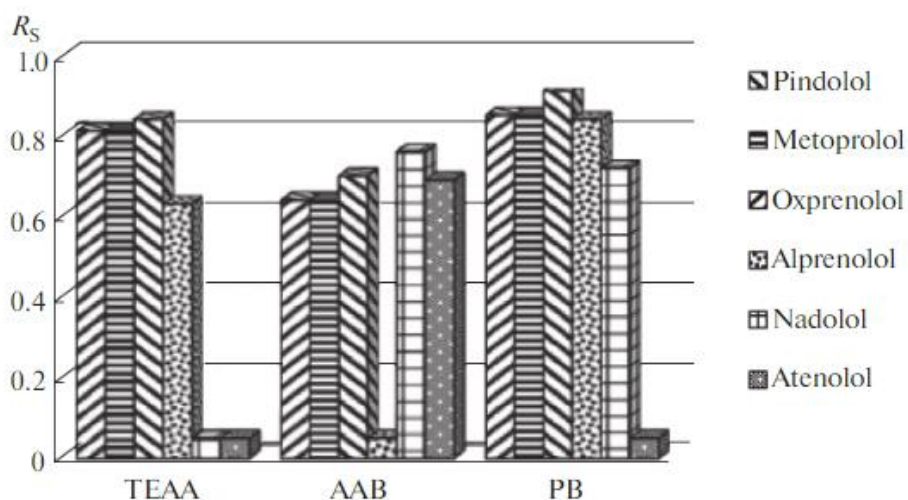


Рис. 16. Влияние природы буферного раствора (50 мМ, pH 4.0) – ACN (95:5 об. %) на разрешение пиков энантиомеров β -блокаторов на сорбенте на основе силикагеля, модифицированного НЧЗ, стабилизированными ванкомицином [106].

Наилучшее энантиоразделение достигнуто для пиндолола ($R_s=0.93$), метопролола ($R_s=0.92$), окспренолола ($R_s=0.91$) и альпренолола ($R_s=0.81$) с ПФ: ФБ (25 мМ, pH 4.0):ACN (96:4 об. %), для надолола ($R_s=0.71$) ПФ: ААБ (25 мМ, pH 4.0):ACN (96:4 об. %), для атенолола ($R_s=0.53$) ПФ: ААБ (50 мМ, pH 4.0):ACN (96:4 об. %) [84].

Хиральные неподвижные фазы с эремомицином были использованы для разделения энантиомеров различных производных аминокислот (дансил-, КБЗ-, бензоил-, БОК-) [108]. Для разделения производных аминокислот использовали ПФ с фосфатным буферным раствором с pH 7.0 и 8.0 с добавлением метанола и изопропанола, концентрации которых варьировали от 1 до 30 об. %. Из-за сильного удерживания на сорбенте дансил производные разделяли в ПО режиме. Было замечено, что для одной аминокислоты увеличение сложности структуры производного (БОК > бензоил > КБЗ) приводило к увеличению удерживания, разрешения и селективности пиков. Производные КБЗ лучше всего удерживаются в идентичных условиях вследствие наличия в их структуре бензольного кольца и карбонильной группы, которые обуславливают наиболее сильное взаимодействие адсорбата с эремомицином. Ароматическая часть молекул производных играет ключевую роль в образовании π - π -комплексов между адсорбатом и неподвижной фазой, содержащей π -

электроны и системы с двойными связями, а наличие карбонильной группы создает дополнительные дипольные взаимодействия и водородные связи.

В работе [97] в условиях ОФ ВЭЖХ изучали поведение производных аминокислот и профенов на синтезированном бинарном сорбенте, содержащем эремомицин и бычий сывороточный альбумин (БСА). В качестве элюента использовали метанол и фосфатный буферный раствор. Варьировали pH, концентрацию фосфатного буферного раствора и объемную долю метанола в элюенте. Аналогично сорбенту, содержащему только эремомицин, удалось разделить энантиомеры профенов и производных аминокислот [79]. Увеличение концентрации фосфатного буфера в подвижной фазе уменьшало время удерживания профенов, однако разбавленные буферные растворы приводили к размытию пиков. Снижение значения pH с 7.5 до 4.5 увеличило время удерживания и разрешение энантиомерных пиков профенов (рис. 17). Дальнейшее снижение pH до 3.5 привело к резкому уменьшению времени удерживания из-за изменения заряда поверхности сорбента.

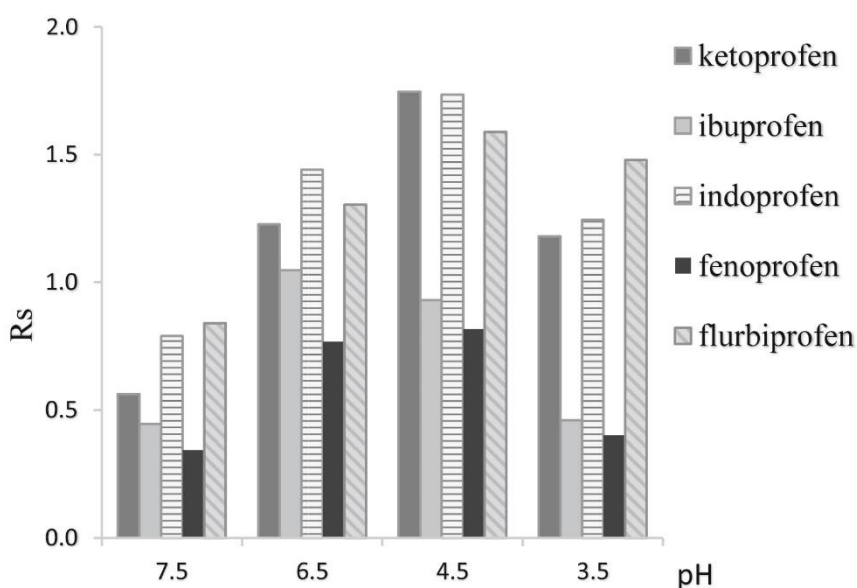


Рис. 17. Разделение энантиомеров профенов при различных pH буфера в подвижной фазе. Подвижная фаза: MeOH:K₂HPO₄ (0.1 M) 50:50 (об. %); скорость потока: 0.5 мл/мин; $\lambda = 220$ нм [106].

Снижение концентрации органического модификатора в подвижной фазе увеличило время удерживания. Подвижная фаза содержала <50% по объему органического модификатора, что обеспечивало более низкую эффективность разделения при более длительном времени анализа. Подвижные фазы, содержащие >50% по объему органического модификатора, приводили к более низкой

эффективности разделения при более коротком времени анализа. Оптимальное разрешение пиков наблюдалось при 50 об. % органического модификатора в подвижной фазе для большинства профенов (рис. 18).

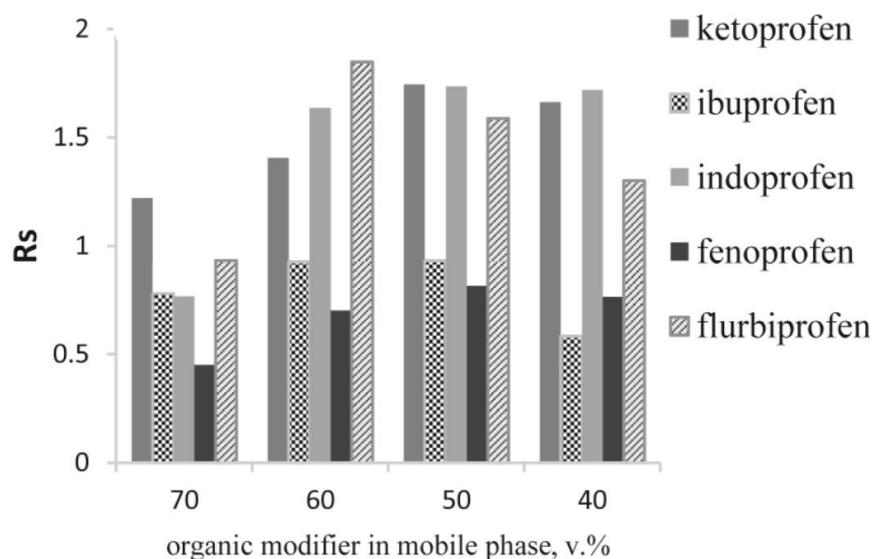


Рис. 18. Параметр разделения энантиомеров профенов при различном содержании органического растворителя в подвижной фазе. Подвижная фаза: MeOH/KH₂PO₄ (0.1 М, pH 4.5); скорость потока: 0.5 мл/мин; $\lambda = 220$ нм [106].

Для смешанного сорбента эремомицин-БСА было установлено, что ключевую роль в энантиоразделении играет эремомицин, в то время как наличие БСА делает возможным применение такого сорбента для определения энантиомеров в биологических жидкостях. Малые молекулы оптически активных соединений проходят в поры сорбента и взаимодействуют с эремомицином, в то время как высокомолекулярные белки выходят с мёртвым объёмом.

Сорбент, сочетающий эремомицин и ванкомицин со смешанной хиральностью, был успешно синтезирован и применен для разделения энантиомеров β -блокаторов и аминокислот [109]. Ванкомицин показал неспособность разделять не дериватизированные аминокислоты, а эремомицин проявлял слабую энантиоселективность к β -адреноблокаторам, но новый сорбент сочетает в себе свойства этих двух макроциклических антибиотиков. Параметры разделения β -блокаторов ухудшаются при увеличении содержания метанола в ПФ состава метанол-ацетонитрил. Наиболее подходящей подвижной фазой является смесь метанол-ацетонитрил-ТЕАА (0,1%, pH 4,5) в соотношении 19:78:3 об. %. Время анализа сокращается благодаря меньшим коэффициентам удерживания аналитов на

смешанном сорбенте. При наличии двух макроциклических антибиотиков в качестве хиральных селекторов коэффициенты энантиоразделения β -блокаторов выше (1.10-1.20) по сравнению с одним эремомицином, наилучшее разделение достигнуто для энантиомеров метопролола ($R_s = 1.2$). Для разделения энантиомеров аминокислот использовали растворы растворами уксусной кислоты или дигидрофосфата калия с добавлением органических растворителей (ацетонитрил, метанол, изопропанол). Природа органического модификатора оказывает минимальное влияние на удерживание, селективность и разрешение пиков энантиомеров аминокислот. Однако увеличение содержания органического модификатора снижает разделение энантиомеров. В отличие от колонки с силикагелем, модифицированным только эремомицином, колонка с двумя антибиотиками не смогла разделить энантиомеры аминокислот, не содержащих ароматических фрагментов. Этот результат может быть обусловлен меньшим вкладом электростатических взаимодействий в разделение и удержание энантиомеров.

Для понимания механизмов энантиораспознавания на хиральных сорбентах с макроциклическими антибиотиками в недавних работах группы соавторов было проведено исследование закономерностей разделения энантиомеров аминокислот [110], профенов [111] и β -блокаторов [112] на силикагелевых сорбентах с оригитаванцином (O-CSP), эремомицином и его производными, хлор-эремомицин (Chloro-E-CSP), амидо-эремомицин (Amide-E-CSP), адамантиламидо-эремомицин (Adamantylamide-E-CSP), агликон эремомицина (EAg-CSP), агликон эремозаминилэремомицина (EEA-CSP) и дезэремозаминилэремомицин (DEE-CSP).

Разделение профенов проводили в полярно-органическом режиме хроматографирования с использованием в качестве НФ метанола с добавками ацетата триэтиламмония. Было отмечено, что электростатические взаимодействия не вносят существенного вклада в разделение энантиомеров профенов на исследуемых сорбентах, так как не наблюдалось корреляции между энантиоселективностью и кислотностью карбоксильных групп, также наименьшей энантиоселективностью обладал сорбент Amide-E-CSP с амидной группой, блокирующей полярную карбоксильную группу в молекуле эремомицина. Отмечен вклад ароматических фрагментов антибиотиков в хиральное распознавание профенов, о чём свидетельствуют наилучшие показатели разделения на сорбентах Chloro-E-CSP с

дополнительным атомом хлора и O-CSP с 4-хлордифенилметил заместителем в бензольном кольце хлорэремомицина. Таким образом энантиоселективность разделения профенов падала в ряду O-CSP>Chloro-E-CSP>Adamantylamide-E-CSP>E-CSP>Amide-E-CSP. Наиболее высокая разрешающая способность хроматографических пиков ($R_s>2.0$) получена при разделении энантиомеров флурбипрофена, индопрофена и кетопрофена на сорбентах с привитым оритаванцином и хлорэремомицином. На колонке с эремомицином максимальное разрешение пиков энантиомеров ($R_s>1.64$) получено для флурбипрофена (табл. 3).

Таблица 3. Разрешение хроматографических пиков (R_s) и селективность разделения (k_2/k_1) энантиомеров профенов, полученные для изученных ХНФ (элюент: 100% метанол с добавлением 0.1% ТЭАА) [111]

Аналит	E-CSP		Chloro-E-CSP		Amide-E-CSP		Adamantylamide-E-CSP		O-CSP	
	k_2/k_1	R_s	k_2/k_1	R_s	k_2/k_1	R_s	k_2/k_1	R_s	k_2/k_1	R_s
Кетопрофен	1.92	0.84	2.84	2.05	2.82	0.72	3.36	0.94	3.20	2.20
Индопрофен	2.62	1.12	4.00	2.24	3.53	1.08	3.87	1.31	4.56	2.98
Флурбипрофен	1.30	1.64	1.13	2.09	2.23	1.49	2.68	1.76	2.37	3.30
Фенопрофен	1.14	0.68	1.71	0.99	2.07	0.47	2.37	0.46	2.04	1.21
Ибупрофен	1.67	0.77	1.80	0.97	1.28	0.35	1.53	0.47	1.91	0.93

Исследование удерживания и разделения энантиомеров β -блокаторов проводили в том же режиме, что и профенов. В качестве элюентов использовали 100% метанол и 50% метанол - 50% ацетонитрил с добавками ацетата триэтиламмония. Авторы отмечают, что в удерживание β -блокаторов вносят вклад водородные взаимодействия. При добавлении в подвижную фазу апротонного ацетонитрила, который образует меньше водородных связей с ХНФ, чем метанол, все β -блокаторы элюируются позже. В тоже время на сорбенте Amide-E-CSP, в котором экранирована гидроксильная группа, положительно заряженные β -блокаторы выходят раньше, что говорит о роли электростатических взаимодействий в удерживании. Электростатические силы также вносят вклад в энантиораспознавание за счёт взаимодействия протонированной вторичной аминогруппы β -блокаторов, которая расположена в бета-положении относительно хирального центра, с доступной карбоксильной группой в молекуле эремомицина. Это подтверждается отсутствием энантиоселективности на неподвижных фазах Amide-E-CSP, Adamantylamide-E-CSP из-за превращения заряженной карбоксильной группы в нейтральную амидную. Авторы определяют ключевую полость, отвечающую за хиральное распознавание β -блокаторов,

расположенную в левой части структуры эремомицина. При введении хлор-заместителя в первое кольцо у этой полости энантиоселективность к β -блокаторам пропадает. Увеличение энантиоселективности по отношению к β -блокаторам наблюдается на неподвижных фазах с агликонами эремомицина. Интересно отметить, что удерживание аналитов возрастает по мере уменьшения количества углеводных заместителей от эремомицина, имеющего три заместителя, до его полного агликона, а наибольшая способность к энантиоразделению наблюдается для частичных агликонов EEA-CSP и DEE-CSP. Авторы связывают данный феномен со стерическими эффектами. Объемный дисахаридный фрагмент в эремомицине ограничивает доступ β -блокаторов к энантиоселективному участку молекулы. При этом углеводные остатки в EEA-CSP и DEE-CSP обеспечивают эффективное экранирование от других частей селектора, которые вызывают сильную адсорбцию, но хирально не взаимодействуют с β -блокаторами. На сорбенте с эремомицином энантиоразделение было получено для всех исследуемых β -блокаторов с умеренной селективностью ($\alpha = 1.12-1.96$) и разрешающей способностью ($R_s 0.52 - 1.54$).

Аминокислоты исследовали на сорбентах близких по структуре к эремомицину в обращённо-фазовом режиме хроматографии. Сравнение удерживания и разделения энантиомеров различных по свойствам аминокислот проводили на ПФ 20% метанол — 80% 0.1 М дигидрофосфатный буфер с pH 4.5. Основные аминокислоты в данных условиях удерживались слабо и практически не разделялись их энантиомеры, что связано с отталкиванием положительно заряженных при pH 4.5 аминокислот и эремомицина, который также имеет положительный заряд. Значительное уменьшение времён удерживания наблюдалось для ХНФ Amide-E-CSP, Adamantylamide-E-CSP, в которых полярная карбоксильная группа была превращена в нейтральную амидную, при этом энантиоселективность осталась на прежнем уровне. Из этого можно сделать вывод, что электростатические взаимодействия играют роль в удерживании аминокислот, но не в разделении энантиомеров. Сорбент Chloro-E-CSP с иммобилизованным хлорэремомицином демонстрирует лучшую энантиоселективность по сравнению с E-CSP для всех аминокислот кроме тех, что содержат ароматическое кольцо. Значительное падение энантиоселективности для ароматических аминокислот указывает на вклад π - π -взаимодействий в разделение энантиомеров. Добавление атома хлора в первую полость хирального селектора

уменьшает эти взаимодействия за счёт мезомерного эффекта. Повышение энантиоселективности остальных аминокислот может быть связано с увеличением их удерживания. Однозначно можно сказать, что центром хирального взаимодействия является первая полость в левой части молекулы эремомицина, также как, это было ранее указано, для профенов и β -блокаторов. Отмечено влияние стерического эффекта, для аминокислот с объёмным жёстким фрагментом в структуре (пролин, гистидин) резко падает энантиоселективность на сорбенте Chloro-E-CSP. Авторы варьировали состава ПФ при разделении энантиомеров аминокислот на сорбенте Chloro-E-CSP. Использование в качестве органической добавки ацетонитрила приводило к снижению энантиоселективности и разрешению пиков. Удерживание аминокислот увеличивалось при увеличении органической добавки в ПФ, что свидетельствует о реализации гидрофильной хроматографии. Увеличение размера алькильной группы приводит к снижению удерживания и энантиоселективности. Максимальная селективность энантиомеров наблюдалась при объёме органической добавки 10-20%. С высокой энантиоселективностью аминокислоты делились в том числе на чисто водной НФ. Наилучшее энантиоразделение для всех аминокислот было достигнуто с хлорной кислотой в качестве добавки в водную фазу. Значение pH водной фазы влияло на удерживание основных и кислотных аминокислот. Такое поведение связано с депротонированием аминогрупп селектора при высоких значениях pH и, как следствие, снижением общего положительного заряда, что приводило к увеличению отталкивания для аспарагиновой кислоты и уменьшению отталкивания для гистидина и лизина. Влияние pH ПФ на энантиоразделение зависело от свойств аминокислот. Для большинства исследованных аминокислот наилучшая разрешающая способность была при pH 4.5. Для основных гистидина и лизина с увеличением времени удерживания в щелочных ПФ увеличивалась энантиоселективность. Для ароматических триптофана и фенилаланина наилучшая селективность разделения была достигнута при pH 7.2. Из данного исследования можно сделать вывод, что для разделения аминокислот наилучшим оказался сорбент Chloro-E-CSP. Однако сорбент E-CSP также проявил энантиоселективность ко всем аминокислотам кроме основных, разделение которых можно добиться при изменении значения pH ПФ.

Обзор вышеизложенных работ показывает, что макроциклические антибиотики (ванкомицин, тейкопланин, агликон тейкопланина, эремомицин) успешно

применяются в хиральной ВЭЖХ для разделения энантиомеров различных соединений: аминокислот, производных аминокислот, α -фенилкарбоновых кислот, профенов, β -блокаторов и других. Одни из наиболее интересных результатов получены для эремомицина и его производных.

4.2 Полимерные неподвижные фазы с наночастицами в хиральной жидкостной хроматографии

Распространённая практика использования наночастиц для энантиораспознавания и создания хиральных селекторов [113]. Ли и соавторы [114] приготовили две новых ХНФ на основе полисахаридов путем иммобилизации трис-(3,5-диметилфенилкарбамата) целлюлозы на поверхностно-пористых частицах SiO_2 -AgNPs или SiO_2 -AuNPs. Благодаря присутствию наночастиц Ag или Au на поверхности силикагеля энантиоселективность ХНФ была улучшена по сравнению с модифицированными производными целлюлозы силикагелевыми колонками [114, 115].

Материал со структурой ядро-оболочка на основе ядра из пористого кремнезема и наночастиц Ag (НЧС) в качестве оболочки. Сорбент приготовлен затравочным методом. Производные целлюлозы в качестве хиральных селекторов наносили на поверхности частиц методами покрытия (ХНФ-1) и межмолекулярной поликонденсации (ХНФ-2) в виде хиральных неподвижных фаз (ХНФ) соответственно. Пятнадцать рацематов использовали для оценки их способности к хиральному распознаванию (рис. 19) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Результаты показали, что ХНФ на основе частиц НЧС имеют более сильное взаимодействие с аналитами, что привело к лучшему энантиоразделению из-за наличия НЧС на поверхности силикагеля, по сравнению с колонкой силикагеля, модифицированной производным целлюлозы. Кроме того, новые ХНФ показали особую селективность к кетоновым энантиомерам, а НЧС проявляли синергический эффект с производными целлюлозы при энантиоразделении [114].

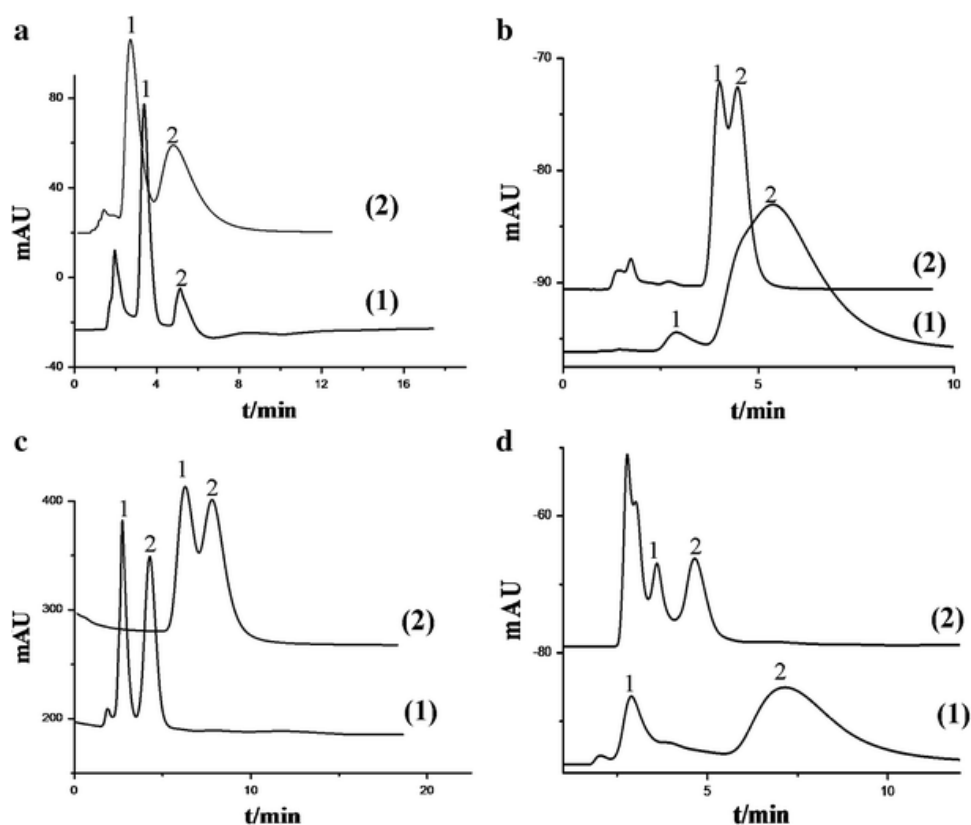


Рис. 19. Хроматографическое разрешение рацематов а–d. (а) Оксид трансстильбена (н-гексан:2-пропанол 95:5 об. %); (b) флаванон (н-гексан:2-пропанол (1) 85:15 об. %, (2) 98:2 об. %); (c) бензоин (н-гексан:2-пропанол, (1) 90:10 об. %, (2) 98:2 об. %); (d) 2-фенилциклогексанон (н-гексан:2-пропанол, 98:2 об. %). (1) ХНФ-1 и (2) ХНФ-2 (1 и 2 в виде двух энантиомеров) [114].

Наночастицы золота (НЧЗ) (размером 10–15 нм) приготовлены и нанесены на поверхности частиц кремнезема, функционализированных с использованием 3-аминопропилтриэтоксисилана в качестве затравки, в мягких условиях. Затем зародыши Au росли дальше и формировали нанолисты методом восстановления гидрата хлорида золота. 3,5-диметилфенилизоцианатное производное целлюлозы в качестве хирального селектора наносили на поверхности SiO₂-Au. Полученные сферы имели сэндвич-структуру, в которой сердцевинной, промежуточным слоем и оболочкой являлись гранулы кремнезема, упакованный монослой НЧЗ и производное целлюлозы. Разделение девяти пар энантиомеров достигнуто в режиме нормально-фазовой жидкостной хроматографии (рис. 20). Результаты показали, что новая ХНФ имеет достаточное взаимодействие с аналитами из-за присутствия НЧЗ на поверхности кремнезема по сравнению с колонкой с покрытием из целлюлозы и кремнезема [115].

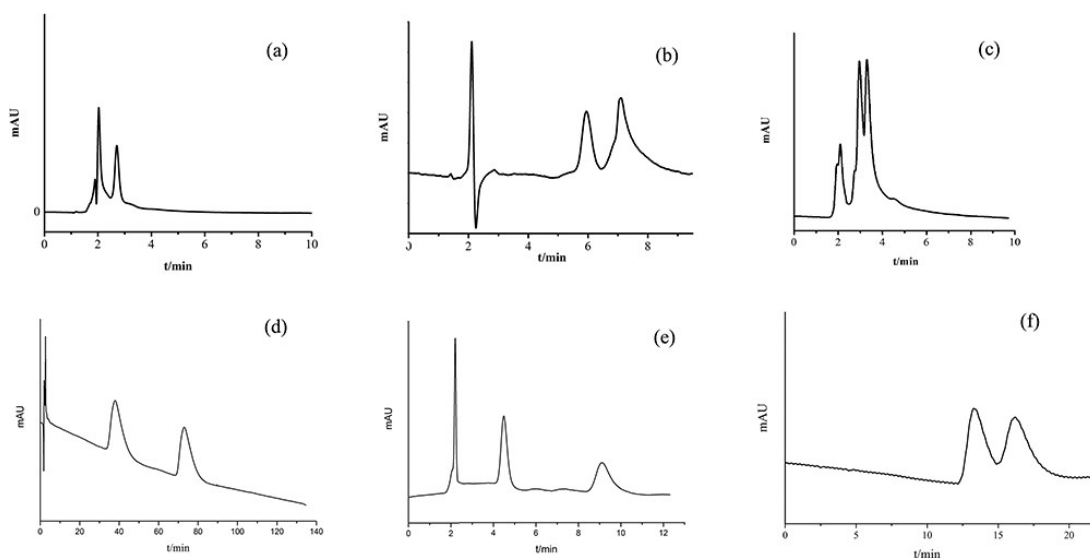


Рис. 20. Хроматограммы некоторых рацемических соединений на колонке $\text{SiO}_2\text{-Au}$. (a) фентион, ПФ: н-гексан:изопропанол (55:45 об. %), 252 нм; (b) 6-гидроксифлаванон ПФ: н-гексан:изопропанол (95:5 об. %), 254 нм; (c) циперметрин, ПФ: н-гексан:изопропанол (85:15 об. %), 240 нм; (d) ибупрофен, ПФ: н-гексан:изопропанол (70:30 об. %), 250 нм; (e) олаквиндокс, ПФ: н-гексан:изопропанол (98:2 об. %), 372 нм; (f) флаванон, ПФ: н-гексан:изопропанол (85:15 об. %), 254 нм; скорость потока 1.0 мл/мин [115].

Авторы статьи [116] разработали капиллярные колонки, состоящие из монолитов лаурилметакрилата с внедренными наночастицами серебра (НЧС). Изучены два подхода к внедрению НЧС в монолиты. НЧС либо фотогенерированы *in situ* во время полимеризации монолита под действием УФ-облучения, либо включались в полимеризационную смесь (*ex situ*). Присутствие НЧС не влияло на порядок элюирования аналитов; однако это привело к улучшению характеристик разделения.

В качестве неподвижной фазы для разделения и определения двух стероидных гормонов, а именно прогестерона и тестостерона, разработан новый тонкослойный хроматографический слой с использованием наночастиц золота, привитых силикагелем, модифицированным 3-триэтоксисилилпропиламином [117]. В качестве подвижной фазы использовали ацетон-н-гексан (25:75 об. %), и результаты сравнивали с результатами, полученными с использованием простых (т.е. немодифицированных) пластин силикагеля. Экспериментальные результаты показывают, что включение НЧС в структуру неподвижной фазы обычного силикагеля может устранить фоновые мешающие сигналы от биоматриц. Одним словом, разработанный метод может быть использован для быстрого скрининга и чувствительного определения стероидных гормонов в сложных биологических матрицах.

4.3 Хиральные неподвижные фазы с наночастицами, стабилизированными антибиотиками

В разделе 2.2 были рассмотрены неподвижные фазы с НЧЗ с различными лигандами в том числе применимые для хирального разделения. В данном разделе будут рассмотрены НФ с НЧЗ, стабилизированными именно антибиотиками. В работе [84] исследована разделительная способность сорбента на основе силикагеля, модифицированного наночастицами золота и иммобилизованным ванкомицином. Меркаптосиликагель модифицировали НЧЗ и затем нагревали и проводили реакцию с 3-меркаптопропионовой кислотой и ванкомицином. ХНФ создана путем самосборки и фотохимической трансформации диазорезина. С помощью УФ-обработки ионная связь между частицами силикагеля и диазорезином, диазорезином и ванкомицином превращена в ковалентную связь посредством уникальной фотохимической реакции. Исследовано влияние состава ПФ на удерживание и разделение β -блокаторов. Новый сорбент показал хорошую эффективность и сокращение времени анализа при разделении энантиомеров. Наилучшее разделение энантиомеров β -блокаторов получено при элюировании ПФ с содержанием буферного раствора 96 об. % и значением pH равны 4.0. Пиндолол ($R_s = 0.93$), метопролол ($R_s = 0.92$), окспренолол ($R_s = 0.91$) и алпренолол лучше делились с фосфатным буферным раствором (25 мМ), а атенолол с ацетатным (50 мМ). Вещества удерживались на колонке менее 3 мин, а соединения, обладающие наименьшим удерживанием, показали худшее энантиоразделение надолол ($R_s = 0.71$) и атенолол ($R_s = 0.53$). Методику применили для разделения энантиомеров пиндолола в препарате «Вискен» и метопролола в препарате «Вазокардин» (рис. 21).

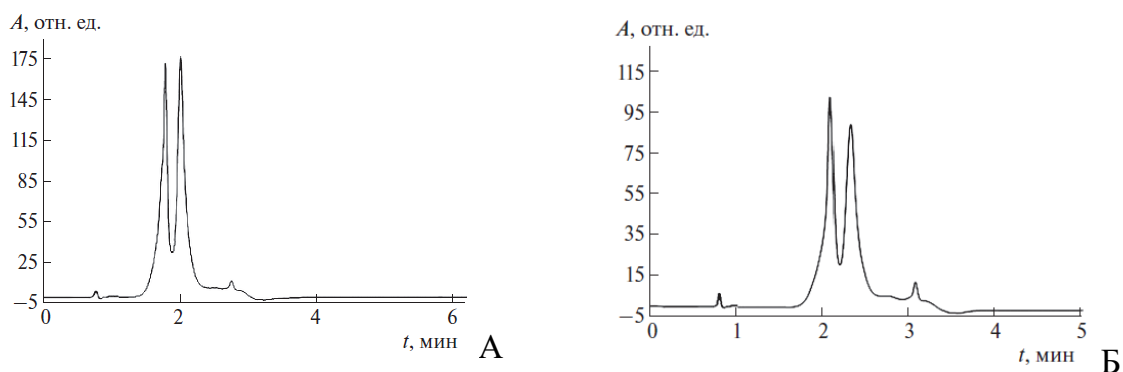


Рис. 21. Хроматограмма препарата «Вискен» (А) и препарата «Вазокардин» (Б): колонка (100 × 4.6 мм) SiO₂–S–Au–S–COOH–ванкомицин; ПФ – ФБ (25 мМ, pH 4.0)–CH₃CN (96:4 об. %), скорость ПФ 0.5 мл/мин [84].

Силикагель, модифицированный наночастицами золота, стабилизированными эремомицином, показал высокую селективность разделения по отношению к аминокислотам [118]. Наилучшее разделение энантиомеров достигнуто в случае триптофана, 3,4-дигидроксифенилаланина и фенилаланина, время анализа составило менее 10 мин. Разделение веществ проводилось в ПФ, содержащих MeOH (ACN) и H₂O в различных соотношениях. При использовании ACN удерживание аминокислот выше, чем при использовании MeOH, но ACN снижает селективность и разрешение пиков энантиомеров. Увеличение содержания H₂O повышает удерживание аминокислот, особенно фенилаланина и 4-хлорфенилаланина, но препятствует разделению энантиомеров из-за сильного уширения пика. Лучшее разделение достигнуто в ПФ с содержанием ACN 80-90 об. %. Полученный сорбент авторы статьи сравнили с коммерческой колонкой Nautilus E, которая обладала более высокой энантиоселективностью. Однако, основным преимуществом этого сорбента является его простой синтез и меньший расход селектора по сравнению с коммерческой колонкой.

Таким образом, анализ литературных данных показал, что НЧЗ успешно применяются для получения хроматографических материалов. НЧЗ могут быть использованы для функционализации носителя под разные задачи, изменять селективность и свойства сорбентов. Полимерные матрицы имеют преимущество по сравнению с силикагелевыми для закрепления НЧЗ. Они могут быть использованы в широком диапазоне pH. Сорбенты на основе гидрофобных полимеров подходят для работы в наиболее распространённом обращённо-фазовом варианте хроматографии. Однако применение полимерных наногибридных материалов для получения набивных хроматографических колонок мало изучено. Кроме того, исследование новых неподвижных фаз для энантиоразделения является актуальной задачей. Макроциклические антибиотики, уже зарекомендовали себя в качестве хиральных селекторов. Они имеют более сильное взаимодействие с аналитами, что приводит к лучшему энантиоразделению. Исходя из вышеперечисленного, перспективным представляется синтез и исследование сорбентов на основе полимеров с НЧЗ, стабилизированных различными соединениями, в том числе макроциклическими антибиотиками.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1 Исходные вещества, аппаратура, методики эксперимента, техника эксперимента

1.1 Реактивы и материалы

Для синтеза сорбентов в работе использовали следующие реагенты: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (х.ч., “Merck”, Германия), $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (ос.ч., “Merck”, Германия), L-цистеин (ос.ч.), ($\pm$)- α -липоевая кислота (Sigma-Aldrich, $\geq 98.0\%$), БОК-лизин (х.ч.), N_α -БОК-L-лизин, (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), N,N' -дициклогексилкарбодиимида (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), N,N -диметиламинопиридина (х.ч.), N -гидроксисукцинимид (Alfa Aesar, $\geq 98\%$), дигидрат цитрата натрия (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), CF_3COOH (ABCR, $\geq 99\%$), трифторуксусная кислота (х.ч.), дихлорметан (х.ч.) («Рангас», Испания). В качестве хиральных селекторов использовали: эремомицин гидрохлорид, предоставленный д.х.н. Староверовым С.М. (ЗАО «БиоХимМак СТ», Москва, Россия), ванкомицин гидрохлорид – лиофильно высушенный аптечный препарат производства ОАО «Красфарма» (Красноярск, Россия).

В качестве матриц для синтеза сорбентов использовали сополимеры стирола и дивинилбензола, характеристики которых представлены в табл. 4. **ПС-ДВБ-1** синтезирована и предоставлена д.х.н., проф. Пироговым А.В. (кафедра аналитической химии, химический факультет МГУ), **ПС-ДВБ-2** и **ПС-ДВБ-3** синтезирована и предоставлена к.х.н. Лошиным А.А. (кафедра аналитической химии, химический факультет МГУ), **ПС-ДВБ-4** производства компании «Техносорбент» (Россия).

Таблица 4. Характеристики используемых частиц ПС-ДВБ

Сорбент	Степень сшивки, %	S поверхности, $\text{м}^2/\text{г}$	Диаметр частиц, мкм	Средний диаметр пор, нм	Общий объём пор, $\text{см}^3/\text{г}$
ПС-ДВБ-1	50	300	3.3 ± 0.2	6	0.5
ПС-ДВБ-2	50	400	6.0 ± 0.5	3-5	0.4
ПС-ДВБ-3	50	300	5.5 ± 0.5	3-5	0.2
ПС-ДВБ-4	80	600	5.0 ± 0.5	20-30	0.5-0.8

Для приготовления подвижных фаз (ПФ) использовали ацетонитрил, метанол, («для хроматографии», «Panreac», Испания), триэтиламин (99%, «Acros Organics», США), уксусную кислоту («Panreac», Испания). Для приготовления буферных растворов брали точные навески твердых и жидких препаратов ацетата аммония (х.ч.) («Реахим», Россия), дигидрофосфата калия («Panreac», Испания), тригидрата гидрофосфата калия («Panreac», Испания), гидроксид натрия (х.ч.) («Реахим», Россия), трис(гидроксиметил)аминометана (ТРИС) (99.9%, «Helicon», Россия). Во всех экспериментах использовалась деионизированная вода.

В качестве исследуемых соединений использовали: *β-блокаторы*: атенолол, алпренолол, пиндолол, лабеталол, метопролол, окспренолол, надолол; *профены*: кетопрофен, ибупрофен, флурбипрофен, индопрофен, напроксен; *производные аминокислот*: трет-бутоксикаронильные (БОК) - производные: БОК-аланин, БОК-валин; карбобензоксиг (КБЗ) - производные: КБЗ-валин, КБЗ-аланин, КБЗ-лейцин, КБЗ-аспарагин, КБЗ-триптофан; бензоил-производные: бензоил-аланин, бензоил-валин, бензоил-фенилаланин; *нуклеозиды*: уридин, 5-метилуридин, 2-дезоксинуридин, урацил; *ароматические углеводороды*: этилбензол, толуол, бензол, фенантрен, антрацен («ч.д.а.», «Химстройснаб», Россия); *аминопиридины*: 2-аминопиридин, 3-аминопиридин, 4-аминопиридин, 2,3-диаминпиридин; *аминофенолы*: 2-аминофенол, 3-аминофенол; *алкалоиды пуринового ряда*: кофеин, теofilлин, теобромин; *α-фенилкарбоновые кислоты*: 2-метоксифенилуксусная кислота, 2-фенилпропионовая кислота, 3-фенилмасляная кислота, миндальная кислота; о-, м-, п-нитроанилины; тетрагидрозолин, хлорфенамин, меклизин, гидроксизин, орфенадрин, флаванон, 1,1-би-2-нафтол. Для анализа готовили растворы 10-20 мкг/мл в метаноле или ацетонитриле. Реактивы, для которых не указан изготовитель, были производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США).

1.2 Аппаратура

ВЭЖХ эксперименты проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (Япония), состоящем из насоса подачи растворителя (LC-20AB), дегазатора (DGU-20A5), термостата колонки (СТО-20А) и детектора с диодной матрицей (SPD-M20A). Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения Shimadzu LC Solution.

Все приготовленные подвижные фазы перед использованием дегазировали в ультразвуковой ванне («Сапфир 6580», Россия). Измерения pH водных растворов проводили с помощью pH-метра «Starter 2100» («OHAUS», Россия).

Хроматографические колонки с синтезированными сорбентами готовили суспензионным способом. Использовали стальные колонки размером 100×4.6 мм и 150×2.1 мм. Навеску сорбента вносили в 20 мл растворителя и гомогенизировали полученную суспензию в ультразвуковой ванне в течение 5 мин. Затем проводили заполнение колонки при помощи насоса «Knauer K-1900» с использованием в качестве набивочной фазы смеси метанол/деионизированная вода (50/50, об. %) при рабочем давлении 400 Бар. Объем набивочной фазы, проходящей через колонку, был не менее 350 мл. Для набивки колонки использовали 1.4-2 г сорбента.

Синтезированные наночастицы золота исследовали при помощи просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) JEOL JEM-2100 F/Cs/GIF/EDS (Jeol, Япония)¹. 1-2 мкл золя наночастиц наносили на медную сетку, покрытую формваром, высушивали и помещали в микроскоп.

Спектрофотометрические исследования проводили на двухлучевом спектрофотометре U-2900 (Hitachi, Япония).

Микрофотографии сорбентов получали на сканирующем электронном микроскопе JEOL JCM-6000 (Jeol, Япония), ускоряющее напряжение 20 кВ.

Для получения спектров диффузного отражения сухие образцы прессовали в таблетки и использовали сканирующий денситометр CS-9001PC («Shimadzu», Япония).

Элементный анализ проводили на анализаторе CHNS/O Perkin-Elmer Model 2400 Series II (Shelton, США)¹.

Концентрацию золота определяли с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой на приборе Agilent 4200 MP-AES («Agilent», США) с использованием стандартных образцов в диапазоне концентраций 0.1 мг/мл для калибровки.

Измерение площади поверхности и пористости сорбентов осуществляли при помощи низкотемпературной адсорбции азота при 77 К, для расчётов использовали методы Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ) и Барретта-Джойнера-Халенда (БДХ) соответственно. Измерения проводили на приборе Micromeritics Model ASAP 2020

¹ Оборудование приобретено за счёт средств Программы развития Московского университета.

(Norcross, США) для образцов, предварительно выдержанных в течение 24 ч при 100°C в вакууме перед записью их изотерм.

Спектры ЯМР снимали на спектрометре Avance 500 («Bruker», Германия) при комнатной температуре; химические сдвиги δ измеряли в мд по отношению к растворителю (CD₃OD: δ H = 3,31 м.д., δ C = 49,0 м.д.). Паттерны расщепления обозначены как t, триплет; m, мультиплет; br.s., широкий синглет. Строение синтезированных соединений установлено с помощью 1D ЯМР (¹H, ¹³C) и 2D ЯМР (HSQC) спектроскопии.

ИК-спектры записывали на ИК-Фурье-спектрометре Thermo Nicolet IR 200 («Thermo Fisher Scientific», США). Регистрация спектров проводилась при разрешении 4 см⁻¹, числе сканов 20. Образцы располагались на рабочей поверхности алмазного элемента внутреннего отражения (НПВО) с углом падения 45°.

Масс-спектры высокого разрешения записывали на времяпролетном масс-спектрометре Bruker microTOF-QTM с ионизацией электрораспылением (HRMS ESI-TOF) («Bruker», Германия).

1.3 Методики эксперимента

Методика 1 - синтез наночастиц золота (10 нм), стабилизированных цитрат-ионами (Au-цитрат)

Раствор HAuCl₄·3H₂O (75 мг, 0.2 ммоль) в воде (110 мл) нагревали до кипения. Быстро добавляли 1% раствор цитрата натрия (26.25 мл) при перемешивании реакционной смеси. Нагревание продолжали в течение 1 ч до перехода вишневого цвета раствора в темные тона. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученную стабильную суспензию НЧЗ использовали для дальнейших экспериментов.

Методика 2 - модифицирование поверхности сополимера стирола и дивинилбензола золотыми наночастицами, стабилизированными цитрат-ионами (ПС-ДВБ-Au-цитрат)

1.5 г частиц ПС-ДВБ помещали в круглодонную колбу, добавляли 30 мл раствора НЧЗ (10 нм) (или пропорциональные количества реагентов), приготовленных по методике 1, проводили перемешивание на магнитной мешалке. Спустя 12 ч частицы ПС-ДВБ приобрели характерную лиловую окраску. Полученный сорбент

отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре, промывали деионизованной водой и этиловым спиртом. Полученный сорбент высушивали в течение 24 ч на воздухе.

Методика 3 - модифицирование поверхности сополимера стирола и дивинилбензола с золотыми наночастицами L-цистеином (ПС-ДВБ-Аи-L-цистеин)

Навеску сополимера (2 г) смешивали при интенсивном перемешивании с 60 мл свежеприготовленных по методике 1 НЧЗ и перемешивали в течение 24 ч. Затем сополимер отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре, промывали водой и этиловым спиртом, высушивали на воздухе в течение 24 ч. Полученный сополимер суспендировали в 50 мл водно-этанольного раствора, содержащего 450 мг L-цистеина, и перемешивали в течение 24 ч. Затем суспензию фильтровали, и промывали вещество на фильтре последовательно водой и этиловым спиртом. Полученный сополимер высушивали в течение 24 ч.

Методика 4 - получение сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного НЧЗ, стабилизированными липоевой кислотой (ПС-ДВБ-Аи-липоевая кислота)

В круглодонной колбе при непрерывном перемешивании смешивали 3 г порошка ПС-ДВБ-Аи-цитрат, синтезированного по методике 2 и 200 мг липоевой кислоты в 70 мл деионизованной воды. Спустя 12 ч, порошок отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре, промывали деионизованной водой, этиловым спиртом и высушивали на воздухе. На ИК-спектре были обнаружены линии $3626-3334\text{ см}^{-1}$, соответствующие водородным связям COOH-OOC и линия 1709 см^{-1} , соответствующая CO карбоксильной группы.

Методика 5 - получение сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного НЧЗ, стабилизированными липоевой кислотой с привитым БОК-лизином (ПС-ДВБ-Аи-липоевая кислота-ВОС-Lys)

В круглодонной колбе при непрерывном перемешивании смешивали 1 г сорбента ПС-ДВБ-Аи-липоевая кислота, 0.1 г БОК-лизина, 35 мг N,N' -дициклогексилкарбодиимида, 3 мг N,N -диметиламинопиридина в 50 мл воды. Спустя 12 ч, порошок отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре, промывали деионизованной водой, этанолом и высушивали на воздухе. На ИК-спектре были обнаружены линии: $3612-3259\text{ см}^{-1}$ – водородные связи карбоксильной группы БОК-лизина; 3328 см^{-1} – группа NH БОК-лизина, присоединенного к липоевой кислоте; 1725 см^{-1} , 1702 см^{-1} , 1685 см^{-1} – один карбонил липоевой кислоты и 2 карбонила БОК-лизина.

Методика 6 - получение сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного НЧЗ, стабилизированными липоевой кислотой с привитым лизином (ПС-ДВБ-Аи-липоевая кислота-Lys)

К 4 мл 50% раствора трифторуксусной кислоты в дихлорметане добавляли 1 г порошка ПС-ДВБ-Аи-липоевая кислота-БОК-лизин. Перемешивание проводили в течение 40 минут. Затем, порошок отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре, промывали деионизованной водой, триэтиламином, этанолом и высушивали на воздухе. На ИК-спектре были обнаружены линии: $3589 - 3271 \text{ см}^{-1}$ – водородные связи карбоксильной группы лизина; 1720 см^{-1} и 1703 см^{-1} – 2 карбонила липоевой кислоты с привитым лизином.

Методика 7 – синтез конъюгата N_{α} -ВОС-защищенного L-лизина с ($\pm$) - α -липоевой кислотой

N,N'-дициклогексилкарбодиимид (0.21 г, 1.02 ммоль) добавляли к раствору ($\pm$) - α -липоевой кислоты (0.20 г, 0.97 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (0.11 г, 0.97 ммоль) в ацетонитриле (5.0 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 1.5 ч образовавшийся осадок отфильтровывали и фильтрат упаривали при пониженном давлении. Полученное желтое масло эфира (0.3 г, 1 ммоль) растворяли в смеси диоксан: натрий-фосфатный буфер, 3 : 1 (21 мл) и добавляли N_{α} -Вос-Lys-ОН (0.27 г, 1.1 ммоль). Через 12 ч к смеси добавляли 1 М HCl (2 мл) и затем экстрагировали дихлорметаном. Органические слои сушили над Na_2SO_4 и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем (CH_2Cl_2 : MeOH = от 100: 1 до 10: 1, $R_f = 0.50$) для получения N_{α} -ВОС-защищенного L-лизина с ($\pm$)- α -липоевой кислотой (213 мг, 48%, смесь двух диастереомеров, А - основной диастереомер, В - второстепенный диастереомер, А: В = 75: 25) в виде желтого масла.

Методика 8 – снятие ВОС-защиты - образование хирального селектора N6- (5-(1,2-дитиолан-3-ил) пентаноил) -L-лизин трифторацетат

1 мл CF_3COOH добавляли к раствору соединения, синтезированного по методике 7, (200 мг, 0.46 ммоль) в 1 мл дихлорметана. Смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 1 час реакционную смесь упаривали в вакууме и остаток повторно упаривали после добавления Et_2O с получением очень вязкого желтого масла (200 мг, 97%). Полученный продукт, представляющий собой смесь двух диастереомеров (А : В = 75 : 25), использовали без дополнительной очистки.

Методика 9 – иммобилизация селектора N6- (5- (1,2-дитиолан-3-ил) пентаноил) - L-лизин трифторацетат на ПС-ДВБ-Аи-цитрат

Частицы ПС-ДВБ-Аи-цитрат (2.1 г) добавляли к водному раствору (70 мл) соединения, полученного по методике 8, (310 мг) при комнатной температуре одной порцией. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов. После реакции твердое вещество отфильтровывали и промывали водой и метанолом и сушили на воздухе.

Методика 10 – синтез с боратным буферным раствором наночастиц золота, стабилизированных макроциклическим антибиотиком эремомицином (НЧЗ-Эремо)

33 мг $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ помещали в круглодонную колбу объемом 100 мл, затем приливали 24 мл 0.05 М боратного буферного раствора и перемешивали до полного растворения золотохлористоводородной кислоты; 0.88 г эремомицина разбавляли в 40 мл боратного буферного раствора, смешивали с раствором золота. Добавляли еще 16 мл боратного буферного раствора и перемешивали. Смесь нагревали в круглодонной колбе с обратным холодильником в течение 1.5-2 часов до образования темно-рубинового окраса.

Методика 11 – синтез с триэтиламином наночастиц золота, стабилизированных макроциклическим антибиотиком эремомицином (НЧЗ-Эремо(ТЭА))

17 мг $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяли в 43 мл дистиллированной воды, 10 мг эремомицина растворяли в 3 мл дистиллированной воды. Растворы смешивали и перемешивали в течение 30 мин на магнитной мешалке, а затем добавляли 0.1 мл триэтиламина (ТЭА). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. Раствор приобретал темно-рубиновый цвет через черно-фиолетовые тона.

Методика 12 – получение сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного НЧЗ, стабилизированными эремомицином (ПС-ДВБ-Аи-Эремо)

3 г микрочастиц ПС-ДВБ добавляли к 100 мл водного раствора стабилизированных эремомицином НЧЗ, полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре. Через 12 ч приготовленные частицы ПС-ДВБ-Аи-Эремо фильтровали через нейлоновую мембрану 0.22 мкм и промывали водой и метанолом.

Методика 13 - атомно-эмиссионное определение золота

К навеске образцов 0.100 г, при перемешивании добавляли 4 мл смеси HCl и HNO_3 в соотношении 3:1. После того, как порошок приобрел желтоватую окраску, его

отделяли от раствора фильтрованием на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном. Фильтрат разбавляли до 10.2 мл. Для построения градуировочной зависимости готовили образцы сравнения, содержащие 0.1 – 1.0 мг/мл золота, используя стандартный раствор HAuCl_4 .

Методика 14 - анализ лекарственного препарата «Кетонал»

Содержимое капсулы препарата «Кетонал» растворили в 50 мл ацетонитрила, суспензию ставили в ультразвуковую ванну на 20 мин, проводили фильтрацию с помощью шприцевого фильтра; 1 мл полученного фильтрата растворяли в 4 мл ПФ. Условия хроматографического определения ПФ АСН:ТЕАА (0.05 %, рН 7.0) – 95:5 об. %, скорость потока 0.1 мл/мин, $\lambda = 254$ нм.

1.4 Техника эксперимента

Перед проведением экспериментов хроматографическую колонку кондиционировали в течение 30 мин, промывая подвижной фазой. После окончания эксперимента колонку промывали в течение 30 мин смесью ацетонитрил-вода (80:20, об.). Скорость подачи элюента составляла 0.1-1.0 мл/мин, ввод пробы осуществляли шприцем объемом 50 мкл при помощи петлевого дозатора (инжектора) с петлёй объёмом 20 мкл. Хроматографические эксперименты проводились при комнатной температуре колонки, если не указано другое.

Определение хроматографических параметров разделения. Для полученных удовлетворительных хроматограмм рассчитывали следующие хроматографические параметры по приведённым формулам:

исправленное время удерживания (t'_R)

$$t'_R = t_R - t_m$$

t_m - мертвое время;

коэффициент емкости (k')

$$k' = \frac{t'_R}{t_m}$$

коэффициент селективности (α)

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

t_{R1}, t_{R2} - времена удерживания компонентов;

разрешение пиков (R_s)

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

w_1, w_2 - значение ширины пика у основания;

число теоретических тарелок (N)

$$N = 5.55 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

$w_{1/2}$ - значение ширины пика на половине высоты.

Время удерживания неудерживаемых компонентов ("мертвое время") определяли по системному пику на полученных хроматограммах.

Расчет концентрации НЧЗ в сорбентах. Рассчитывали массу одной НЧЗ по формуле:

$$m_{\text{НЧЗ}} = \rho \frac{4}{3} \pi r^3$$

ρ – плотность золота равная 19.0 г/см³, r – средний радиус НЧЗ.

Количественно определяли содержание золота в сорбентах методом АЭС, из этих данных рассчитывали содержание НЧЗ на грамм сорбента по формуле:

$$C_{\text{НЧЗ}} = \frac{m_{\text{Au}}}{m_{\text{НЧЗ}}}$$

m_{Au} – масса золота на 1 г сорбента.

Расчет по данным элементного анализа. По результатам элементного анализа сорбентов получали содержание элементов, из которого рассчитывали содержание модификаторов по формуле:

$$C\left(\frac{\text{мкмоль}}{\text{г}}\right) = 10000 \frac{P_{\text{Эл}}}{M_{\text{Эл}} n_{\text{Эл}}},$$

где $P_{\text{Эл}}$ – содержание определяемого элемента в масс. %, $M_{\text{Эл}}$ – молярная масса элемента, $n_{\text{Эл}}$ - число атомов данного элемента в молекуле модификатора.

1 Сополимер стирола и дивинилбензола, модифицированный наночастицами золота с аминокислотами ²

Пиркл и соавторы впервые предложили новое поколение неподвижных фаз с N-3,5-динитробензоильными производными аминокислот, а именно фенилглицина, валина и лейцина, иммобилизованными на силикагелевых носителях, которые показали способность разделять широкий спектр рацематов [119]. С тех пор было предложено много новых вариантов сорбентов типа Пиркла с аминокислотами [120]. Для их синтеза использовали различные производные, например, N-4-(2,5,6-трихлор-1,3-дициано)фенилпроизводные L- α -аминокислот с использованием аминопропилового или γ -L-аланиламинопропилсиликагеля в качестве хроматографической подложки; N-3,5,6-трихлор-2,4-дицианофенил-L- α -аминокислоты, связанные с γ -аминопропилсиликагелем; N-3,5,6-трихлор-2,4-дицианофенил-L-аланил-(3-триэтоксисилил)пропиламид, иммобилизованный на немодифицированный силикагель [121]. Дополнительные сайты адсорбции на неподвижных фазах могут повышать удерживание и снижать энантиоселективность. Исходя из этого были сделаны попытки упростить исходные ХНФ Пиркла с аминокислотами, синтезировав их без областей, ответственных за конкурентные взаимодействия с оптически активными веществами. Такие ХНФ показали увеличение энантиоселективности и уменьшение времени анализа [122]. Тем не менее, получение такого рода ХНФ трудоёмко, требует комплексного, многостадийного синтеза. Иммобилизацию хиральных селекторов проводят на силикагелевые матрицы, такие НФ обладают сильно полярными свойствами, что обуславливает работу с ними преимущественно в нормально-фазовом режиме хроматографии, применение которого

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:

1. Просунцова Д. С., Ананьева, И. А., Плодихин, А. Ю., Белоглазкина, Е. К., Шпигун, О. А. Синтез и исследование сорбента для ВЭЖХ на основе сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота // Сорбционные и хроматографические процессы. 2019. Т. 19, № 2. С. 139–148. ИФ (Scopus) – 0.308. 60%.
2. D. S. Prosuntsova, Plodukhin, A. Y., Ananieva, I. A., Beloglazkina, E. K., and Nesterenko, P. N. New composite stationary phase for chiral high-performance liquid chromatography // Journal of Porous Materials. 2021. Vol. 28. P. 407–414. IF (Web of Science) – 2.523. 50%.

сейчас сокращается. Исследование подхода к иммобилизации аминокислот через наночастицы золота на полимерные подложки может способствовать преодолению данных проблем.

1.1 Синтез сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота с аминокислотами

1.1.1 Синтез наночастиц золота, стабилизированных цитрат-ионами

Для синтеза НЧЗ с целью их дальнейшей иммобилизации на носитель был выбран метод Туркевича [123] как наиболее подходящий. Этот метод простой, не требует дополнительного оборудования и позволяет получить сферические монодисперсные наночастицы. В работе синтезировали НЧЗ размером 10 нм по отработанной методике (методика 1). Цитрат натрия выступает одновременно в качестве восстановителя и стабилизатора образующихся наночастиц. Схема синтеза приведена на рис. 22.

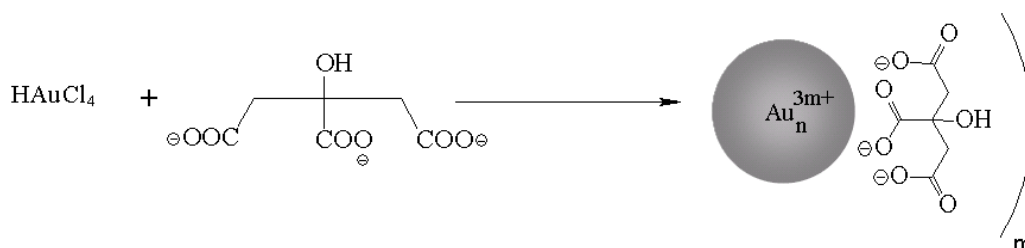


Рис. 22. Схема синтеза НЧЗ, стабилизированных цитрат-ионами.

1.1.2 Сорбция НЧЗ на ПС-ДВБ

Как показал анализ литературных данных, большее внимание уделяется иммобилизации НЧЗ на поверхность силикагеля для использования в качестве неподвижных фаз в ВЭЖХ, однако полимерные подложки обладают рядом преимуществ. Информация об адсорбции НЧЗ на предварительно нефункционализированную поверхность полимерных матриц неоднозначна, поэтому интерес состоял в получении сорбента на основе нефункционализированного полимера, модифицированного НЧЗ.

На первом этапе синтеза проводили адсорбцию наночастиц золота, стабилизированных цитрат-ионами, на поверхность матрицы сополимера стирола и дивинилбензола. В данном эксперименте использовали ПС-ДВБ (1) с размером частиц 3.3 мкм, степенью сшивки 50%, площадью функциональной поверхности 300 м²/г,

средним диаметром пор 6 мкм. Синтез проводили по методике 2, схема синтеза представлена на рис. 23. Количество адсорбированного золота определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии.

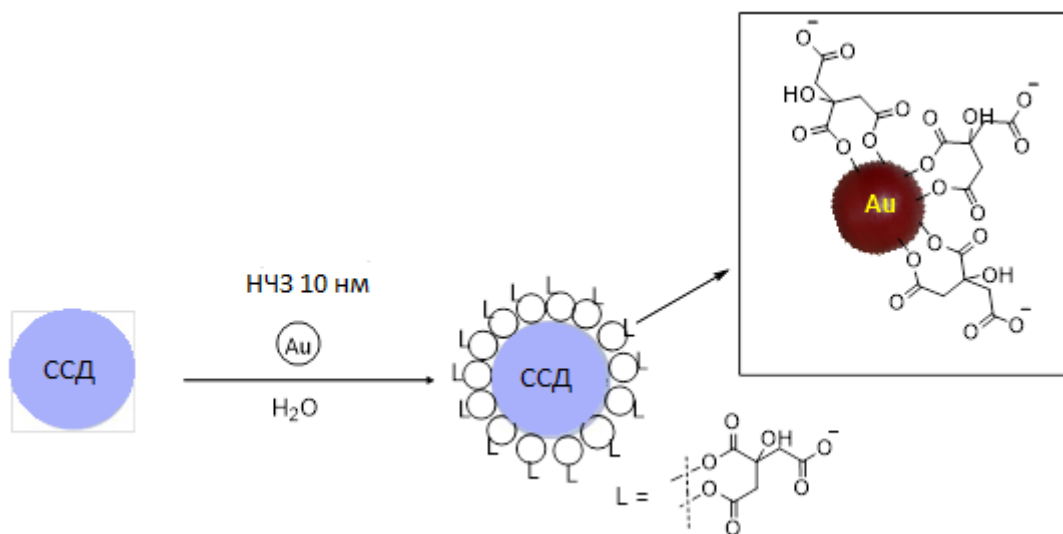


Рис. 23. Схема синтеза ПС-ДВБ-Ау-цитрат.

1.1.3 Синтез сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота, стабилизированными L-цистеином

Тиолы обладают способностью спонтанно образовывать самоорганизованные монослои с золотыми частицами, что делает их идеальными веществами для иммобилизации и стабилизации НЧЗ. Эти тиолы можно добавлять либо непосредственно в реакционную среду, либо заменяя цитрат-ионы в дальнейшем. Для данного исследования мы создали полимерный сорбент, который был модифицирован НЧЗ, стабилизированными L-цистеином. Этот стабилизатор был выбран потому, что он обеспечивает ковалентную связь с золотом, гарантируя стабильность сорбента, и потому, что он имеет функциональные группы, которые могут взаимодействовать с различными типами органических соединений. Это было важно для изучения хроматографических свойств новых сорбентов на основе НЧЗ для использования в хроматографии. Целью исследования было всестороннее изучение этих свойств, и для достижения этой цели был необходим подходящий стабилизатор.

Для получения целевого сорбента проводили замену цитрат-ионов на L-цистеин по методике 3. Полученное вещество винного оттенка высушивали на воздухе в течении 24 ч.

1.1.4 Синтез сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота, стабилизированными Липоевая кислота-L-лизин

Был синтезирован ПС-ДВБ с липоевой кислотой с привитым лизином. Целью получения такого сорбента было введение спейсера, увеличивающего длину углеводородной цепочки и отодвигающего функциональный модификатор от покрытой НЧЗ поверхности матрицы полимера. Получение данного сорбента проводили двумя способам.

В первом случае в ходе синтеза по методике 4 проводили последующую замену цитрат-ионов на липоевую кислоту (схема синтеза приведена на рис. 24). Липоевая кислота содержит нейтральный серосодержащий фрагмент, который отвечает за сильную адгезию хирального селектора на наночастицах золота путем образования ковалентных связей Au-S. Дальнейшие исследования были проведены с промежуточным сорбентом ПС-ДВБ-Au-липовая кислота. Каждую стадию синтеза подтверждали методом ИК-спектроскопии. На ИК-спектре были обнаружены линии $3626-3334\text{ см}^{-1}$, соответствующие водородным связям COOH-OOC и линия 1709 см^{-1} , соответствующая колебаниям CO карбоксильной группы.

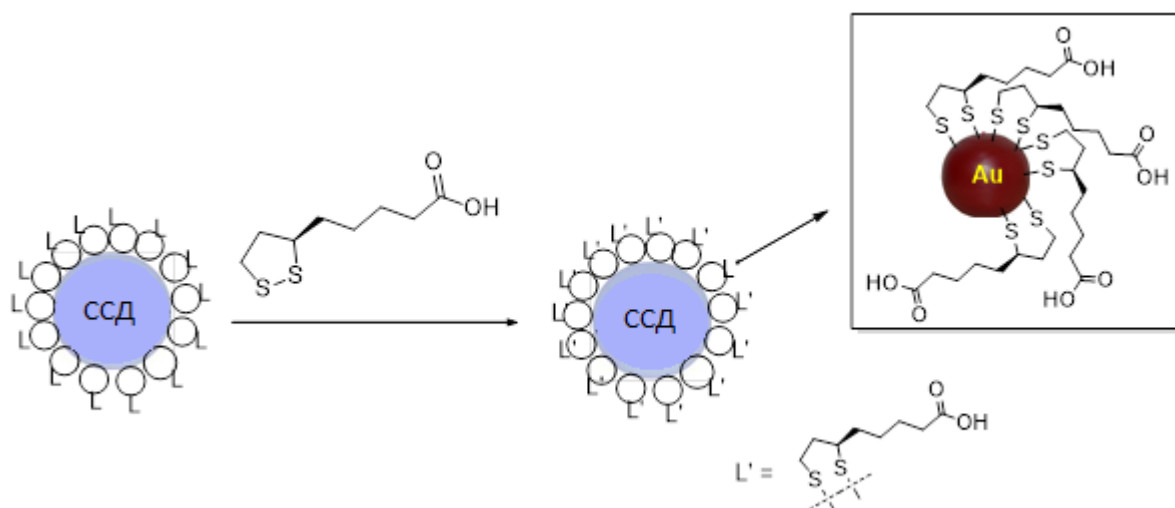


Рис. 24. Схема синтеза сорбента ПС-ДВБ-Au-липовая кислота.

Лизин является аминокислотой, которая содержит амино- и кислотную функциональные группы, а также углеводную цепочку из 5-ти атомов, что позволяет предположить возникновение дополнительных взаимодействий между аналитами и

поверхностью неподвижной фазы. Оптически активный остаток L-лизина может обеспечивать хиральное распознавание оптических изомеров. Образование пептидной связи между карбоксильной группой в молекуле липоевой кислоты и ω -аминогруппами в L-лизине является оптимальным способом получения целевого хирального селектора. Для связывания правильных функциональных групп установлена процедура синтеза пептидов с использованием N α -БОК-защищенного (трет-бутоксикарбонильная защитная группа) L-лизина [124]. По методике 5 была проведена реакция с сорбентом ПС-ДВБ-Аи-липовая кислота и БОК-лизином. На ИК-спектре были обнаружены линии: 3612-3259 см⁻¹ – водородные связи карбоксильной группы БОК-лизина; 3328 см⁻¹ – группа NH БОК-лизина, присоединенного к липоевой кислоте; 1725 см⁻¹, 1702 см⁻¹, 1685 см⁻¹ – один карбонил липоевой кислоты и два карбонила БОК-лизина.

Далее по методике 6 проводили снятие БОК-защиты и образование сорбента ПС-ДВБ-Аи-липовая кислота-Lys, схема реакции приведена на рис. 25. Данные ИК-спектроскопии подтверждают успешную модификацию. На ИК-спектре были обнаружены линии: 3589 – 3271 см⁻¹ – водородные связи карбоксильной группы лизина; 1720 см⁻¹ и 1703 см⁻¹ – два карбонила липоевой кислоты с привитым лизином.

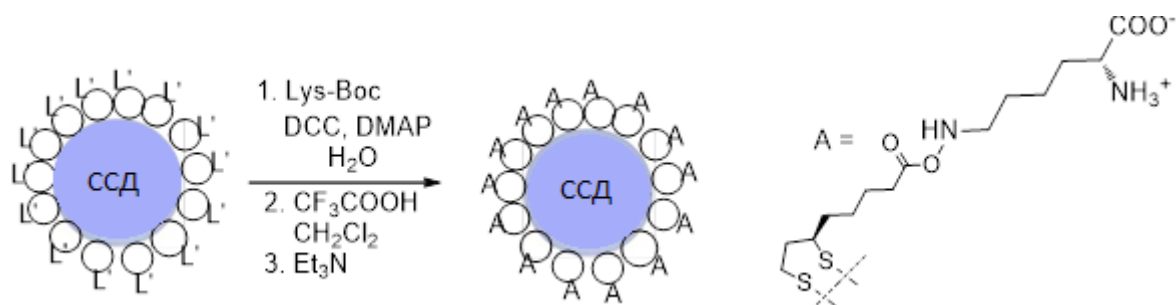
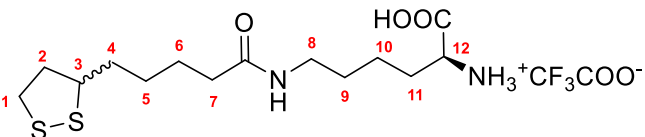


Рис. 25. Схема синтеза сорбента ПС-ДВБ-Аи-липовая кислота-Lys.

Во втором случае сначала получали аддукт липоевой кислоты с лизином по методике 7. N-гидроксисукцинимид использовали для активации карбоксильной группы в молекуле липоевой кислоты и проводили реакцию с N α -ВОС-защищенным L-лизином. Полученный конъюгат 1 очищали колоночной хроматографией на силикагеле с последующим удалением N α -ВОС-группы реакцией с трифторуксусной кислотой в CH₂Cl₂ с получением селектора 2 (методика 8). Схема синтеза представлена на рис. 26. Продукт 2 использовали для дальнейших экспериментов без очистки.

Таблица 6. ^1H и ^{13}C ЯМР, ИК, МС спектры хирального селектора липоевая кислота-L-лизин

N6- (5- (1,2-дителиолан-3-ил) пентаноил) -L-лизин трифторацетат	
	
^1H ЯМР CD_3OD 500 МГц	$\delta = 1.45\text{--}1.74$ (m, 10H, $\text{CH}_2(4)$, $\text{CH}_2(5)$, $\text{CH}_2(6)$, $\text{CH}_2(8)$, $\text{CH}_2(10)$, A+B), $1.86\text{--}2.05$ (m, 3H, $\text{CH}(2)$, $\text{CH}_2(11)$, A+B), $2.18\text{--}2.26$ (m, 2H, $\text{CH}_2(7)$, A+B), $2.30\text{--}2.42$ (m, 1H, $\text{CH}(2)$, B), $2.30\text{--}2.42$ (m, 1H, $\text{CH}(2)$, A), $3.08\text{--}3.24$ (m, 4H, $\text{CH}_2(1)$, $\text{CH}_2(9)$, A+B), $3.42\text{--}3.49$ (m, 1H, $\text{CH}(3)$, B), $3.55\text{--}3.63$ (m, 1H, $\text{CH}(3)$, A), 3.97 (t, 1H, $\text{CH}(12)$, A+B)
^{13}C ЯМР CD_3OD 125 МГц	$\delta = 21.5$ (CH_2 , A+B), 24.8 (CH_2 , A+B), 27.95 (CH_2 , A), 28.02 (CH_2 , B), 29.3 ($\text{CH}_2(11)$, A+B), 33.8 ($2\times\text{CH}_2$, A+B), 35.0 (CH_2 , A+B), 37.5 ($\text{CH}_2(1)$, $\text{CH}_2(9)$, B), 37.9 ($\text{CH}_2(1)$, $\text{CH}_2(9)$, A), 39.4 ($\text{CH}_2(2)$, A+B), 52.0 ($\text{CH}(12)$), 55.7 ($\text{CH}(3)$), 170.0 (COOH), 174.2 (CON), CF_3COO and CF_3COO not observed.
ИК НПВО, cm^{-1}	3327 (ν_{OH} , ν_{NH} , ν_{NH}), 2933 (ν_{CH}), 2862 (ν_{CH}), 1927 ($\nu_{\text{CF}_3\text{C}(\text{O})\text{O}}$), 1712 ($\nu_{\text{C=O}}$, карбоксильная группа), 1628 ($\nu_{\text{C=O}}$, амид), 1202 (ν_{CF}).
HRMS ESI-TOF	$m/z = 335.1451$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (335.1458 для $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2^+$).

ПС-ДВБ-Au получали по методике 2, повторяя процедуру три раза для большего покрытия поверхности полимерных частиц наночастицами золота. Модификацию хроматографического носителя проводили путём интенсивного перемешивания суспензии ПС-ДВБ-Au в водном растворе соединения липоевой кислоты с L-лизином по методике 9 (рис. 27). Иммунизация липоевой кислоты происходит при комнатной температуре, при этом образуется дисульфидное соединение с поверхностью золота. Адсорбция хирального селектора подтверждена данными элементного анализа. Результат элементного анализа: 0,99% S, что соответствует 0,16 ммоль/г иммобилизованного хирального селектора.

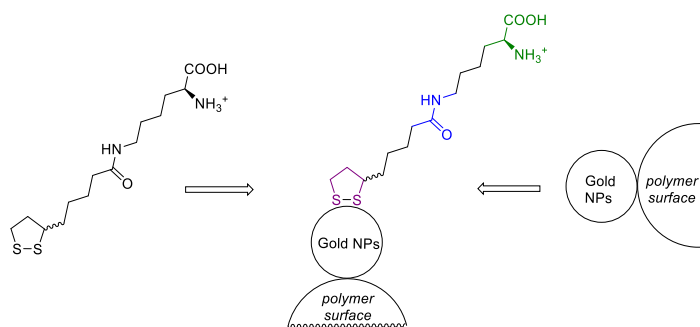


Рис. 27. Схема иммобилизации хирального селектора липоевая кислота-L-лизин.

1.2 Изучение физико-химических свойств сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота с аминокислотами

Для подтверждения модификации исходных матриц, характеристики частиц и оценки их свойств полученные сорбенты изучали различными физико-химическими методами.

1.2.1 Атомно-эмиссионная спектроскопия

Для нахождения количества золота, адсорбировавшегося на поверхность полимера, использовали метод атомно-эмиссионной спектроскопии. Для всех исследуемых сорбентов измеряли количество золота на стадии первичной модификации ПС-ДВБ наночастицами золота, стабилизированными цитрат-ионами (табл. 7). В качестве матрицы использовали *ПС-ДВБ-1* со степенью сшивки 50%, площадью поверхности 300 м²/г, диаметром частиц 3.3 мкм. Наблюдались существенные различия в количестве золота в полученных сорбентах в следствие использования разного соотношения ПС-ДВБ и объёма раствора НЧЗ с одинаковой концентрацией для модификации. В случае с сорбентом ПС-ДВБ-Аu-ЛК-L-Лизин модификацию исходной матрицы НЧЗ повторяли три раза.

Таблица 7. Количество золота в полученных сорбентах

Сорбент	Аu, мг/г	НЧЗ на грамм
ПС-ДВБ-Аu-L-цистеин	0.18	1.8·10 ¹³
ПС-ДВБ-Аu-ЛК-Lys	0.914	9.14·10 ¹³
ПС-ДВБ-Аu-ЛК-L-Лизин	21.6	2.16·10 ¹⁵

Масса одной НЧЗ примерно равна $1.0 \cdot 10^{-17}$ г, если принять средний размер частиц 10 нм и плотность металлического золота 19.0 г/см³. Исходя из этих данных можно рассчитать концентрацию НЧЗ, иммобилизованных на матрицу ПС-ДВБ. Данные представлены в табл. 7.

1.2.2 Метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)

Поверхностные свойства хроматографического носителя играют важную роль в эффективности разделения и селективности, а также вносят существенный вклад в параметры удерживания в жидкостной хроматографии.

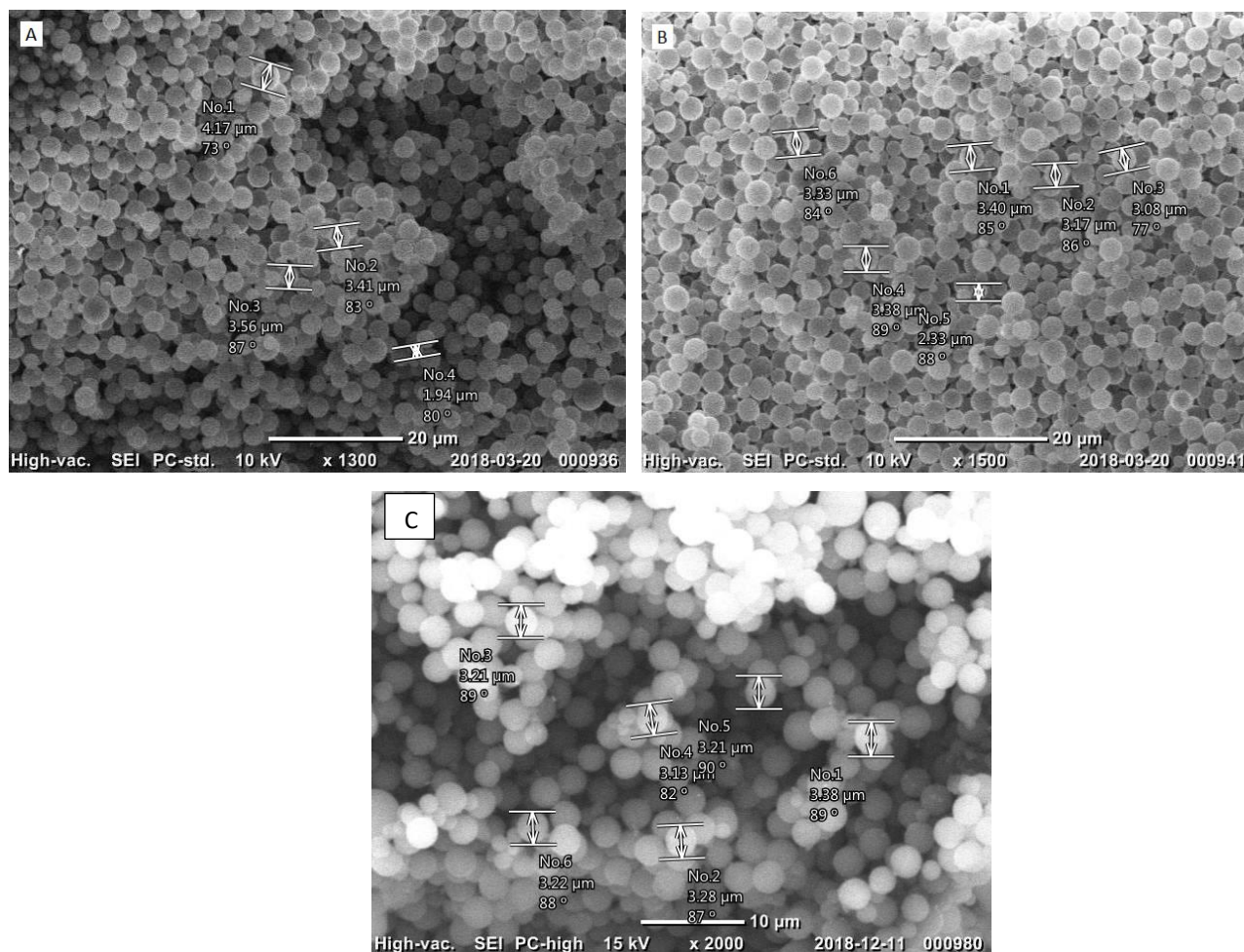


Рис. 28. Микрофотографии ПС-ДВБ-Au-L-цистеин (А), ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys (В), ПС-ДВБ-Au-ЛК-L-Лизин (С).

Частицы приготовленных композитов исследовали с помощью СЭМ. На рис. 28 представлены микрофотографии сорбентов, полученные методом СЭМ. Как видно из рисунка, разрушения или агрегации частиц ПС-ДВБ не происходит при модификации матрицы во всех случаях. Частицы сорбентов имеют сферическую форму и одинаковый размер от 2 до 4 мкм, что указывает на то, что сорбент не претерпел каких-либо значительных изменений формы во время модификаций.

Как видно из рис. 29, на котором приведена микрофотография поверхности ПС-ДВБ-Au-L-цистеин, НЧЗ достаточно равномерно адсорбировались на нефункционализированную поверхность ПС-ДВБ, при этом имеется небольшое количество золотых агрегатов на поверхности.

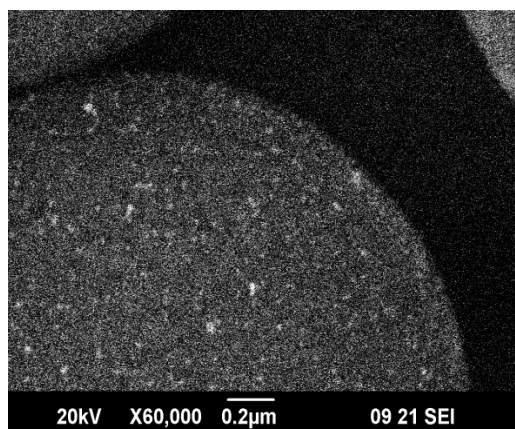


Рис. 29. Микрофотография сорбента ПС-ДВБ–Au–L-цистеин, полученная методом СЭМ.

На рис. 30 представлена микрофотография сорбента ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys и карта распределения золота на поверхности сополимера. Наблюдается равномерное распределение НЧЗ по поверхности сорбента.

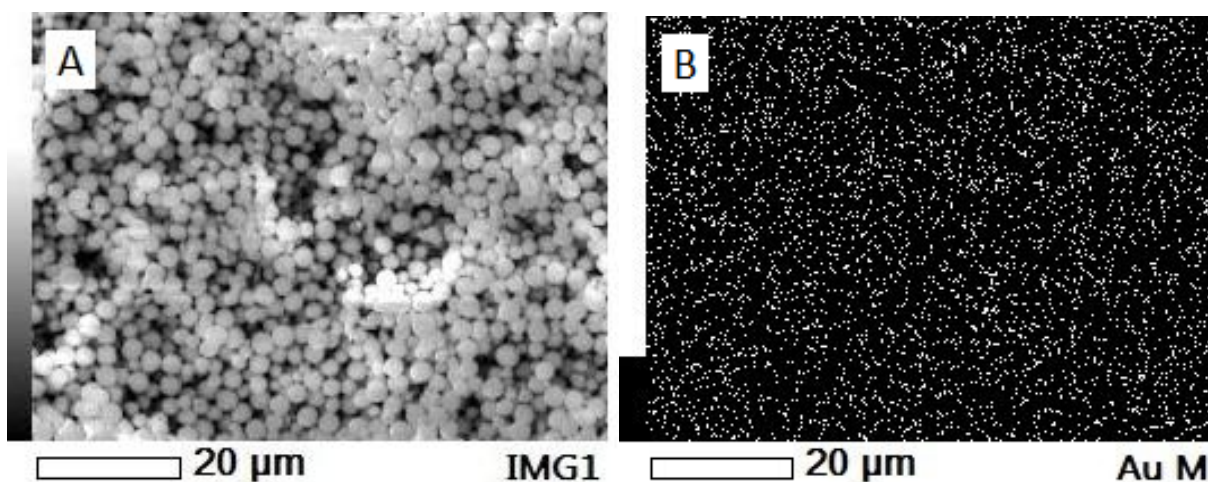


Рис. 30. Микрофотография ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys (A), и карта распределения золота по поверхности сополимера (B), полученные методом СЭМ.

1.2.3 Спектроскопия диффузного отражения

Спектроскопию диффузного отражения использовали для исследования полученных сорбентов. Спектры ДО снимали в видимой области относительно немодифицированного ПС-ДВБ. На рис. 31 видно, что для всех трех сорбентов в спектре наблюдается максимум поглощения в районе 530 нм, что свидетельствует о наличии наночастиц золота в неагрегированном состоянии на поверхности исследуемых сорбентов [125]. Для сорбента ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys максимум менее выражен и уширяется в длинноволновую область, что говорит о наличии агрегатов золота на поверхности сорбента [125].

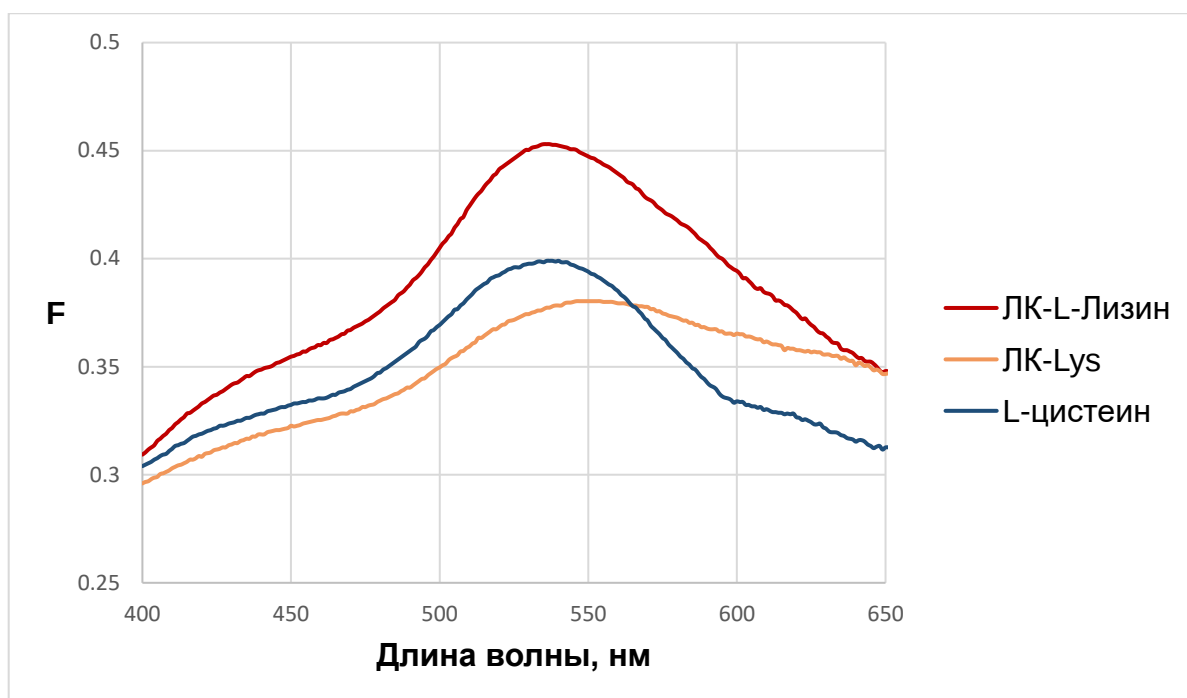
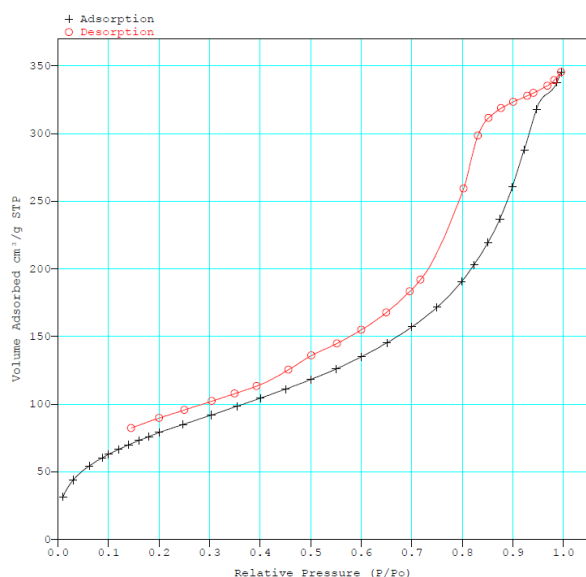


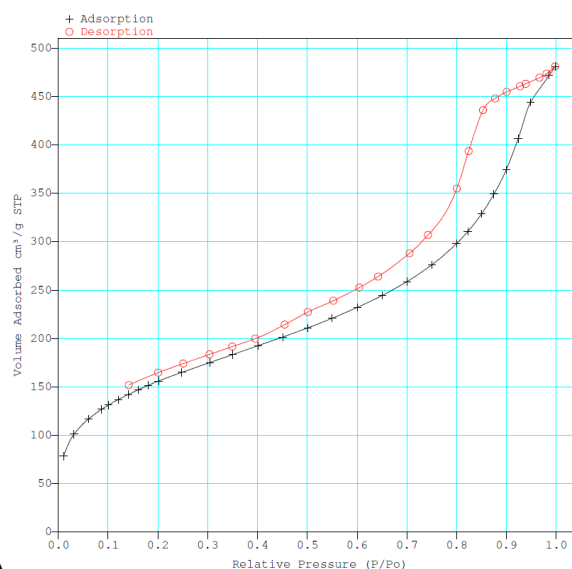
Рис. 31. Спектры диффузного отражения ПС-ДВБ-Au-L-цистеин, ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys, ПС-ДВБ-Au-ЛК-L-Лизин.

1.2.4 Метод низкотемпературной адсорбции азота

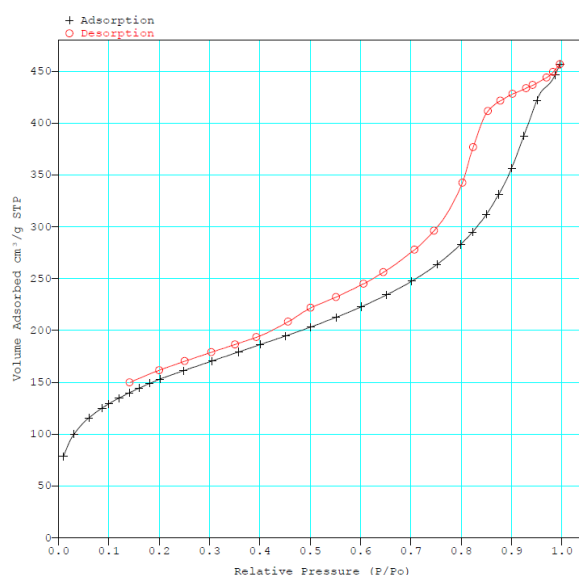
Пористая структура неподвижной фазы является важным фактором, влияющим на ее хроматографические характеристики. Оценку параметров поверхности сорбентов проводили методом низкотемпературной адсорбции азота. Строили изотермы сорбции/десорбции при температуре кипения жидкого азота. Использовали режим статической адсорбции, который включал полное уравнивание после каждой загрузки адсорбата. Объем пор сорбента рассчитывали по верхнему плато изотермы адсорбции, которое соответствует полному заполнению пор. Для расчёта удельной площади поверхности применяли метод Брунауэра-Эмметта-Теллера, для расчёта характеристик пор использовали метод Баррета-Джойнера-Халенды (ВНН). Изотермы сорбции для всех сорбентов имеют форму, характерную для пористых структур (типы IV по классификации ИЮАК), содержащую петлю гистерезиса, что отражает протекание процесса капиллярной конденсации в мезопорах. Выгнутый характер начального участка указывает на сильное взаимодействие адсорбат-адсорбент. На рис. 32 представлены изотермы сорбции/десорбции для исходного ПС-ДВБ, ПС-ДВБ после модификации НЧЗ и ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys. Можно наблюдать, что при модификации форма изотерм почти не изменяется.



А



Б



В

Рис. 32. Изотермы сорбции/десорбции, полученные методом низкотемпературной адсорбции азота для ПС-ДВБ (А), ПС-ДВБ-Аu (Б), ПС-ДВБ-Аu-ЛК-Lys (В).

Из построенных изотерм сорбции были рассчитаны площадь поверхности сорбентов, площади микропор, объем пор, объём микропор, средний диаметр пор (табл. 8, табл. 9). Диаметр пор в приведённых данных рассматривается в сравнении для идентичных условий снятия изотерм и для одинаковой исходной матрицы, а не в абсолютных значениях, так рассчитывается средний диаметр всех пор в том числе микропор. Из табл. 8 видно, что после адсорбции НЧЗ площадь поверхности сорбента значительно увеличивается, также увеличивается объём пор, а средний диаметр пор уменьшается. Это может быть связано с большим отношением площади поверхности к объёму иммобилизованных НЧЗ, что привело к увеличению площади поверхности, но заполнение пор исходной матрицы ПС-ДВБ и образование новых пор между частицами

золота уменьшает средний размер пор. В пользу этого вывода свидетельствует увеличение площади и объёма микропор.

Таблица 8. Физические характеристики сорбентов с трёхкратным покрытием НЧЗ по результатам исследования пористости

Сорбент	S поверхности, м ² /г	S микропор, м ² /г	V пор, см ³ /г	V микропор, см ³ /г	Средний диаметр пор, Å
ПС-ДВБ	300	0	0.492	0	74
ПС-ДВБ-Au	570	30	0.687	0.006	66
ПС-ДВБ-Au- ЛК-L-Лизин	430	0	0.587	0	67

Дальнейшая иммобилизация аддукта липоевой кислоты с L-лизином приводит к снижению площади поверхности и объёма пор по сравнению с ПС-ДВБ-Au, также снижается площадь и объём микропор, что говорит о перекрывании части пор модификатором (табл. 9). Однако площадь поверхности ПС-ДВБ-Au-ЛК-L-Лизин остаётся значительно больше площади поверхности изначальной матрицы. Площадь поверхности и объём пор для ПС-ДВБ-Au-L-цистеин увеличиваются не сильно по сравнению с немодифицированным ПС-ДВБ. Это может быть в следствие меньшего количества иммобилизованных НЧЗ для данного сорбента. Замена цитрат-ионов на липоевую кислоту, содержащую углеродную цепочку из пяти атомов, ведёт уже к снижению площади поверхности и объёма пор. Однако дальнейшая реакция сорбента ПС-ДВБ-Au-ЛК с БОК-L-лизином и снятие БОК-защиты в результате дает резкое увеличение площади поверхности и объёма пор, также увеличивается объём микропор, а средний диаметр пор уменьшается. Это может говорить об образовании разветвлённой поверхности после модификации. На рис. 33 приведены кривые распределения значений диаметра пор для исходной матрицы ПС-ДВБ, модифицированных НЧЗ частиц и ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys.

Таблица 9. Физические характеристики сорбентов с однократным покрытием НЧЗ по результатам исследования пористости

Сорбент	S поверхности, м ² /г	S микропор, м ² /г	V пор, см ³ /г	V микропор, см ³ /г	Средний диаметр пор, Å
---------	-------------------------------------	----------------------------------	------------------------------	-----------------------------------	------------------------------

ПС-ДВБ	300	0	0.492	0	74
ПС-ДВБ-Au-L-цистеин	310	0	0.517	0	75
ПС-ДВБ-Au-ЛК	270	0	0.488	0	77
ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys	550	0	0.653	0.014	66

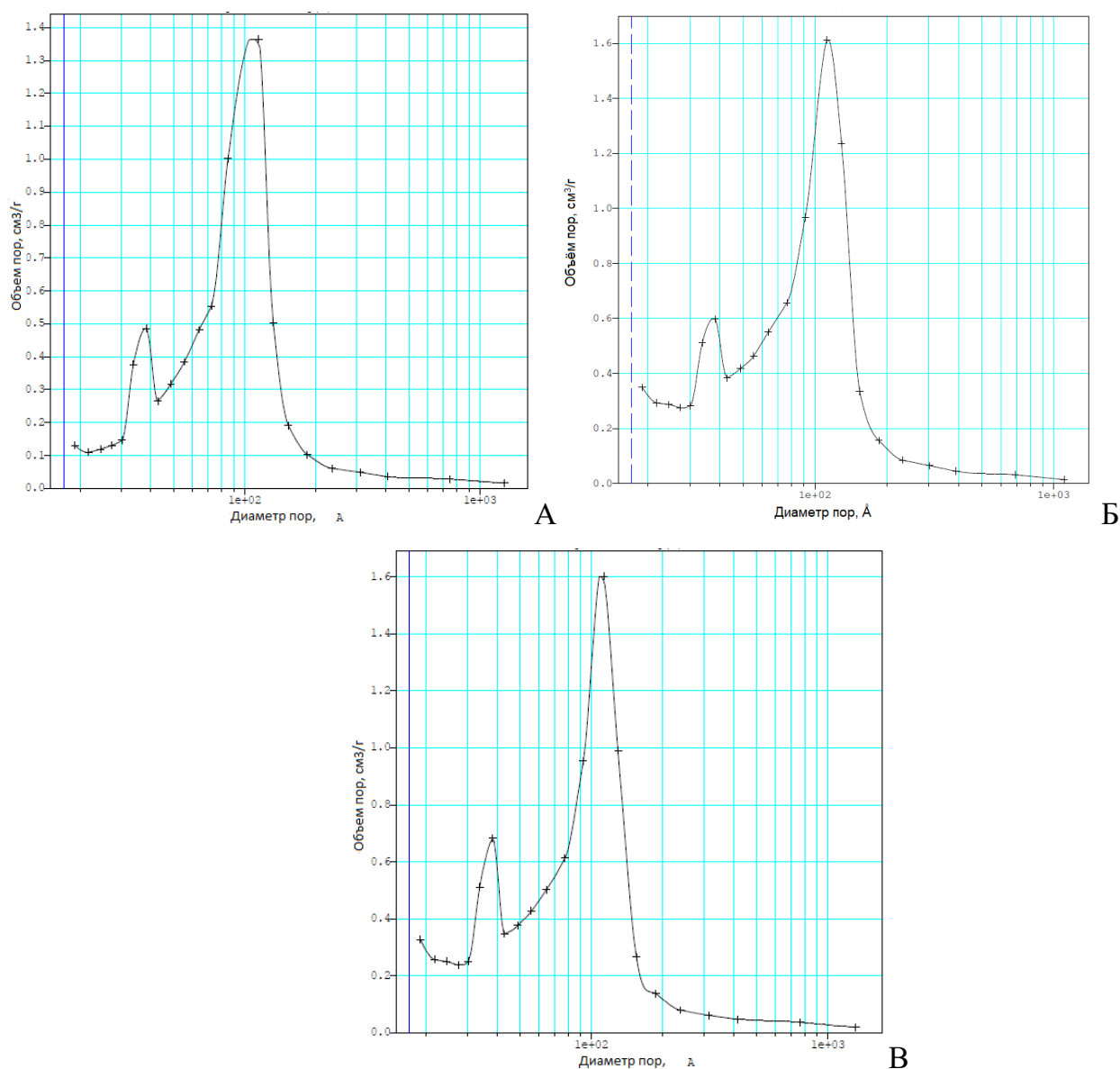


Рис. 33. Кривые распределения значений диаметра пор для сорбентов: ПС-ДВБ (А), ПС-ДВБ-Au (Б), ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys (В).

Для всех синтезированных сорбентов наблюдается узкое распределение пор по размеру с максимумом в районе 10 нм. Как можно наблюдать, в следствие модификации распределение пор по размерам немного сужается. Таким образом, покрытие полимерной матрицы ПС-ДВБ наночастицами золота ведет к существенному

увеличению площади функциональной поверхности подложки, что является важным преимуществом при создании сорбентов, так как обеспечивает увеличение хроматографической ёмкости неподвижных фаз.

1.3 Исследование хроматографических свойств сорбентов ПС-ДВБ-Au-L-цистеин и ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys

1.3.1 Вклад гидрофобных взаимодействий в механизм удерживания на синтезированных сорбентах

В методе ВЭЖХ большинство разделений базируется на гибридном механизме взаимодействия аналитов с сорбентом, обеспечивающим большее или меньшее удерживание компонентов в колонке. Разделение сорбатов благодаря взаимодействиям одинаковой природы встречаются нечасто. Для веществ разного строения и молекулярной массы при гибридном механизме удерживания необходимо оценивать вклад в удерживание и разделение всех возможных типов механизмов - адсорбции, распределения, эксклюзии и других. Для лучшего понимания разделения в ВЭЖХ разделение с доминированием одного из механизмов, следует рассматривать как принадлежащее к одному из видов ВЭЖХ [126].

Для понимания и представления механизмов удерживания на синтезированных сорбентах и немодифицированном ПС-ДВБ в работе было проведено исследование удерживания ряда тестовых соединений. Гидрофобность веществ оценивалась по параметрам гидрофобности Ханша ($\log P$, $\log D$). P представляет собой коэффициент распределения вещества в системе 1-октанол – вода, D - зависящий от pH коэффициент распределения вещества с учетом всех ионизованных форм в системе 1-октанол – вода [127]. На основании литературных данных [128] были выбраны тестовые вещества: толуол ($\log P=2.68$), уридин ($\log P=-1.61$), 5-метилуридин ($\log P=-1.02$) и 2-дезоксинуридин ($\log P=-1.26$). Проведено хроматографическое определение данных веществ на колонках, заполненных модифицированными сорбентами, при элюировании ПФ ацетонитрил/буферный раствор ацетата аммония (20 mM, pH=4.7) 90/10 (об. %). Было установлено, что все вещества за исключением толуола элюировались с мертвым объемом колонки. Толуол обладает наибольшим значением $\log P$, следовательно, и наибольшей гидрофобностью. На основании полученных

данных видно, что в удерживание веществ на полученных сорбентах вносит большой вклад гидрофобная матрица, вклад гидрофильных взаимодействий незначителен.

Для оценки гидрофобности синтезированных сорбентов исследовались закономерности удерживания ряда гидрофобных соединений: бензол, фенантрен, антрацен, тетрагидрозолин, хлорфенамин, меклизин, гидроксизин, орфенадрин, флаванон, 1,1-би-2-нафтол.

Таблица 10. Факторы удерживания (k'), число теоретических тарелок (N), параметры гидрофобности ($\log P$) исследуемых соединений. ПФ: ацетонитрил/буферный раствор ацетата аммония (20 мМ, рН=4.7) 90/10 (об. %)

Исследуемые вещества	LogP	Неподвижные фазы							
		-L-цистеин		-ЛК-Lys		-ЛК		ПС-ДВБ	
		k'	N тт/м	k'	N тт/м	k'	N тт/м	k'	N тт/м
Бензол	2.22	1.40	4265	1.64	7306	1.53	8275	1.44	9044
Фенантрен	4.68	10.52	2288	10.85	3565	10.88	3625	10.07	3859
Антрацен	4.68	11.74	1446	12.26	2210	12.18	2632	11.25	2957

Исследовали хроматографическое поведение полиароматических углеводородов и бензола на колонках с тремя синтезированными сорбентами ПС-ДВБ-Au-L-цистеин, ПС-ДВБ-Au-ЛК, ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys и немодифицированным ПС-ДВБ, результаты исследования представлены в табл. 10. Как видно из таблицы, исследуемые вещества хорошо удерживаются на всех четырех колонках, порядок выхода аналитов везде был одинаковый: бензол < фенантрен < антрацен, удерживание соединений хорошо коррелирует с изменением гидрофобности: более гидрофобные дольше удерживаются. Такая корреляция говорит о реализации обращено-фазового механизма удерживания. Большие факторы удерживания соединений наблюдаются для колонок с сорбентами, модифицированными липоевой кислотой, что говорит о том, что углеродная цепочка даёт дополнительный вклад в гидрофобные взаимодействия. Фенантрен и антрацен различаются лишь формой соединения углеродных колец, они имеют одинаковый $\log P$, однако эти вещества разделяются, что говорит о дополнительных стерических взаимодействиях неподвижной фазы с аналитами (рис. 34).

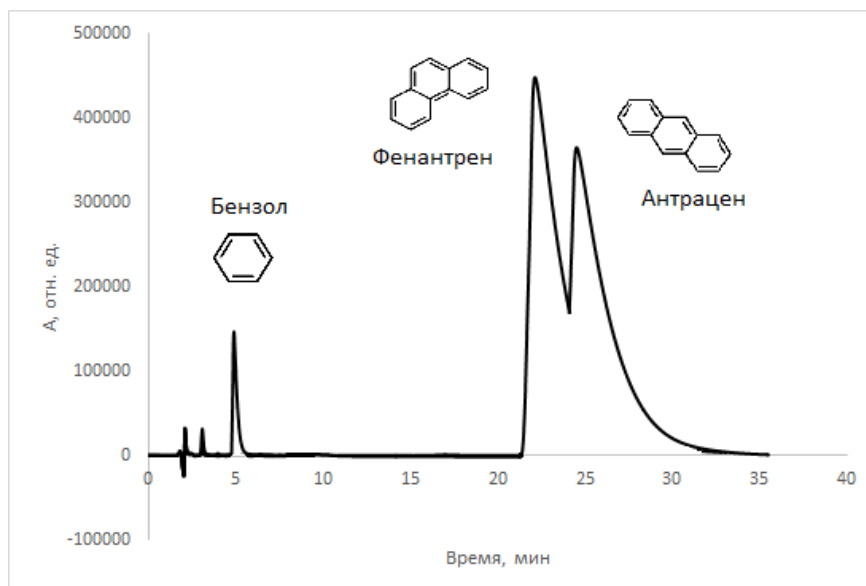


Рис. 34. Хроматограмма смеси бензола, фенантрена, антрацена. ПФ: ацетонитрил/буферный раствор ацетата аммония (20 мМ, рН=4.7) 90/10 (об. %). Сорбент - ПС-ДВБ-Au-L-цистеин. Скорость потока 0.5 мл/мин, $\lambda=230$ нм.

Для нейтральных соединений (бензола, антрацена, фенантрена) была изучена зависимость логарифма фактора удерживания от доли органического растворителя в ПФ ацетонитрил/вода (рис. 35). Исследование проводилось на сорбенте ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys. С увеличением содержания ацетонитрила в ПФ удерживание веществ уменьшалось, что дает основания предположить о существенном вкладе гидрофобных взаимодействий в механизм удерживания аналитов. Минимальное содержание ацетонитрила в исследуемых ПФ составило 70 об. % из-за увеличения давления в колонках.

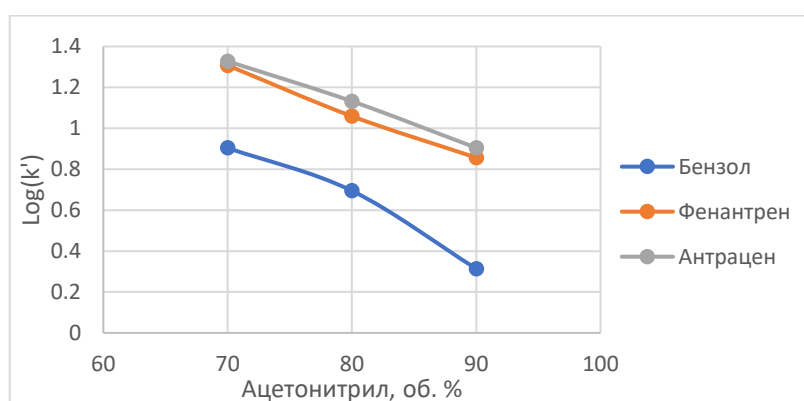


Рис. 35. Зависимость логарифма фактора удерживания от доли ацетонитрила в ПФ ацетонитрил/вода для бензола, фенантрена, антрацена. Сорбент - ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys, ПФ: ацетонитрил/вода.

1.3.2 Исследование удерживания гидрофильных веществ.

Проводили исследование удерживания на синтезированных сорбентах гидрофильных соединений ряда аминопиридинов и аминифенолов. Удерживание на исследуемых сорбентах было невелико, лишь для нескольких ПФ с буферным раствором ТЭАА факторы удерживания некоторых веществ были больше единицы. Однако, можно отметить большее удерживание на сорбентах ПС-ДВБ-Au-L-цистеин и ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys по сравнению с немодифицированным ПС-ДВБ (табл. 11), что говорит о вкладе гидрофильных взаимодействий в механизм удерживания на модифицированных сорбентах. Наибольшие факторы удерживания аминопиридинов наблюдаются на ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys, вероятно в следствии большего содержания селектора на данном сорбенте. Оценивая порядок удерживания аминопиридинов, можно отметить, что в удерживание аналитов также вносят вклад ионные взаимодействия, так на сорбенте с L-цистеином большее удерживание наблюдается для 4-аминопиридина.

Таблица 11. Факторы удерживания (k'), параметры гидрофобности ($\log P$, $\log D$) нитроанилинов. ПФ ACN/MeOH/ТЭАА (0.05%, pH=4) 40/40/20 (об. %)

Исследуемые вещества	LogP	LogD	pKa	k'		
		pH=5.5		-L-цистеин	-ЛК-Lys	ПС-ДВБ
2-аминопиридин	0.62	-0.64	6.86	1.0	1.9	0.6
3-аминопиридин	-0.02	-0.12	6.06	0.7	1.4	0.5
4-аминопиридин	0.26	-2.17	9.25	1.7	1.8	0.9
2,3-диаминопиридин	0.27	-0.67	6.78	1.0	1.4	1.1

1.3.3 Профены.

Было проведено исследование удерживания ряда профенов: индопрофен, кетопрофен, ибупрофен, флурбипрофен. Профены являются препаратами, обладающими противовоспалительным, анальгезирующим и жаропонижающим действием. Эти вещества обладают довольно сильными гидрофобными свойствами, к тому же имеют различные функциональные группы, из-за чего механизм удерживания их может быть комплексным. Структурные формулы исследуемых профенов приведены на рис. 36.

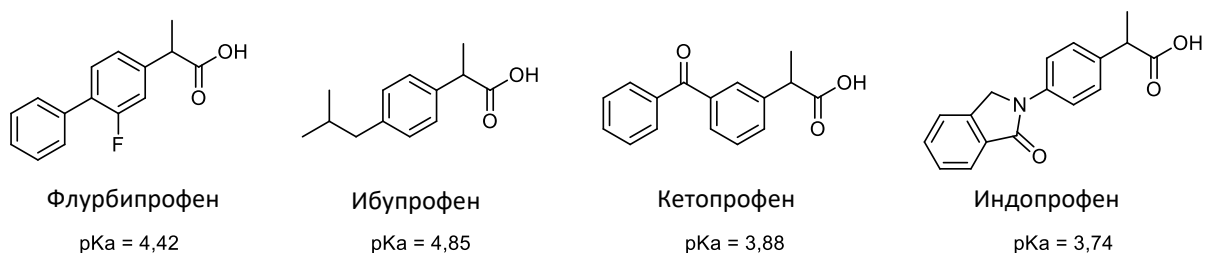


Рис. 36. Структуры и константы кислотности изученных профенов.

Порядок выхода профенов на различных ПФ фазах был неодинаков, однако он во всех случаях соотносился с коэффициентами гидрофобности соединений (табл. 12). Так, имеющие очень близкие значения $\log P$ индопрофен и кетопрофен менялись местами при элюировании, но во всех случаях выходили раньше, чем ибупрофен и флурбипрофен, $\log P$ которых заметно выше. Индопрофен и кетопрофен в своей структуре имеют по дополнительному кислороду, индопрофен также имеет азот, что обуславливает их меньшую способность к гидрофобным взаимодействиям.

Для оценки влияния природы буферного раствора на удерживание профенов использовали ацетатный буферный раствор концентрации 20 мМ, pH=4.3, фосфатные буферные растворы концентрации 10 мМ, pH=4.3 и pH=6.8, ацетат триэтиламина концентрациями 0.1% pH=4.0, 0.01% pH=4.0 и pH=7.0, 0.05% pH=4.0 и pH=7.0.

Профены имеют значения pKa в интервале 3.7-4.9. Анализ полученных экспериментальных данных показал, что при pH близких к 4.0 профены удерживаются лучше на всех буферных растворах, что согласуется с параметрами $\log D$ этих веществ, которые резко понижаются для pH близких к семи. С использованием ФБ аналиты удерживаются значительно хуже, по сравнению с АБ и ТЭАА. Влияние концентрации буферного раствора не выявлено. На удерживание положительно влияет замена в ПФ ацетонитрила на смесь ацетонитрил-метанол. При сравнении удерживания профенов на разных колонках видно, что на модифицированных сорбентах вещества удерживаются больше, при этом на сорбенте 2 наблюдается наибольшее удерживание.

Таблица 12. Факторы удерживания (k'), параметры гидрофобности ($\log P$, $\log D$) профенов (ПФ состава 40/40/20 (об. %), если не указано другое). С 1 – ПС-ДВБ-Au-L-цистеин, С 2 – ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys, С 3 – ПС-ДВБ

Исследуемые вещества	LogP	LogD		ACN/MeOH/TEAA (0.05%, pH=4)			ACN/MeOH/TEAA (0.05%, pH=7)			ACN/MeOH/ФБ (10 mM, pH=6.8)			ACN/MeOH/ФБ (10 mM, pH=4.3)		
		pH=5.5	pH=7.4	k'			k'			k'			k'		
				С 1	С 2	С 3	С 1	С 2	С 3	С 1	С 2	С 3	С 1	С 2	С 3
Индопрофен	2.77	1.94	0.14	2.59	4.42	1.81	0.72	0.15	0.62	0.50	0.63	0.45	2.56	0.69	0.77
Кетопрофен	2.81	1.83	0.06	3.16	2.39	2.00	0.63	0.25	0.72	0.45	0.63	0.46	3.08	0.72	0.74
Ибупрофен	3.72	2.25	0.45	3.93	6.62	2.68	3.16	1.13	0.82	0.59	0.69	0.38	4.02	0.92	2.98
Флурбипрофен	4.11	2.44	0.68	4.41	7.06	3.14	0.92	2.20	0.63	0.69	0.68	0.47	5.14	0.87	1.86
Исследуемые вещества	LogP	LogD		ACN/MeOH/АБ (20 mM, pH=4.3)			ACN/АБ (20 mM, pH=4.3) 80/20 (об. %)								
		pH=5.5	pH=7.4	k'			k'								
				С 1	С 2	С 3	С 1	С 2	С 3	С 1	С 2	С 3	С 1	С 2	С 3
Индопрофен	2.77	1.94	0.14	1.39	1.98	1.44	0.5	0.51	0.5	0.5	0.51	0.5	0.5	0.51	0.5
Кетопрофен	2.81	1.83	0.06	1.61	2.31	1.67	0.73	0.65	0.63	0.73	0.65	0.63	0.73	0.65	0.63
Ибупрофен	3.72	2.25	0.45	2.19	3.24	2.27	1.12	1.08	1.0	1.12	1.08	1.0	1.12	1.08	1.0
Флурбипрофен	4.11	2.44	0.68	2.42	2.54	2.53	1.04	0.99	0.91	1.04	0.99	0.91	1.04	0.99	0.91

На рис. 37 приведена хроматограмма разделения профенов при элюировании ПФ ацетонитрил/метанол/ТЭАА (0.05%, pH=4.0) 40/40/20 (об. %). Как видно, удалось провести полное разделение трех профенов.

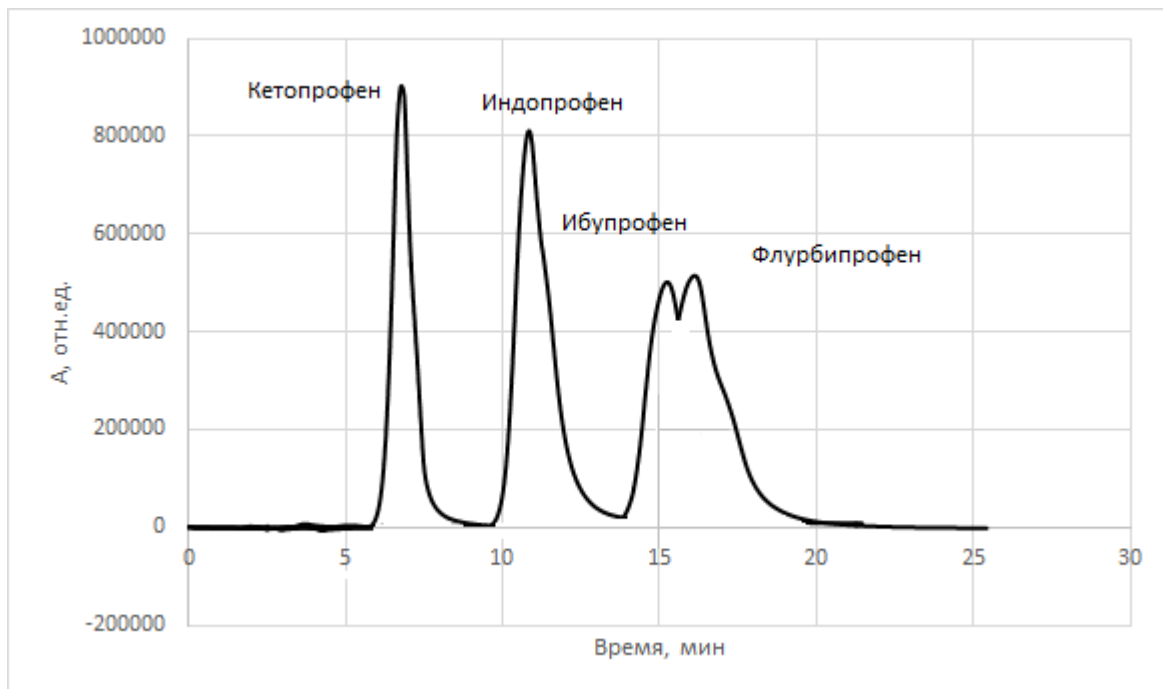


Рис. 37. Хроматограмма смеси профенов. ПФ ацетонитрил/метанол/ТЭАА (0.05%, pH=4.0) 40/40/20 (об. %). Сорбент: ПС-ДВБ-Аи-ЛК-Lys. Скорость потока 0.5 мл/мин, $\lambda=230$ нм.

Изучение влияния содержания ацетонитрила в составе ПФ на времена удерживания соединений проводили на ПФ состава: ацетонитрил/АБ раствор (20 мМ, pH=4.3) на сорбенте ПС-ДВБ-Аи-ЛК-Lys. Содержание органического растворителя варьировали в интервале от 70 до 90%. Такой интервал выбрали из-за повышения давления колонки при больших содержаниях водной фазы. На рис. 38 представлена зависимость логарифма фактора удерживания азотсодержащих соединений от содержания ацетонитрила в подвижной фазе. Отрицательный наклон зависимости говорит о преобладании в кислой среде ОФ механизма удерживания профенов за счет сольвофобных взаимодействий в ПФ.

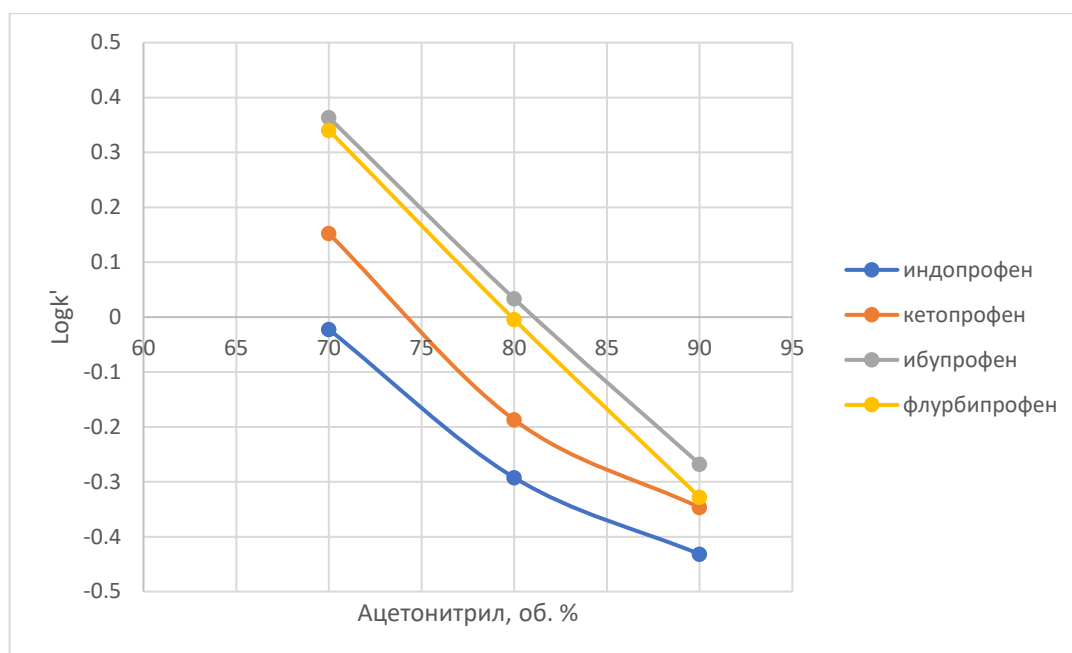


Рис. 38. Зависимость логарифма фактора удерживания от доли ацетонитрила в ПФ ацетонитрил/АБ (20 мМ, рН=4.3) 80/20 (об. %) профенов. Сорбент: ПС-ДВБ-Аи-ЛК-Lys.

1.3.4 β -блокаторы.

β -блокаторы — это группа препаратов, которые блокируют действие адреналина, тем самым уменьшая активность сердца и снижая кровяное давление. Они обычно используются для лечения ряда заболеваний, включая высокое кровяное давление, сердечную недостаточность и стенокардию, а также для профилактики сердечных приступов и мигрени. Некоторые β -блокаторы действуют в основном на сердце, другие - как на сердце, так и на кровеносные сосуды, и выбор того или иного препарата зависит от конкретных потребностей человека. β -блокаторы имеют хиральные центры. Структурные формулы и константы кислотности исследуемых β -блокаторов приведены на рис. 39.

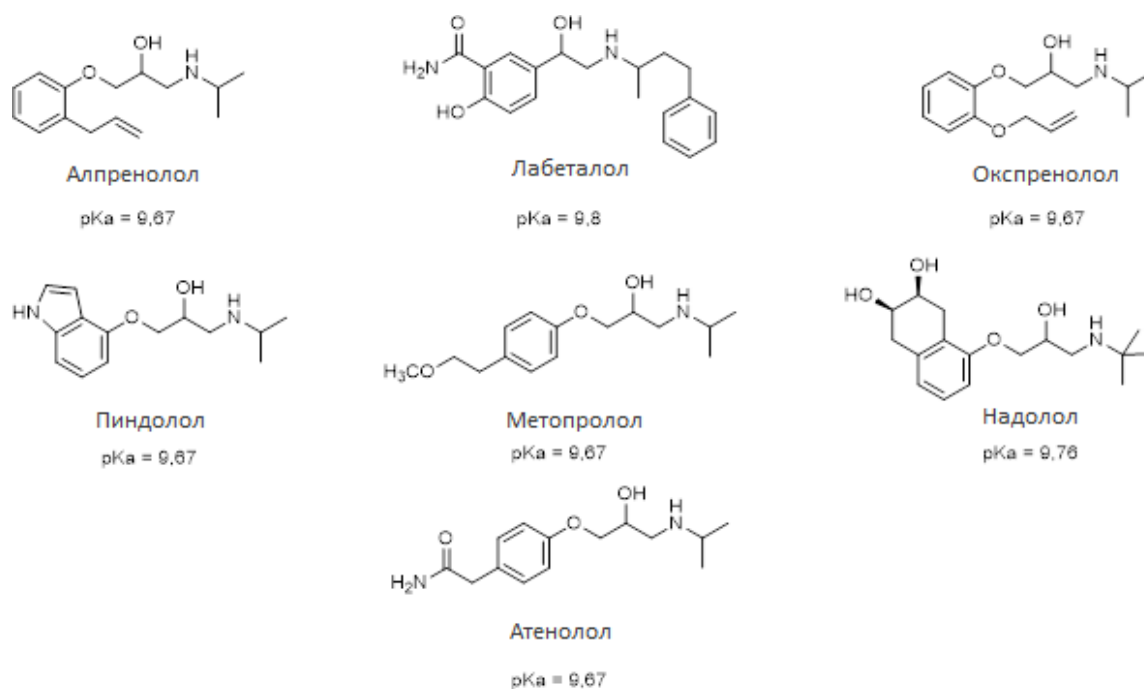


Рис. 39. Структуры и константы кислотности изученных β -блокаторов.

Сорбенты ПС-ДВБ-Au-L-цистеин, ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys использовались в качестве неподвижных фаз для изучения хроматографического поведения β -блокаторов. Изученные β -адреноблокаторы имеют одно (атенолол, метопролол, окспренолол, алпренолол) или два (надолол, пиндолол) ароматических кольца, вторичную аминогруппу с pKa в диапазоне от 8.8 до 9.7, гидроксидные и эфирные группы в их молекулах с хорошо задокументированными гидрофобными свойствами. Приготовленные НФ ПС-ДВБ-Au-L-цистеин и ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys также имеют сложную структуру с различными возможностями удерживания в смешанном режиме для β -блокаторов за счет гидрофобных, электростатических, водородных связей и π - π взаимодействий. На ПФ состава ацетонитрил/метанол с добавкой ТЭА и уксусной кислоты β -блокаторы выходили с мертвым объемом колонки. Далее в качестве ПФ использовались смеси различных буферных растворов и органических растворителей (табл. 13). При добавлении в ПФ 20 об. % буферного раствора пики β -блокаторов отделялись от мертвого времени. При рассмотрении зависимости удерживания β -блокаторов от pH буферного раствора наблюдается картина обратная профенам. β -блокаторы удерживались дольше и лучше разделялись при больших значениях pH, что согласуется с их константами кислотности и показателями logD, возрастающими при увеличении значений pH на примере фосфатного буферного раствора. В оптимизированных условиях полное

разделение шести β -блокаторов было достигнуто за 15 минут (рис. 40, А). Природа буферного раствора влияла на удерживание, так при замене ФБ на ТЭАА удерживание анализов видимо возрастало для всех исследуемых неподвижных фаз, что может быть связано с образованием более гидрофобных агрегатов β -блокаторов с триэтиламином в ПФ. Порядок выхода для трёх сорбентов при значении рН около 7 схож и коррелирует с показателями гидрофобности молекул. При более низком рН механизм удерживания на модифицированных сорбентах усложняется и порядок выход изменяется.

Таблица 13. Факторы удерживания (k), параметры гидрофобности (logP, logD) β -блокаторов, ПФ-1: АСН/МеОН/ФБ (10 мМ, рН=6.8) 40/40/20 (об. %); ПФ-2: АСН/МеОН/ФБ (10 мМ, рН=4.3) 40/40/20 (об. %); ПФ-3: АСН/МеОН/ТЭАА (0.05%, рН=4) 40/40/20 (об. %)

				Неподвижные фазы								
Исследуемые вещества	LogD		LogP	-L-цистеин			-ЛК-Lys			ПС-ДВБ		
	pH 5.5	pH 7.4		k			k			k		
				ПФ-1	ПФ-2	ПФ-3	ПФ-1	ПФ-2	ПФ-3	ПФ-1	ПФ-2	ПФ-3
Атенолол	-2.8	-1.9	0.1	0.83	0.19	1.41	0.77	0.67	2.06	0.49	0.56	1.09
Оксспренолол	-0.8	-0.2	2.29	4.05	1.11	2.2	3.89	1.79	3.66	2.25	0.75	1.74
Пиндолол	-1.2	-0.3	1.97	1.98	0.48	2.03	2.4	1.26	1.06	1.22	0.18	1.54
Лабеталол	-0.3	-0.9	2.31	2.37	1.08	2.78	2.7	2.28	3.75	1.63	0.89	1.9
Метопролол	-1.2	-0.3	1.79	3.03	1.0	2.05	3.06	1.57	4.06	1.91	0.76	1.78
Алпренолол	-0.3	0.7	2.88	5.78	1.34	2.18	5.41	2.37	3.48	3.15	1.02	2.17
Надолол	-1.8	-0.9	1.29	1.4	0.53	1.68	1.58	0.89	2.48	0.75	0.48	1.13

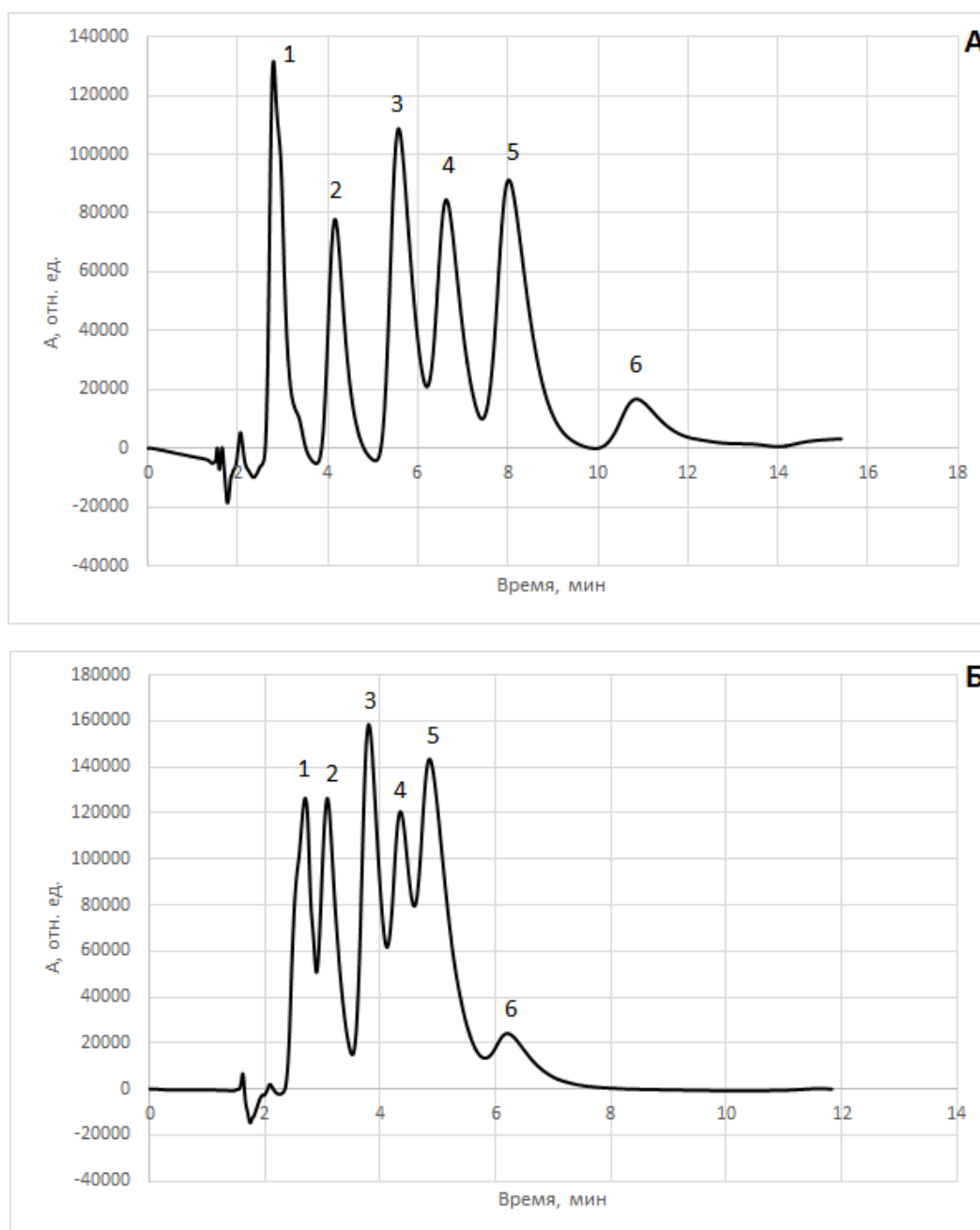


Рис. 40. Хроматограмма смеси β -блокаторов: 1 – атенолол, 2 – надолол, 3 – пиндолол, 4 – метопролол, 5 – окспренолол, 6 – алпренолол. ПФ: 40/40/20 (об. %) ацетонитрил/метанол/ФБ (10 мМ, рН=6.8 – А, рН=4.3 – Б). Сорбент: ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys. Скорость потока 0.5 мл/мин, $\lambda=230$ нм.

Изменение концентрации буферного раствора заметного влияния на удерживание не оказало. В отличие от профенов, удерживание β -блокаторов не увеличивалось при замене ацетонитрила на смесь ацетонитрил-метанол.

Было обнаружено, что удерживание β -блокаторов как на немодифицированной колонке ПС-ДВБ, так и на колонках, заполненной неподвижными фазами ПС-ДВБ-Au-L-цистеин, ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys, хорошо

коррелирует с их гидрофобностью, оцененной с использованием значений $\log P$, в тоже время на модифицированном ПС-ДВБ вещества удерживаются значительно сильнее. Гидрофобные взаимодействия веществ могут быть обусловлены взаимодействиями либо с поверхностью матрицы ПС-ДВБ, либо с алкильными фрагментами модификатора, иммобилизованного на наночастицах золота. Более сильное удерживание β -блокаторов на модифицированных сорбентах по сравнению с ПС-ДВБ связано с увеличением площади поверхности за счет покрытия слоем НЧЗ. Однако данный порядок выхода β -блокаторов не сохраняется на модифицированных НФ для ПФ-3, содержащей ТЕАА буферный раствор. В связи с этим можно предположить возникновение дополнительных взаимодействий между молекулами сорбата и поверхностью неподвижной фазы и реализации комплексного механизма удерживания, необусловленного преимущественно гидрофобными свойствами аналитов. Было установлено, что удерживание блокаторов растет с увеличением содержания ацетонитрила в ПФ (рис. 41). Такой характер зависимости связан с изменением механизма удерживания сорбатов при высоком содержании полярного органического растворителя в подвижной фазе. При работе с подвижными фазами, содержащими от 90 до 100% ацетонитрила или метанола, реализуется, так называемый, полярно-органический вариант жидкостной хроматографии. Распознавание в полярно-органическом варианте базируется на следующих взаимодействиях: образовании водородных связей, π - π взаимодействиях, стерических затруднениях или электростатических взаимодействиях.

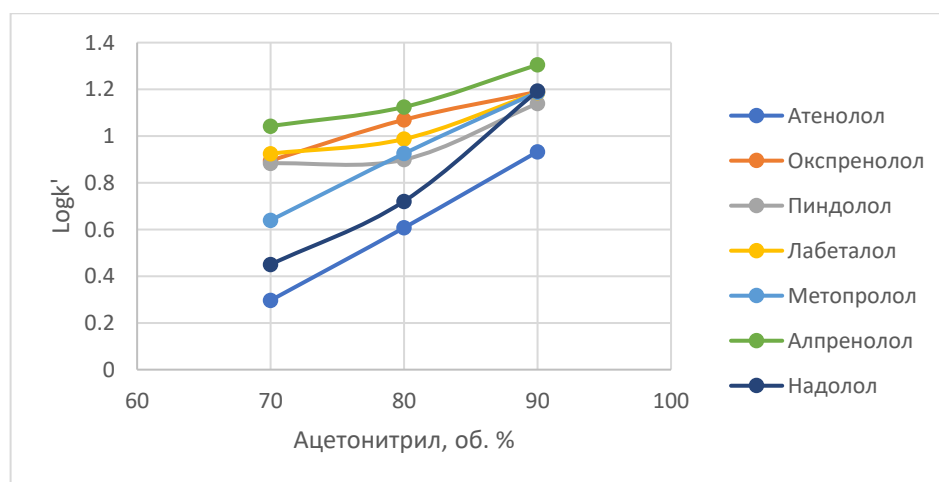


Рис. 41. Зависимость логарифма фактора удерживания от доли ацетонитрила в ПФ ацетонитрил/ТЕАА (0.05%, pH=7.0) β -блокаторов. Сорбент: ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys.

Таблица 14. Коэффициенты селективности (α) энантиомеров β -блокаторов

ПФ	НФ	β -блокаторы	α
АСН/АБ (20мМ, рН=4.3) 80/20 (об. %)	-ЛК-Lys	Надолол	1.06
АСН/МеОН/АБ (20мМ, рН=4.3) 40/40/20 (об. %)	-ЛК-Lys	Окспренолол	1.04
		Лабеталол	1.05
		Метопролол	1.04
АСН/ФБ (10мМ, рН=6.8) 80/20 (об. %)	-L-цистеин	Метопролол	1.11
АСН/МеОН/ФБ (10мМ, рН=6.8) 40/40/20 (об. %)	-L-цистеин	Лабеталол	1.1
АСН/ФБ (10мМ, рН=4.3) 80/20 (об. %)	-L-цистеин	Лабеталол	1.09
		Пиндолол	1.14
	-ЛК-Lys	Пиндолол	1.04
АСН/ТЭАА (0.05%, рН=4.0) 80/20(об. %)	-L-цистеин	Лабеталол	1.1

Хорошо известно, что большинство β -блокаторов хиральны, то есть их отдельные энантиомеры могут оказывать различное воздействие на организм. Исследования показали, что энантиомеры β -блокаторов могут обладать различными фармакологическими свойствами, включая различия в потенции, селективности, метаболизме и побочных эффектах. Например, один энантиомер может быть более эффективным в снижении кровяного давления, в то время как другой может иметь больше побочных эффектов, поэтому поиск новых способов разделения энантиомеров β -блокаторов имеет большое практическое значение. В ходе изучения хроматографического поведения β -блокаторов наблюдали частичное разделение энантиомеров. Данные представлены в табл. 14. Большую энантиоселективность неподвижные фазы проявляли в кислой среде, можно предположить, что в энантиоразделении существенную роль играют электростатические взаимодействия между карбоксильными группами селектора и аминокетонами блокаторов.

1.3.5 Исследование новых биологически активных веществ

Всё новые биологически активные вещества создаются в различных отраслях науки. Они требуют развития новых методов определения, разделения и выделения. Также, в связи с несовершенством синтетических подходов, вещества, образующиеся в ходе химических реакций, часто получают в виде смеси энантиомеров, один из которых обладает заявленной активностью, а другой может

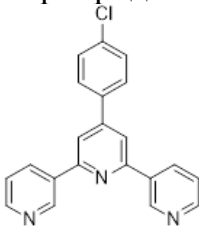
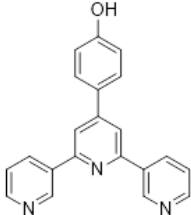
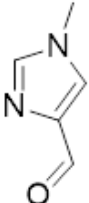
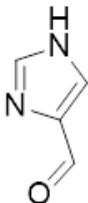
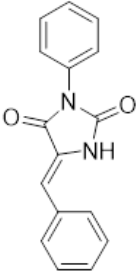
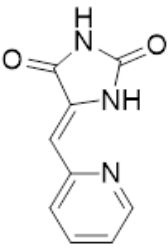
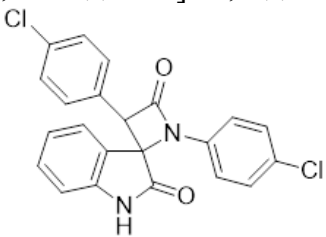
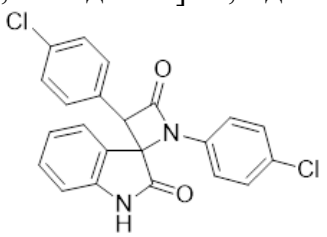
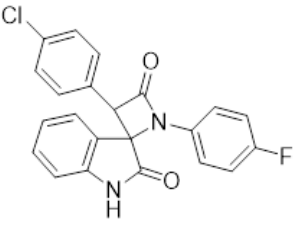
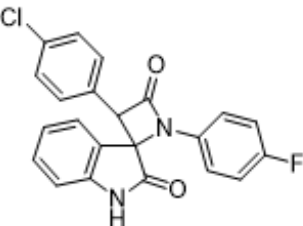
как обладать такими же свойствами, так и нет, либо, даже быть токсичным и/или вызывать противоположный эффект. Поэтому очень важной и жизненно необходимой задачей является разделение энантиомеров.

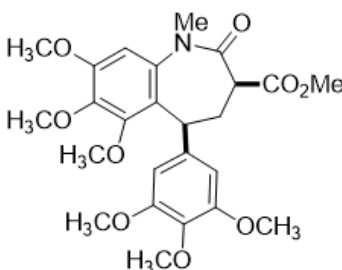
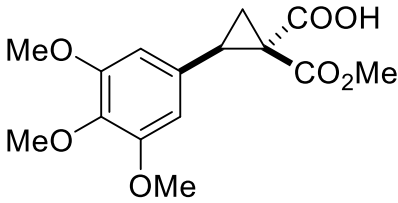
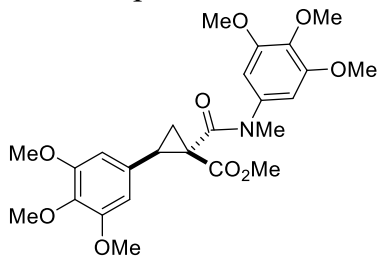
В лаборатории биологически активных органических соединений кафедры органической химии химического факультета МГУ были синтезированы и любезно нам предоставлены новые вещества. Некоторые из них при исследовании на цитотоксичность проявили противоопухолевую активность и, как показали предварительные тесты, потенциально могут использоваться в качестве лекарственных препаратов в будущем. Эти вещества имеют различные структурные особенности, обладают гидрофобными свойствами, кроме того, в ходе проводимых с ними химических реакций способны рацемизироваться. В связи с этим, было интересно изучить их хроматографическое поведение на новых сорбентах.

Новые синтезированные соединения (табл. 15) были исследованы на сорбенте ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys с использованием различных ПФ. Факторы удерживания веществ для некоторых ПФ представлены в табл. 16.

Вещества 1 и 2 являются производными терпиридинов. На примере данных соединений хорошо видно влияние различных функциональных групп: так соединение 1, имеющее в своем составе хлор, удерживалось гораздо дольше, чем соединение 2, содержащее вместо хлора -ОН группу. При использовании ПФ с буферными растворами соединение 1 не элюировалось, а 2 сильно удерживалось, что свидетельствует о сильных гидрофобных взаимодействиях данных веществ с поверхностью неподвижной фазы. Для вещества 2 наблюдалось большее удерживание при меньших значениях pH. Пара веществ 3, 4 являются производными имидазолкарбальдегида. Относительно вещества 4, соединение 3 имеет дополнительную метильную группу, что обуславливает его большее удерживание. Однако, оба 3 и 4 в своем составе имеют два азота и кислород, поэтому в целом факторы удерживания данных веществ меньше единицы. Соединения 5 и 6 являются производными гидантоинов. Вещество 5 значительно сильнее удерживается по сравнению с 6 на ПФ, содержащих буферный раствор, так как имеет в строении два бензольных кольца, что сильно повышает его гидрофобность.

Таблица 15. Структуры новых биологически активных соединений

1. 4'-(4-хлорфенил)-3,2':6',3''-терпиридин 	2. 4-([3,2':6'3''-терпиридин]-4'-ил)фенол 
3. 1-метил-1Н-имидазол-4-карбальдегид 	4. 1Н-имидазол-4-карбальдегид 
5. 5-бензилиден-3-фенилимадозолидин-2,4-дион 	6. 5-(пиридин-2-илметил)имидазолидин-2,4-дион 
7. 1,3-бис(4-хлорфенил)спиро[азетидин-2,3'-индолин]-2',4-дион 	8. 1,3-бис(4-хлорфенил)спиро[азетидин-2,3'-индолин]-2',4-дион 
9. 3-(4-хлорфенил)-1-(4-флуорофенил)спиро[азетидин-2,3'-индолин]-2',4-дион 	10. 3-(4-хлорфенил)-1-(4-флуорофенил)спиро[азетидин-2,3'-индолин]-2',4-дион 

11. Метил 6,7,8-триметокси-1-метил-2-оксо-5-(3,4,5-триметоксифенил)-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-бензо[б]азепин-3-карбоксилат 	
12. 1-(метоксикарбонил)-2-(3,4,5-триметоксифенил)циклопропан-1-карбоновая кислота 	13. Метил-1-(метил(3,4,5-триметоксифенил)карбамоил)-2-(3,4,5-триметоксифенил)циклопропан-1-карбоксилат 

Соединения 7, 8, 9, 10 – это производные спироиндолинонов, попарно (7-8, 9-10) они являются диастереомерами. Диастереомеры 7, 8 хорошо разделяются между собой на ПФ с буферными растворами, $\alpha = 1.5$ для ПФ с рН=4.3. Они имеют довольно высокие факторы удерживания даже для органической ПФ состава ацетонитрил/метанол, что говорит о сильной гидрофобности данных веществ, несмотря на наличие двух азотов и двух кислородов в их структуре. Существенную роль в удерживании играют заместительные группы хлора. Для диастереомеров 9 и 10, имеющих такое же строение, но вместо второго хлора у них фтор, удерживание меньше и разделение наблюдается частичное (рис. 42). Все четыре диастереомеры удерживаются сильнее при более щелочных рН. Вещество 11 представляет собой сложное производное тетрагидробензоазепина, имеющее в структуре девять кислородов и азот. Однако, оно хорошо удерживается на гидрофобном сорбенте. Это может быть связано с тем, что в структуре молекулы атомы кислорода как бы прикрыты метильными группами. Также были исследованы вещества 12 и 13 являющимися производными циклопропендикарбоновых кислот. 13 на всех ПФ выходил практически с мертвым объемом колонки, в то время как 12 хорошо

удерживалась. На ПФ ACN/MeOH/ФБ (10мМ, рН=4.3) 40/40/20 (об. %) 12 удерживалось дольше – $k=5.42$, чем на ПФ ACN/MeOH/ФБ (10мМ, рН=6.8) 40/40/20 (об. %) – $k=3.78$, для 13 зависимость была обратной – $k=0.03$ (рН=4.3) и 0.35 (рН=6.8). Для всех изученных веществ удерживание увеличивалось при смене ацетонитрила на смесь ацетонитрил-метанол.

Таблица 16. Факторы удерживания (k) веществ. Сорбент: ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys

Вещества	ACN/MeOH (98/2 об. %) + доб.*	ACN/ФБ (10мМ, рН=6.8) 80/20 (об. %)	ACN/ФБ (10мМ, рН=4.3) 80/20 (об. %)	ACN/АБ (20мМ, рН=4.3) 80/20 (об. %)
	k	k	k	k
1.	22.05	-	-	-
2.	5.39	12.74	11.36	10.18
3.	0.38	0.65	0.79	0.66
4.	0.21	0.28	0.40	0.32
5.	0.73	3.46	3.12	2.65
6.	0.48	0.87	0.96	0.81
7.	1.29	7.45	6.28	5.3
8.	1.23	9.87	9.28	7.76
9.	0.89	7.02	5.70	4.74
10.	0.78	5.91	4.90	4.11
11.	0.62	2.98	2.75	2.36

*Доб. - добавка ТЭА 0.15% и АсОН 0.05%;

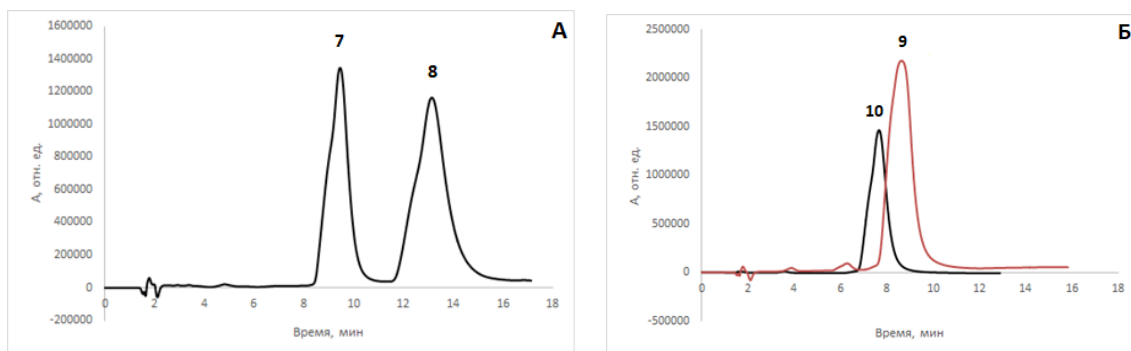


Рис. 42. Хроматограммы диастереомеров веществ 7, 8 - А, 9, 10 - Б. ПФ: ацетонитрил/АБ (20 мМ, рН=4.3) 80/20 (об. %). Сорбент: ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys. Скорость потока 0.5 мл/мин, $\lambda=230$ нм.

Была исследована зависимость удерживания веществ от доли ацетонитрила в ПФ ACN/АБ (20 мМ, рН=4.3). Для всех соединений удерживание увеличивалось с уменьшением ацетонитрила в ПФ, что говорит о существенном вкладе гидрофобных

взаимодействий в удерживание исследуемых аналитов. На рис. 43 представлены графики зависимости $\log k'$ от содержания ацетонитрила для некоторых веществ.

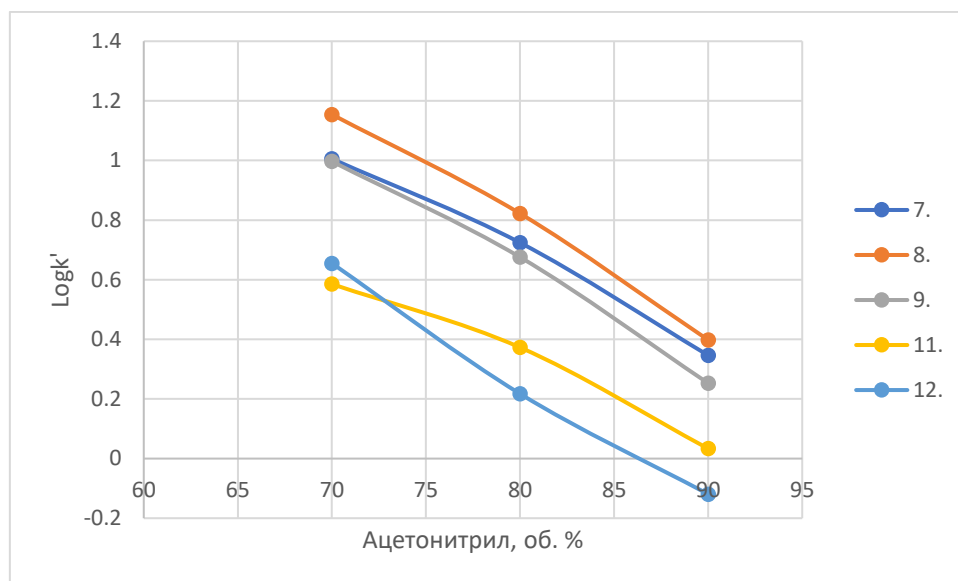


Рис. 43. Зависимость логарифма фактора удерживания от доли ацетонитрила в ПФ ацетонитрил/АБ (20 мМ, рН=4.3). Сорбент: ПС-ДВБ-Au-ЛК-Lys.

1.3.6 Исследование хроматографических свойств сорбента ПС-ДВБ-Au-ЛК-L-Лизин

Проводили исследование хроматографических свойств сорбента ПС-ДВБ-Au-ЛК-L-Лизин, синтезированного по методике 9. Структура сорбента схематически приведена на рис. 44.

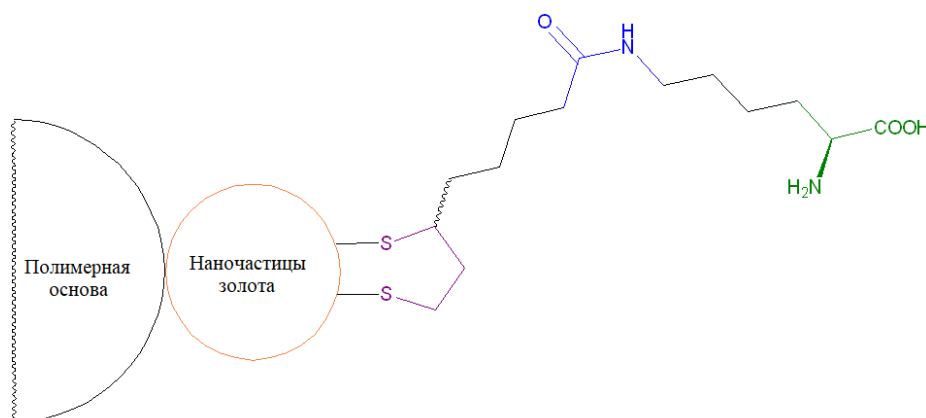


Рис. 44. Структура синтезированного сорбента на основе сополимера стирола и дивинилбензола, покрытого наночастицами золота с липоевой кислотой и привитым лизином.

Изучение проводилось в два этапа. Первый включал изучение закономерностей при разделении некоторых модельных соединений – нитроанилинов и аминофенолов. Второй – изучение хроматографических

параметров разделения важных классов лекарственных препаратов – профенов и β -блокаторов, которые представляют собой рацемические смеси.

Была исследована возможность колонки с неподвижной фазой ПС-ДВБ-Аи-ЛК-Л-Лизин разделять структурные изомеры на примере нитроанилинов и аминифенолов. Разделение проводили при наиболее оптимальной скорости потока 0.5 мл/мин. Состав подвижной фазы варьировали в широких пределах, изменяя соотношение растворителей в подвижной фазе, pH буферных растворов.

Следующим этапом работы стало изучение закономерностей разделения сложных молекул с большим количеством функциональных групп. В качестве таких соединений были выбраны 2 группы веществ: профены и β -блокаторы. При их разделении использовались те же условия хроматографирования, что и в предыдущем случае. Кроме этого, для элюирования соединений использовали подвижные фазы – смеси органических растворителей. На примере профенов было проведено исследование влияния температуры колонки на её селективность.

1.3.7 Разделение изомеров нитроанилинов и аминифенолов

При любом составе подвижной фазы сохраняется одинаковая тенденция к большему удерживанию более гидрофобных молекул (табл. 17). Тоже наблюдается и при сравнении между группами веществ. Время удерживания аминифенолов, обладающих большей гидрофильностью, для каждой из исследованных подвижных фаз оказывалось меньше, чем для нитроанилинов. Зависимости коэффициентов ёмкости от состава подвижной фазы приведены на рис. 45 (для pH 4.0) и рис. 46 (для pH 7.5).

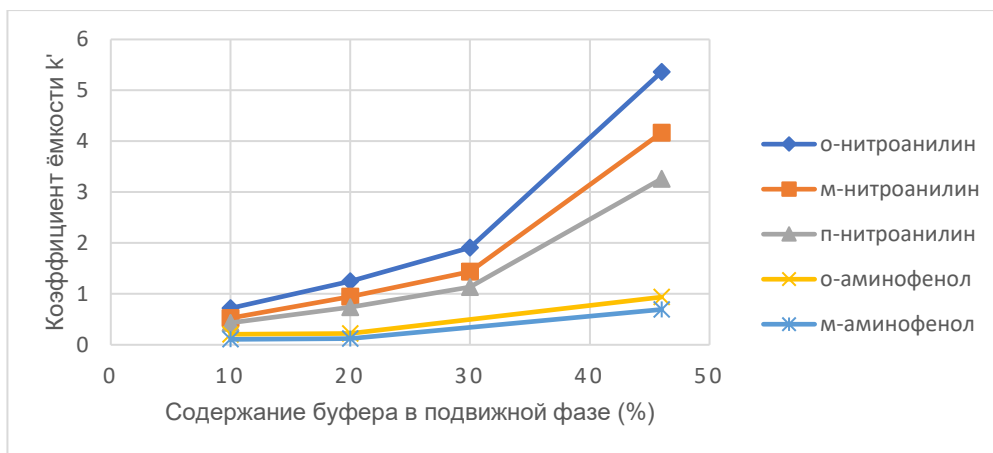


Рис. 45. Влияние состава подвижной фазы на коэффициенты ёмкости при pH 4,0 (подвижная фаза: АСН-ТЕАА (0.05, об. %)).

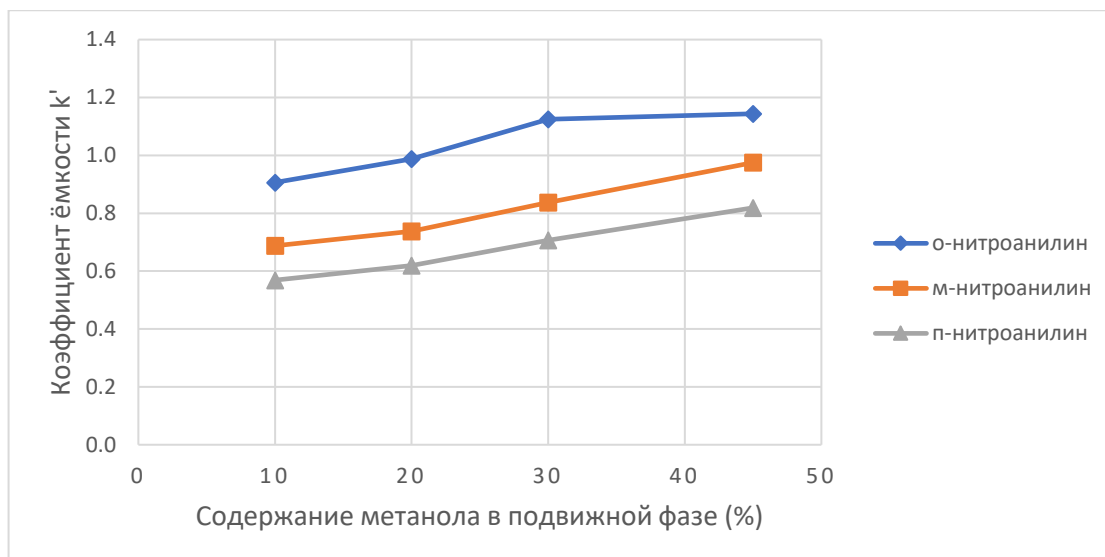


Рис. 46. Влияние состава подвижной фазы на коэффициенты ёмкости при pH 7,5 (подвижная фаза: ACN-MeOH-TEAA10% (0.05%)).

Отклонение от наблюдаемой зависимости проявляется лишь для пары *m*-нитроанилин – *p*-нитроанилин, для которых значения $\log P$ очень близки. Однако, более информативным являются константы распределения этих веществ и соответствующие значения $\log D$. Значение константы распределения для *p*-нитроанилина меньше соответствующего значения для 3-изомера. Что соответствует наблюдаемому порядку элюирования. Другой возможной причиной может служить различия в дипольных моментах этих молекул. Термодинамика процесса сольватации говорит, что для молекул с большим дипольным моментом сольватация становится более предпочтительной. В частности, из уравнения Онзагера видно, что чем больше дипольный момент молекулы, тем ниже энергия Гиббса:

$$\Delta G_1 - \frac{1}{2} \left[\frac{2(\epsilon - 1) \mu^2}{2\epsilon + 1} \frac{1}{\alpha^3} \right]$$

Таким образом, переход в подвижную фазу предпочтительней для *p*-нитроанилина.

Таблица 17. Хроматографические параметры разделения нитроанилинов и аминифенолов

		ACN40%-MeOH40%- TEAA20% (0.05%, pH 4.0)		ACN90%- TEAA10% (0.05%, pH 4.0)		ACN80%-TEAA20% (0.05%, pH 4.0)		ACN70%-TEAA30% (0.05%, pH 4.0)		ACN54%- TEAA46% (0.05%, pH 4.0)	
Вещество	logP	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
2- Нитроанилин	1.83	2.45	1.36	0.72	1.37	1.25/1.21*	1.32/1.34*	1.91/1.71*	1.33/1.34*	5.36	1.29
3- Нитроанилин	1.37	1.80	1.27	0.53	1.22	0.94/0.90*	1.28/1.29*	1.44/1.28*	1.27/1.31*	4.17	1.28
4- Нитроанилин	1.39	1.41		0.43		0.74/0.70*		1.13/0.98*		3.26	
2- Аминофенол	0.44	0.49/0.42*	1,50/1,63*	0,21	1,94	0.23	1.89	—	—	0.94	1.35
3- Аминофенол	0.34	0.33/0.26*		0,11		0.12		—		0.69	

* Значения при различных pH буферного раствора 4.0/pH 7.5, соответственно.

		ACN80%-MeOH10%- TEAA10% (0.05%, pH 7.5)		ACN70%-MeOH20%- TEAA10% (0.05%, pH 7.5)		ACN60%-MeOH30%- TEAA10% (0.05%, pH 7.5)		ACN45%-MeOH45%- TEAA10% (0.05%, pH 7.5)	
Вещество	logP	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
2- Нитроанилин	1.83	0.91	1.32	0.99	1.34	1.13	1.34	1.14	1.17
3- Нитроанилин	1.37	0.69	1.21	0.74	1.19	0.84	1.19	0.98	1.19
4- Нитроанилин	1.39	0.57		0.62		0.71		0.82	

Изменение pH раствора, при аналогичном составе элюента одинаково влияет на время удерживания, что указывает на сохранение одного и того же механизма удерживания. При неизменном составе подвижной фазы, увеличение pH среды приводит к незначительному уменьшению времени удерживания. Это легко объясняется, если вспомнить что эти вещества обладают кислотными свойствами. Из всего вышесказанного видно, что реализуется характерный для обращённо-фазовой хроматографии распределительный механизм.

Выбор подвижной фазы для элюирования веществ с небольшим количеством функциональных групп должен быть основан на гидрофобности веществ. Так, для аминифенолов лучшие результаты разделения получены при составе подвижной фазы ACN54%-TEAA46% (0.05%, pH=4.0) (об. %). Для нитрофенолов также наблюдалось хорошее разделение, но слишком большая величина времен удерживания делает эту подвижную фазу нецелесообразной. Для них оптимальным является элюент состава: ACN70%-TEAA30% (0.05%, pH 4.0) (об. %).

1.3.8 Разделение профенов

Лизин имеет значение pI 9.82, однако в рассматриваемом сорбенте атом азота боковой цепи введен в амидную связь, что существенно должно снижать этот показатель. Таким образом в кислой среде поверхность сорбента будет заряжена положительно, в нейтральной заряжена отрицательно. Профены имеют значения pKa в интервале 3.7-4.9. При pH среды выше этого значения они имеют отрицательный заряд. Следовательно, в кислой среде при pH около 4 следует ожидать большего удерживания чем в нейтральной, при pH 7.5. Экспериментальные данные хорошо согласуются с этим выводом (табл. 18). При уменьшении кислотности среды уменьшается разница между удерживанием различных профенов. Их полное разделение возможно только в кислой среде.

Таблица 18. Хроматографические параметры разделения профенов

		ACN80%-MeOH10%- TEAA10% (0.05%, pH 7.5)		ACN70%-MeOH20%- TEAA10% (0.05%, pH 7.5)		ACN60%-MeOH30%- TEAA10% (0.05%, pH 7.5)		ACN45%-MeOH45%- TEAA10% (0.05%, pH 7.5)	
Вещество	logP	t _R '	α	t _R '	α	t _R '	α	t _R '	α
Флурбипрофе н	4.11	1.19/1.64	1.38	1.19/1.50	1.26	1.23/1.46	1.19	1.46	1
Ибупрофен	3.72	1.21/1.75	1.45	1.26/1.75	1.40	1.26/1.73	1.37	1.70/1.97	1.159
Кетопрофен	2.81	1.16/1.56	1.35	1.15/1.52	1.32	1.18/1.52	1.29	1.43	1
Индопрофен	2.77	1.20/1.53	1.28	1.22/1.61	1.32	1.43/1.63	1.14	1.79	1
		ACN40%-MeOH40%- TEAA20% (0.05%, pH 4,0)		ACN90%-TEAA10% (0.05%, pH 7.5)		ACN80%-TEAA20% (0.05%, pH 7.5)		ACN95%-TEAA5% (0.05%, pH 7.5)	
Вещество	logP	t _R '	α	t _R '	α	t _R '	α	t _R '	α
Флурбипрофе н	4.11	5.35	1	1.15/1.55	1.35	1.07/1.48	1.38	1.74	1
Ибупрофен	3.72	4.57	1	1.18/1.64	1.39	–	–	1.70/1.86	1.09
Кетопрофен	2.81	3.19	1	1.11/1.74	1.57	–	–	1.83	1
Индопрофен	2.77	2.71	1	1.17/1.43	1.22	1.17/1.32	1.13	1.56	1

Таблица 19. Хроматографические параметры разделения профенов при различных температурах. Состав подвижной фазы: ACN90%-TEAA10% (0.05%, pH 7.5)

		T = 30°C		T = 35°C		T = 40°C	
Вещество	logP	k'	α	k'	α	k'	α
Флурбипрофен	4.11	2.14	1	0.66	1	0.68	1
Ибупрофен	3.72	1.11/1.33	1.20	0.67	1	0.78	1
Кетопрофен	2.81	0.72/0.8	1.11	0.89/1.08	1.21	1.03	1
Индопрофен	2.77	0.09/0.35	4.89	0.53	1	0.63	1

В кислых растворах при увеличении полярности подвижной фазы увеличивается время удерживания профенов, такая зависимость показана на рис. 47 на примере кетопрофена. Кроме того, есть корреляция с гидрофобностью профенов (профены с большим $\log P$ сильнее удерживаются), однако при уменьшении полярности подвижной фазы порядок элюирования изменяется и становится равным порядку увеличения кислотности. Из указанного следует, что на удерживание профенов влияют два фактора – сольвофобные и электростатические взаимодействия. При уменьшении полярности (увеличении количества ацетонитрила) уменьшается вклад сольвофобного взаимодействия и, одновременно, увеличивается вклад электростатического (из-за уменьшения диэлектрической проницаемости среды). Следует отметить, что как в тройных растворах (ACN/MeOH/TEAA), так и в двойных (ACN/TEAA) в кислой среде не наблюдается энантиоселективности.



Рис. 47. Влияние состава подвижной фазы на величину фактора удерживания кетопрофена (подвижная фаза: ACN-TEAA (0.05%, pH 4.0) (об. %)).

При переходе к нейтральной среде, как и указывалось выше, уменьшается время удерживания (поверхность сорбента и профены заряжены отрицательно). Кроме того, в нейтральной среде появляется энантиоселективность колонки (табл. 18). Следует отметить, что вода играет важную роль в этом, поскольку её отсутствие в элюенте приводит к потере колонкой энантиоселективности. Порядок элюирования меняется, и корреляция с гидрофобностью пропадает. Механизм удерживания также меняется. Пропадает электростатическое взаимодействие с аминогруппой, но образуется водородная связь. При постоянном содержании буфера, увеличение полярности (изменение соотношения ACN/MeOH) помимо

увеличения времени удерживания приводит к уменьшению селективности разделения энантиомеров. Эта зависимость приведена на рис. 48.

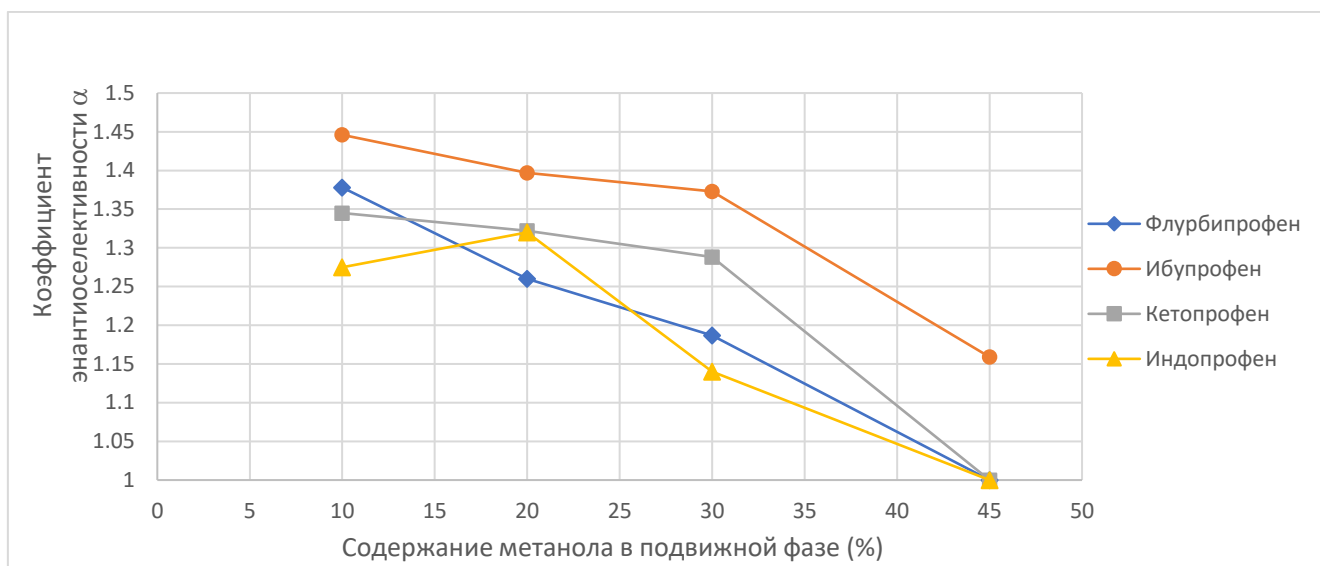


Рис. 48. Влияние состава подвижной фазы на энантиоселективность разделения профенов (подвижная фаза: АСН-МеОН-ТЕАА10% (0.05%, рН 7.5) (об. %)).

Переход к подвижным фазам на основе органических растворителей метанола и ацетонитрила приводит к потере энантиоселективности. Увеличение полярности элюента приводит к уменьшению времён удерживания, зависимость приведена на рис. 49. Из этого можно сделать вывод о возможности реализации гидрофильной хроматографии. Для этих фаз варьировали концентрации добавок кислоты и основания, оптимальным оказалось содержание 0.05% уксусной кислоты и 0.15% ТЕА.

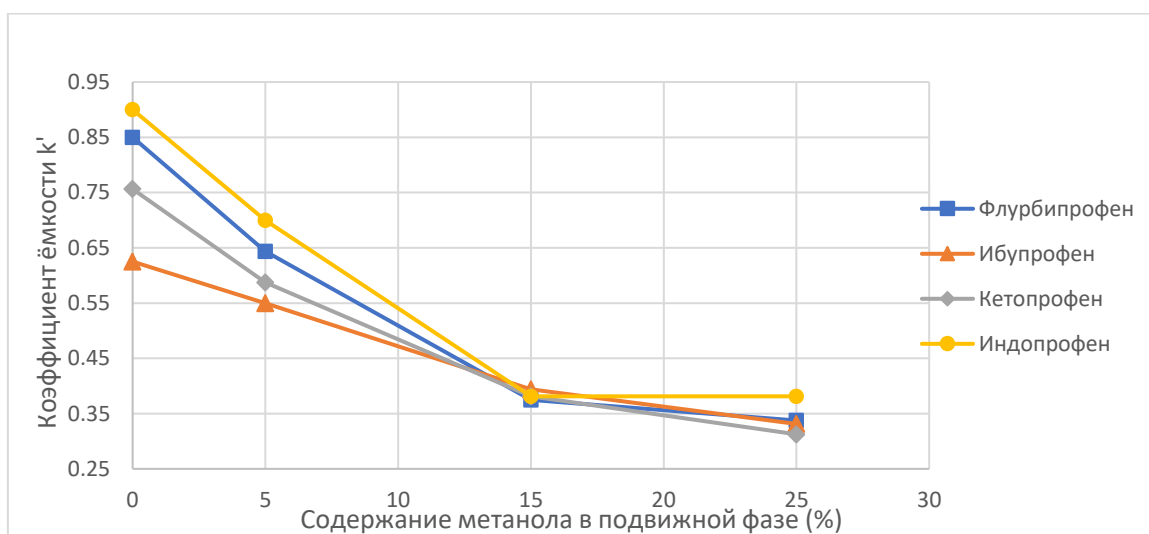


Рис. 49. Влияние состава подвижной фазы на величину фактора удерживания профенов (подвижная фаза: АСН-МеОН + 0.05% АсОН + 0.15% ТЕА, об. %).

На примере одной подвижной фазы (ACN90%-TEAA10% (0,05%, pH 7.5)) было исследовано влияние температуры на хроматографические параметры. Повышение температуры привело к потере колонкой селективности, как между двумя энантиомерами одного вещества, так и между различными профенами (табл. 19).

Подводя итоги, отметим оптимальные составы фаз для различных целей разделения. Наилучшее разделение смеси профенов достигается при составе подвижной фазы: ACN40%-MeOH40%-TEAA20% (0.05%, pH 4.0) (об. %). Для разделения энантиомеров профенов следует использовать малополярные подвижные фазы, в состав которых входит вода. Однако при очень низкой полярности элюента энантиоселективность уменьшается. Оптимальный состав подвижной фазы для разделения отдельных энантиомеров профенов: ACN80%-MeOH10%-TEAA10% (0.05%, pH 7.5) (об. %) (табл. 18). На рис. 50 приведены хроматограммы разделения энантиомеров флурбипрофена и кетопрофена, разрешение пиков (R_s) составило 0.96 и 0.85, соответственно.

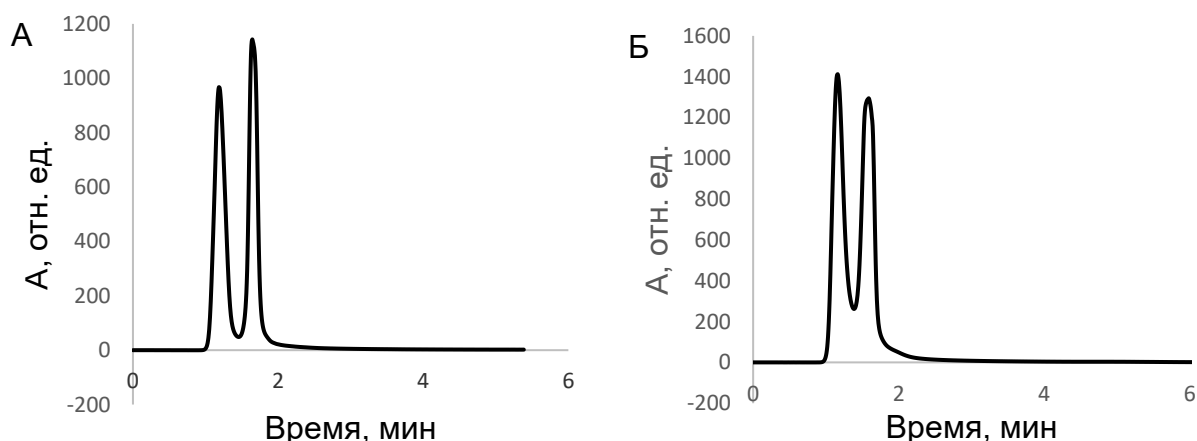


Рис. 50. Хроматограммы разделения энантиомеров профенов: А – флурбипрофен ($\lambda=230$ нм), Б – кетопрофен ($\lambda=254$ нм). Подвижная фаза: ACN/0.05% TEAA (pH 7.5) (90:10 об. %), скорость потока 0.5 мл/мин.

1.3.9 Разделение β -Блокаторов

Небольшие изменение состава подвижной фазы приводят к сильным изменениям в порядке элюирования, энантиоселективности, времён удерживания. В кислой среде, в целом, наблюдается увеличение времён удерживания β -блокаторов при повышении полярности подвижной фазы, однако, при изменении содержания

буферного раствора ТЕАА с 20 до 10 об. % в ПФ АСН-ТЕАА (0.05%, pH 4.0) времена удерживания резко возрастают, а энантиоселективность пропадает (табл. 20). Вероятно, при этом изменяется основной механизм удерживания. Можно предположить, что при высоком содержании воды основной вклад в удерживание вносят сольвофобные взаимодействия, а при уменьшении количества воды механизм меняется на распределительный между тонким водным слоем на поверхности сорбента и остальным объёмом подвижной фазы.

В нейтральной среде пропадает энантиоселективность колонки. При увеличении количества метанола в подвижной фазе (при этом полярность элюента увеличивается) наблюдается уменьшение времён удерживания. Эта зависимость представлена на рис. 51 на примере надолола.

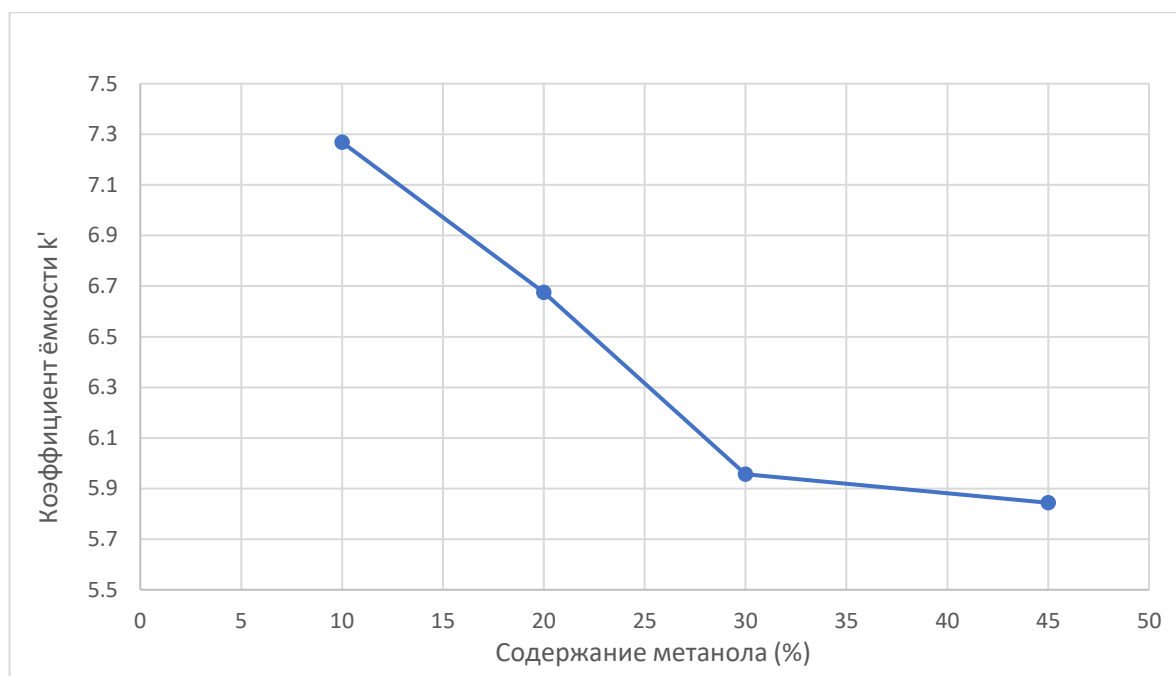


Рис. 51. Влияние содержания метанола в подвижной фазе на величину фактора удерживания надолола (подвижная фаза: АСН-МеОН-ТЕАА 10% (0.05%, pH 7.5) (об. %)).

Таблица 20. Коэффициенты ёмкости и энантиоселективности β -блокаторов

		ACN90%-TEAA10% (0.05%, pH 4.0)		ACN70%-TEAA30% (0.05%, pH 4.0)		ACN65%-TEAA35% (0.05%, pH 4.0)		ACN54%-TEAA46% (0.05%, pH 4.0)	
Вещество	logP	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
Алпренолол	2.88	8.77	1	0.52/0.75	1.44	0.42/0.56	1.33	0.79	1
Лабеталол	2.31	10.84	1	0.50/0.83	1.66	0.59	1	0.76	1
Окспренолол	2.29	6.93	1	0.42/0.74	1.76	0.44	1	0.68	1
Пиндолол	1.97	5.71	1	0.46	1	0.23/0.42	1.83	0.60	1
Метопролол	1.79	6.91	1	0.49	1	0.25/0.44	1.76	0.76	1
Надолол	1.29	7.05	1	0.36	1	0.21/0.38	1.81	0.54	1
Атенолол	0.10	5.84	1	0.31	1	0.22	1	0.44	1

Таблица 21. Хроматографические параметры разделения β -блокаторов при использовании различных буферных растворов

		ACN40%-MeOH40%-TEAA20% (0.05%, pH 4.0)			ACN40%-MeOH40%-ФБ20% (10 mM, pH 6.6)			ACN40%-MeOH40%-TEAA20% (0.05%, pH 7.5)		
Вещество	logP	№	k'	α	№	k'	α	№	k'	α
Алпренолол	2.88	1	1.69	1.03	1	7.72	1.73	1	8.14	1.21
Лабеталол	2.31	4	1.29	1.17	4	2.64	1.29	2	6.73	1.09
Окспренолол	2.29	2	1.64	1.09	6	2.03	1.31	3	6.14	1.23
Пиндолол	1.97	5	0.86	1.50	3	3.46	1.08	5	4.28	1.17
Метопролол	1.79	3	1.41	1.96	2	4.46	1.21	4	5.00	1.35
Надолол	1.29	6	0.44	1.23	5	2.46	1.85	6	3.15	1.42
Атенолол	0.10	7	0.36		7	1.09		7	2.23	

При отсутствии в подвижной фазе воды общая тенденция изменения времён удерживания при изменении полярности элюента остаётся той же, что и для нейтральной среды (рис. 52). Времена удерживания всех блокаторов становятся близки между собой и их разделение становится невозможным. Вероятно, удерживание вызвано преимущественно электростатическими взаимодействиями между карбоксильной группой лизина и аминогруппой β -блокаторов.

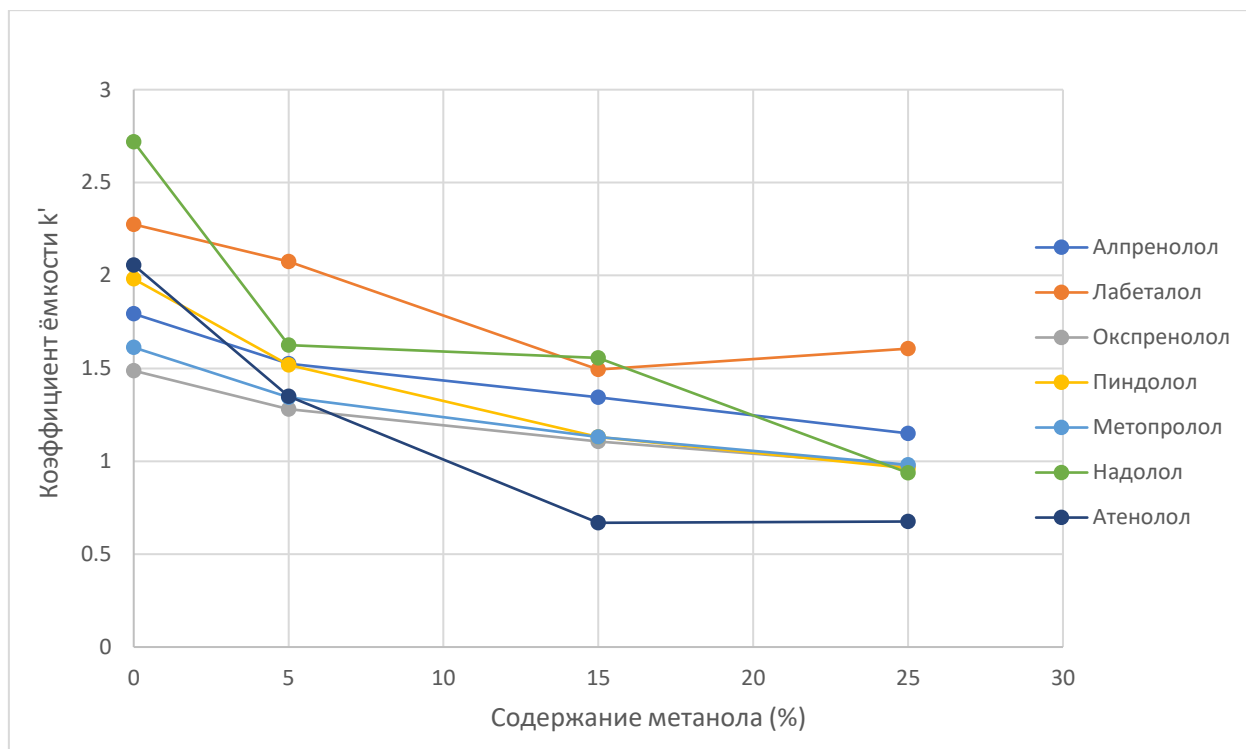


Рис. 52. Влияние содержания метанола в подвижной фазе на величину фактора удерживания β -блокаторов (подвижная фаза: ACN-МеОН + 0.05% АсОН + 0.15% ТЕА).

Лучшие результаты разделения смеси β -блокаторов достигаются при составе подвижной фазы: ACN40%-МеОН40%-буферный раствор20% (табл. 21). Увеличение кислотности буферного раствора приводит к уменьшению времён удерживания блокаторов. Рис. 53 иллюстрирует описанную зависимость. Полученные результаты хорошо согласуются с величинами коэффициентов распределения, которые возрастают при переходе от кислой среды к нейтральной. Изменения в порядке элюирования при рН 6.6 может быть связано с вкладом электростатических взаимодействий, в то время как при рН 7.5 неподвижная фаза вероятно теряет свой заряд и порядок выхода β -блокаторов соответствует их

значениям $\log P$ (табл. 21). Наиболее полное разделение было достигнуто при элюировании ПФ АСN40%-MeOH40%-TEAA20% (0.05%, pH 7.5).

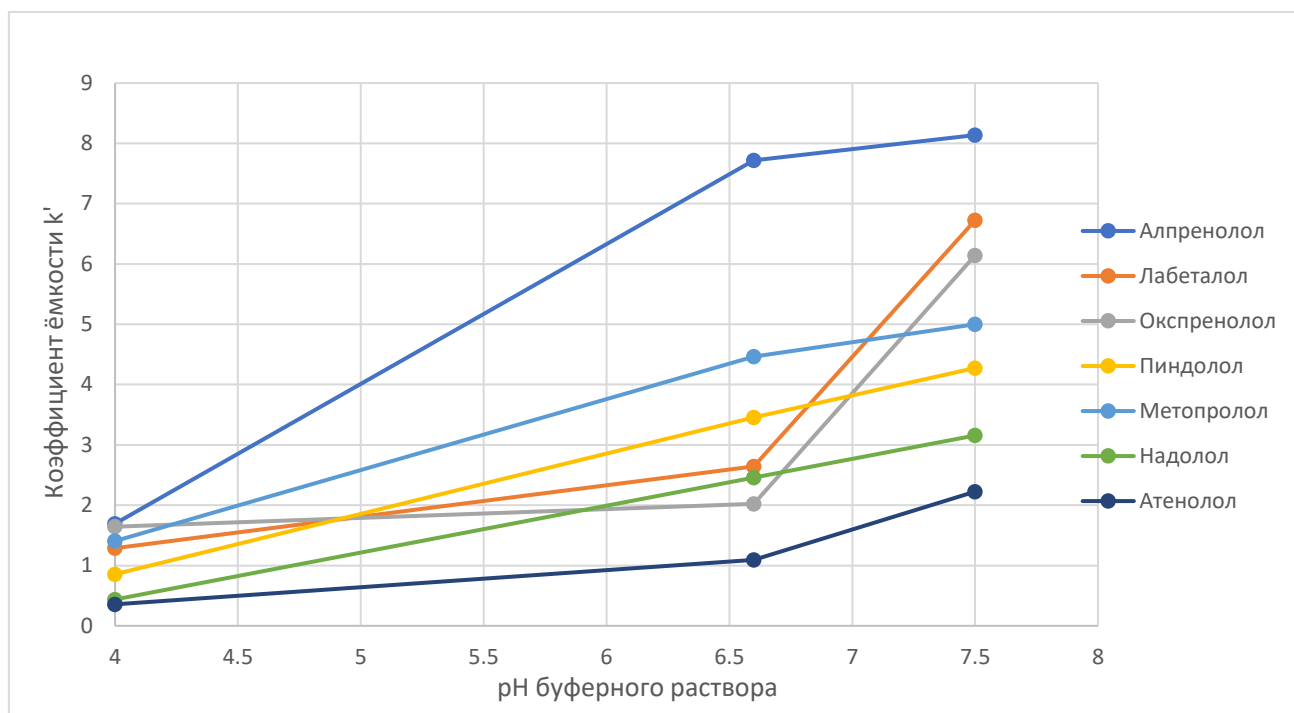


Рис. 53. Влияние pH буферного раствора на коэффициенты ёмкости блокаторов. Состав ПФ: АСN40%-MeOH40%-TEAA20% (0.05%, pH 4.0 и 7.5), АСN40%-MeOH40%-ФБ20% (10 мМ, pH 6.6).

Энантиоселективность колонки наблюдалась лишь в кислой среде (табл. 20). Ни один из использованных элюентов не позволил разделить энантиомеры наиболее гидрофильного β -блокатора атенолола. Энантиоселективность появлялась при элюировании смесью ацетонитрил/буферный раствор в диапазоне концентраций от 80/20 до 65/35, об.%. При этом в более полярной среде энантиоселективность проявляется к более гидрофильным соединениям, и наоборот. Таким образом, для разделения энантиомеров алпренолола, лабеталола и окспренолола наиболее подходящей является подвижная фаза с составом: АСN70%-TEAA30% (0.05%, pH 4.0) (об. %), а для разделения пиндоллола, метопролола и надолола: АСN65%-TEAA35% (0.05%, pH 4.0) (об. %). Селективность разделения энантиомеров β -блокаторов в данных условиях варьировалась от 1.44 до 1.83 (табл. 20).

2 Сополимер стирола и дивинилбензола, модифицированный наночастицами золота, стабилизированными макроциклическим антибиотиком³

Благодаря наличию множественных хиральных центров макроциклические антибиотики широко используются в качестве универсальных хиральных селекторов в ВЭЖХ. Среди них гликопептидные макроциклические антибиотики эремомицин и ванкомицин показали высокую энантиоселективность.

Эремомицин – отечественный гликопептидный антибиотик. Он имеет молекулярную формулу $C_{73}H_{89}N_{10}O_{26}Cl$ и молекулярную массу 1557 г/моль. Эремомицин является цвиттер-ионом, содержащим в своей структуре три фенольных ($pK_{1\alpha_2}$ 9.7, $pK_{2\alpha_2}$ 10.4, $pK_{3\alpha_2}$ 11.35) группы, три аминных (pK_{1a_1} 6.9, pK_{2a_1} 7.9, pK_{3a_1} 9.0) и карбоксильную (pK_a 3.1). Изoeлектрическая точка эремомицина находится около 8.5. Всего химическая структура эремомицина включает 22 хиральных центра. Структура эремомицина представлена на рис. 54. Как было показано в анализе литературных данных ключевую роль в энантиораспознавании играет полость у бензольного кольца С.

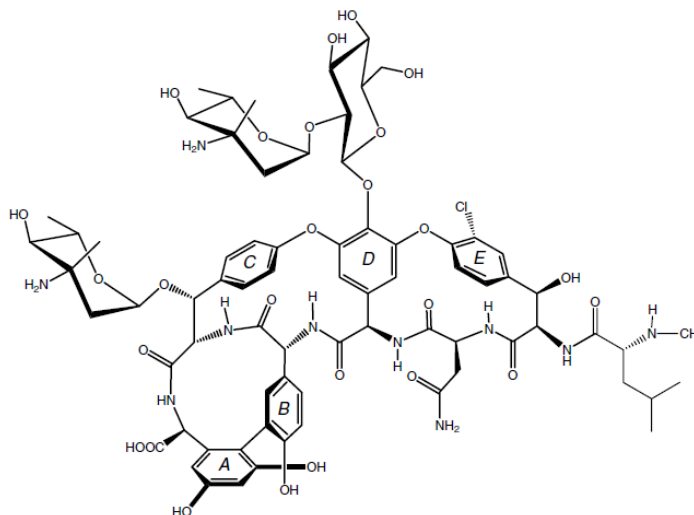


Рис. 54. Структурная формула эремомицина.

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:

1. Prosuntsova, D. S., Ananieva, I. A., Nesterenko, P. N., and Shpigun, O. A. Microspherical polystyrene-divinylbenzene particles hybridized with eremomycin stabilized gold nanoparticles as a stationary phase. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2022. Vol. 88. № 12. P. 14–20. ИФ (РИНЦ) – 0.308. 70%.
2. Просунцова, Д. С., Ананьева, И. А., Москалева, Т. А., Шпигун, О. А. Исследование механизмов удерживания профенов и β -блокаторов на полимерном наногибридном сорбенте с эремомицином // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23. № 3. С. 331–342. ИФ (Scopus) – 0.308. 60%

В структуре ванкомицина есть 3 макроциклических кольца, содержащих 5 ароматических колец, в двух из которых находятся атомы хлора в качестве заместителей (рис. 55). рКа вторичных amino-групп пептидной цепи молекулы равно 7.2, карбоксильной группы – 2.9, а трех ионизированных фенольных групп – 9.6, 11.7 и 10.5. Изоэлектрическая точка ванкомицина – 7.2. Углеводная часть молекулы содержит дисахарид L-ванкосаминил-D-глюкозу. Всего в ванкомицине находится 18 хиральных центров.

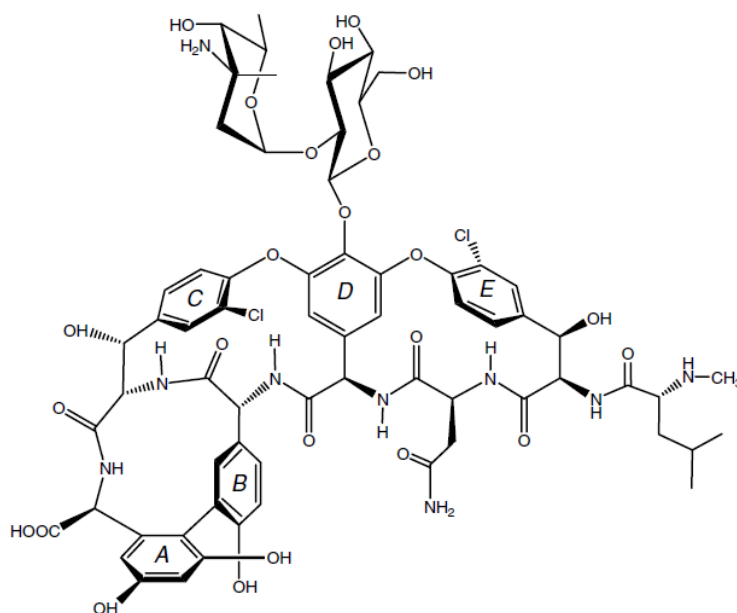


Рис. 55. Структурная формула ванкомицина.

Эремомицин и ванкомицин представляют большой интерес с точки зрения модификаторов сорбентов для ВЭЖХ, благодаря наличию большого количества функциональных групп, которые могут обеспечивать множественные комбинации гидрофобного включения, водородных связей, диполь-дипольных, π - π -взаимодействий, а также эффекты стерических затруднений, влияющие на хиральное распознавание и энантиоселективность разделения.

2.1 Синтез и характеристика наночастиц золота, стабилизированных макроциклическим антибиотиком

2.1.1 Синтез и характеристика наночастиц золота, стабилизированных эремомицином

Азотсодержащие антибиотики могут выступать одновременно восстановителями и стабилизаторами при синтезе НЧЗ из

золотохлористоводородной кислоты. В данной работе были получены НЧЗ напрямую восстановлением золотохлористоводородной кислоты эремомицином без промежуточной стадии синтеза цитрат-стабилизированных НЧЗ. За основу синтеза была взята следующая схема: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и эремомицин смешивали в боратном буферном растворе и нагревании смесь в круглодонной колбе до кипения с обратным холодильником до образования насыщенного винного цвета [118].

Проводили оптимизация синтеза НЧЗ, стабилизированных эремомицином. Варьировали концентрации $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, эремомицина, боратного буферного раствора, время кипячения, условия нагревания. Целью было получение наиболее концентрированной и устойчивой к агрегации суспензии. В ранее опубликованной методике для синтеза брали концентрацию золотохлористоводородной кислоты 100 мкг/мл [118], получаемый раствор НЧЗ имел красный цвет, но был прозрачным, что свидетельствовало о низкой концентрации НЧЗ. Методом спектрофотометрии было показано, что интенсивность характеристического пика с максимумом в районе 530 нм невелика (рис. 56). Полученные микрофотографии ПЭМ, показали, что образуются НЧЗ размером 10-20 нм, но концентрация частиц мала. Было решено попытаться повысить концентрацию золотохлористоводородной кислоты при синтезе. При концентрации 1 мг/мл образуется непрозрачный раствор очень интенсивного винного цвета, однако суспензия наночастиц не устойчива, быстро образуется осадок. На спектре характеристического пика не наблюдается (рис. 56). Опираясь на литературные данные [131] было решено взять концентрацию HAuCl_4 равной 1 мМ, что соответствует примерно 400 мкг/мл, остальные условия оставить прежними. Полученный раствор НЧЗ после 1 часа нагрева был непрозрачным тёмно-вишнёвого цвета. На спектре наблюдался интенсивный, хорошо различимый, характеристичный пик на 530 нм, при более долгом нагревании (2 часа) его интенсивность многократно увеличивается и спектр приобретает вид, схожий со спектром НЧЗ, стабилизированных цитратом, полученных по хорошо отработанному методу Туркевича.

Нагрев реакционной смеси для получения НЧЗ проводили разными способами. Смесь нагревали в круглодонной колбе на колбонагревателе с обратным холодильником. В другом варианте нагревали колбу на магнитной мешалке с обратным холодильником при перемешивании. По данным спектрофотометрии

видно, что спектры схожи при обоих методах нагрева (рис. 56). Таким образом, способ нагрева при перемешивании или без не вносит существенных различий в получаемые НЧЗ.

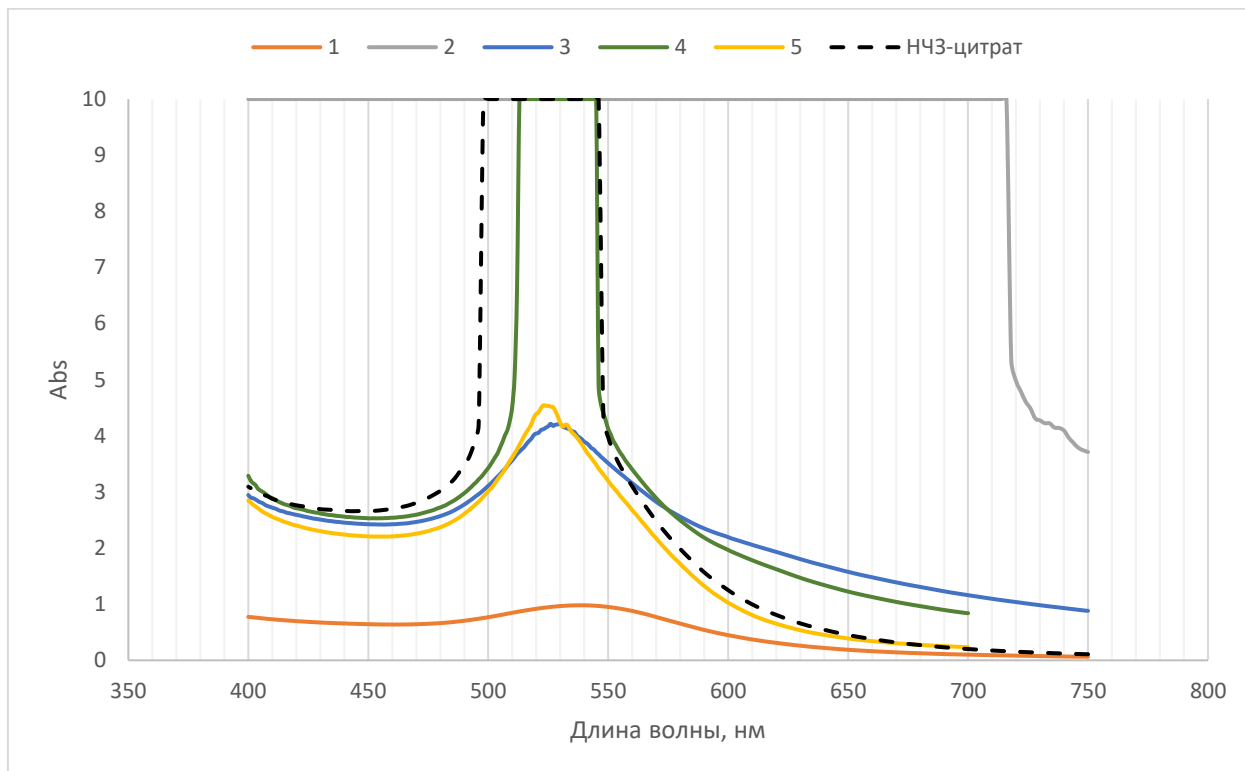


Рис. 56. 1 – концентрация HAuCl_4 100 мкг/мл; 2 – концентрация $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 мг/мл; 3 – концентрация $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 400 мкг/мл, нагрев на колбонагревателе; 4 – концентрация $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 400 мкг/мл, нагрев 2 часа; 5 – концентрация $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 400 мкг/мл перемешивание и нагрев на магнитной мешалке.

Проводили варьирование концентрации антибиотика при синтезе НЧЗ. В статье, на методику из которой опирались [118], брали концентрацию эремомицина в 10 раз больше концентрации $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. При варьировании концентраций золотохлористоводородной кислоты сохраняли данное соотношение. При соотношении антибиотика и кислоты меньше, чем 10:1, окрас раствора НЧЗ из слабо розового при дальнейшем нагревании переходил в сине-фиолетовый, и на дне образуются видимые глазу агрегаты. При повышении соотношения до 20:1 необходимый окрас раствор приобретал за более короткое время нагревания (1 час), образуется устойчивая суспензия НЧЗ, которая может храниться продолжительное время.

Во всех описанных экспериментах использовали боратный буферный раствор концентрации 0.05 М. Увеличение концентрации буферного раствора, либо не изменяло, либо ухудшало характеристики суспензий НЧЗ (рис. 57).

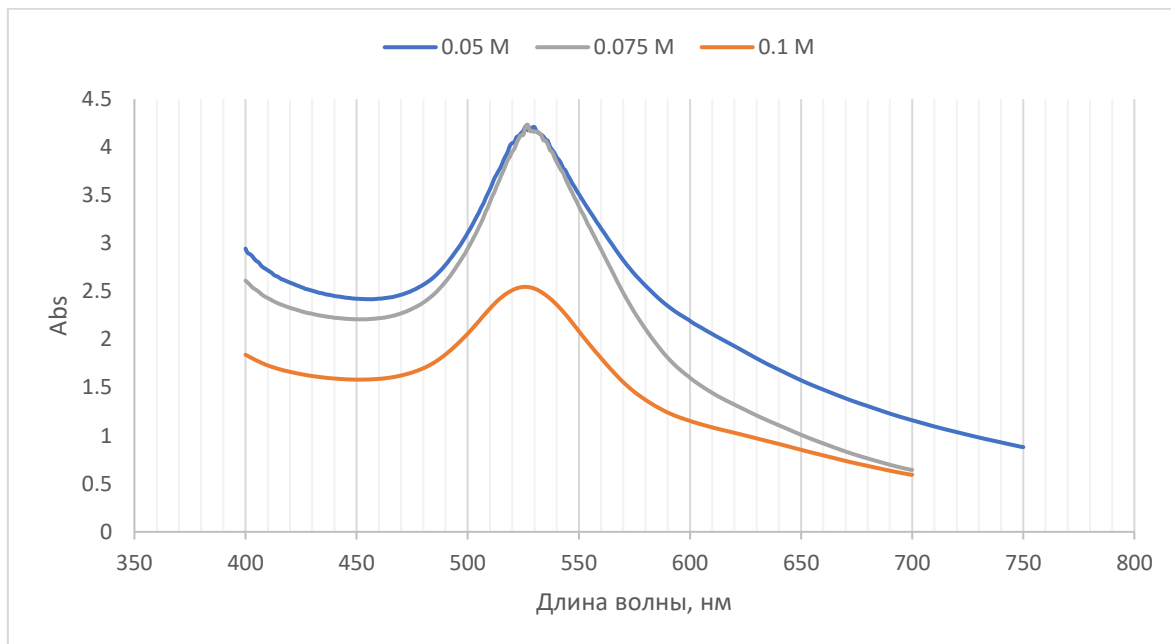


Рис. 57. Варьировании концентрации ББ при синтезе НЧЗ, концентрация НЧЗ 400 мкг/мл, эремомицина 4 мг/мл, нагрев 1.5 часа.

Время нагревания реакционной смеси для получения насыщенного раствора НЧЗ зависело от интенсивности нагрева, объёма раствора, соотношения концентраций антибиотика и золотохлористоводородной кислоты. В данных экспериментах время нагревания варьировалось от 1 до 2 часов, конец реакции определяли по достижению характерной тёмно-вишнёвой окраски раствора и спектрофотометрически.

Для сравнения получаемых НЧЗ, стабилизированных эремомицином, по описанной выше методике (Методика 10), были получены НЧЗ с эремомицином альтернативным методом. Был выбран метод ранее описанный в литературе для получения НЧЗ, стабилизированных цефиксимом [131]. В данной методике не использовалось нагревание, реакция проходит при перемешивании на магнитной мешалке, в качестве восстановителя добавляется триэтиламин (ТЭА), и используется меньшие объёмы антибиотика. Раствор золота ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1 мМ) смешивали с 1 мМ раствором эремомицина в соотношении 13: 1 (Au : эремомицин). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, а затем к ней добавляли 0.1 мл триэтиламина. Цвет смеси постепенно становился тёмно-вишнёвым, перемешивали

в течение 2 ч (Методика 11). Получение НЧЗ подтверждали спектрофотометрически (рис. 58).

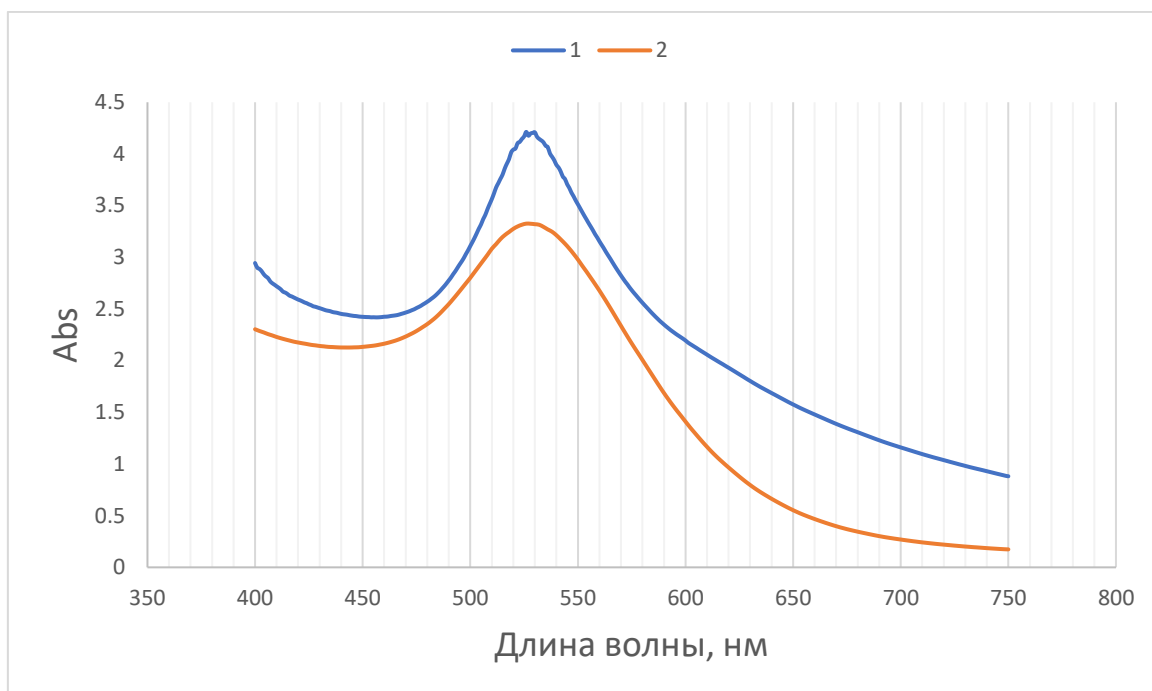


Рис. 58. Спектры растворов НЧЗ, стабилизированных эремомицином: 1 – полученные в ББ (методика 10), 2 – полученные при добавлении ТЭА (методика 11).

Проводили изучение устойчивости растворов НЧЗ, стабилизированных эремомицином, в зависимости от рН. В сильнокислых средах раствор НЧЗ, стабилизированных эремомицином, не устойчив. Большой диапазон рН, в котором НЧЗ не агрегировались, наблюдали для НЧЗ, стабилизированных по методике 11. Раствор НЧЗ, полученных по методике 11, стабилен при рН от 5 до 12 единиц (рис. 59), раствор НЧЗ, полученных по методике 10, устойчив в диапазоне рН=8-12.

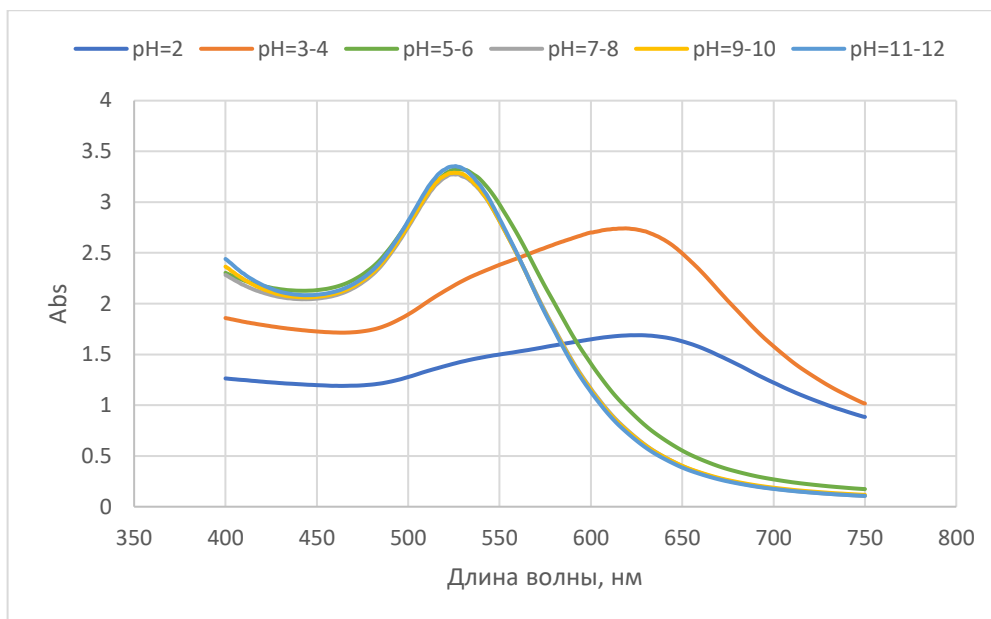
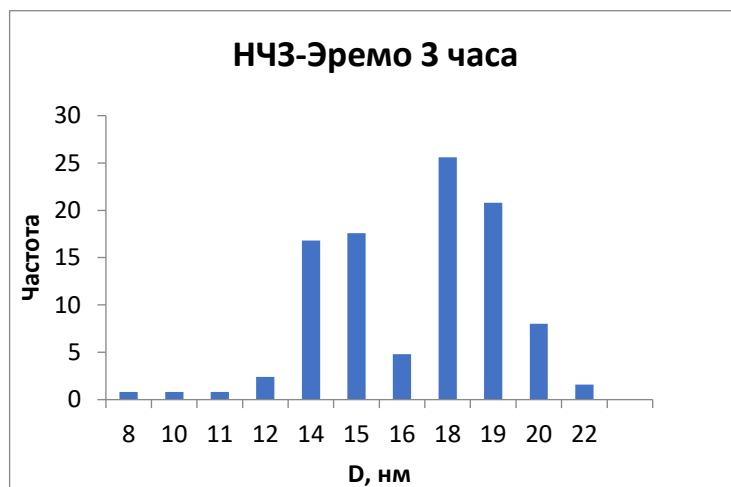


Рис. 59. Спектры растворов НЧЗ, стабилизированных эремомицином, полученные по методике 2 при различных значениях pH.

Для растворов НЧЗ, стабилизированных эремомицином, полученных в боратном буферном растворе, с изначальными концентрациями $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 100 мкг/мл, антибиотика 1 мг/мл, исследовали влияния времени кипячения реакционной смеси на форму и размер наночастиц, определяемых методом ПЭМ. При кипячении в течении 3 часов преимущественно образуются НЧЗ двух размеров: около 14 нм и 18 нм (рис. 60). Встречаются НЧЗ различных форм: правильный шестигранник (53%), круг (19%), ромб (8%), треугольник (10%), прямоугольник (10%). Основная часть НЧ имеет форму правильных шестигранников. При увеличении времени кипячения до 8 часов мы наблюдаем схожее с предыдущим распределение НЧЗ по размерам с небольшим смещением к середине двух размеров, 14.5 нм и 17.5 нм (рис. 61). Наблюдается больший разброс по размерам. Соотношение форм наночастиц остается приблизительно прежней. При кипячении реакционной смеси 12 часов видно, что уже преобладает один размер НЧЗ, около 15 нм, однако разброс увеличивается. НЧЗ имеют преимущественно форму круга и шестигранника (рис. 62). НЧЗ, полученные по методике 10 (НЧЗ-Эремо) и методике 11 (НЧЗ-Эремо(ТЕА)) также исследовали методом ПЭМ. В первом случае наблюдается довольно узкое распределение по размерам наночастиц со средней величиной 17 нм (рис. 63). Во втором случае разброс был больше, а средний размер меньше – 14 нм (рис. 64). Как и в предыдущих случаях для наночастиц, полученных в боратном

буферном растворе, встречались различные формы: треугольник (3%), ромб (13%), квадрат (14%), шестиугольник (34%), круг (35%). Наночастицы, полученные по методике с триэтиламиноном, были круглой формы.



НЧЗ-Эремо (3 ч)

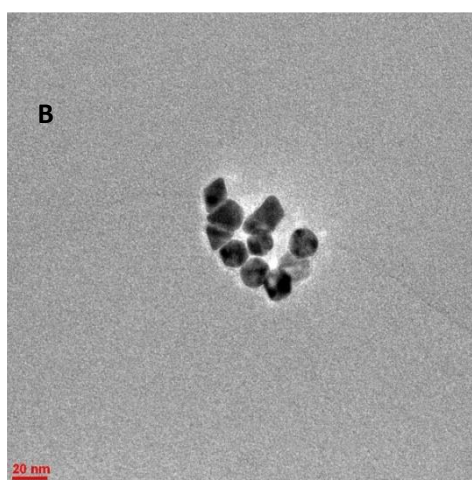
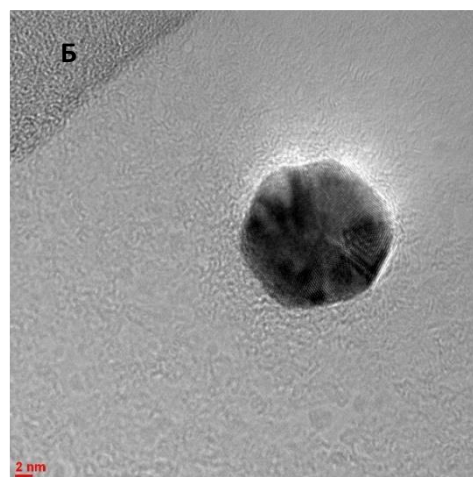
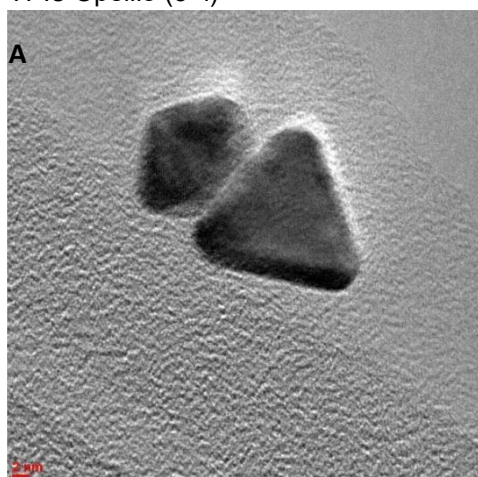
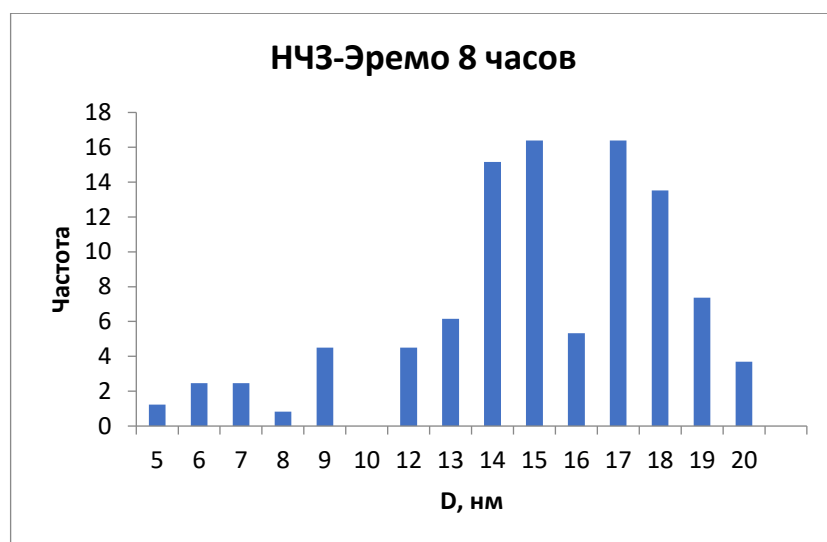


Рис. 60. Гистограмма распределения НЧЗ по размерам и микрофотографии ПЭМ для НЧЗ-Эремо (кипячение 3 часа) (А, Б, В).



НЧЗ-Эремо (8 ч)

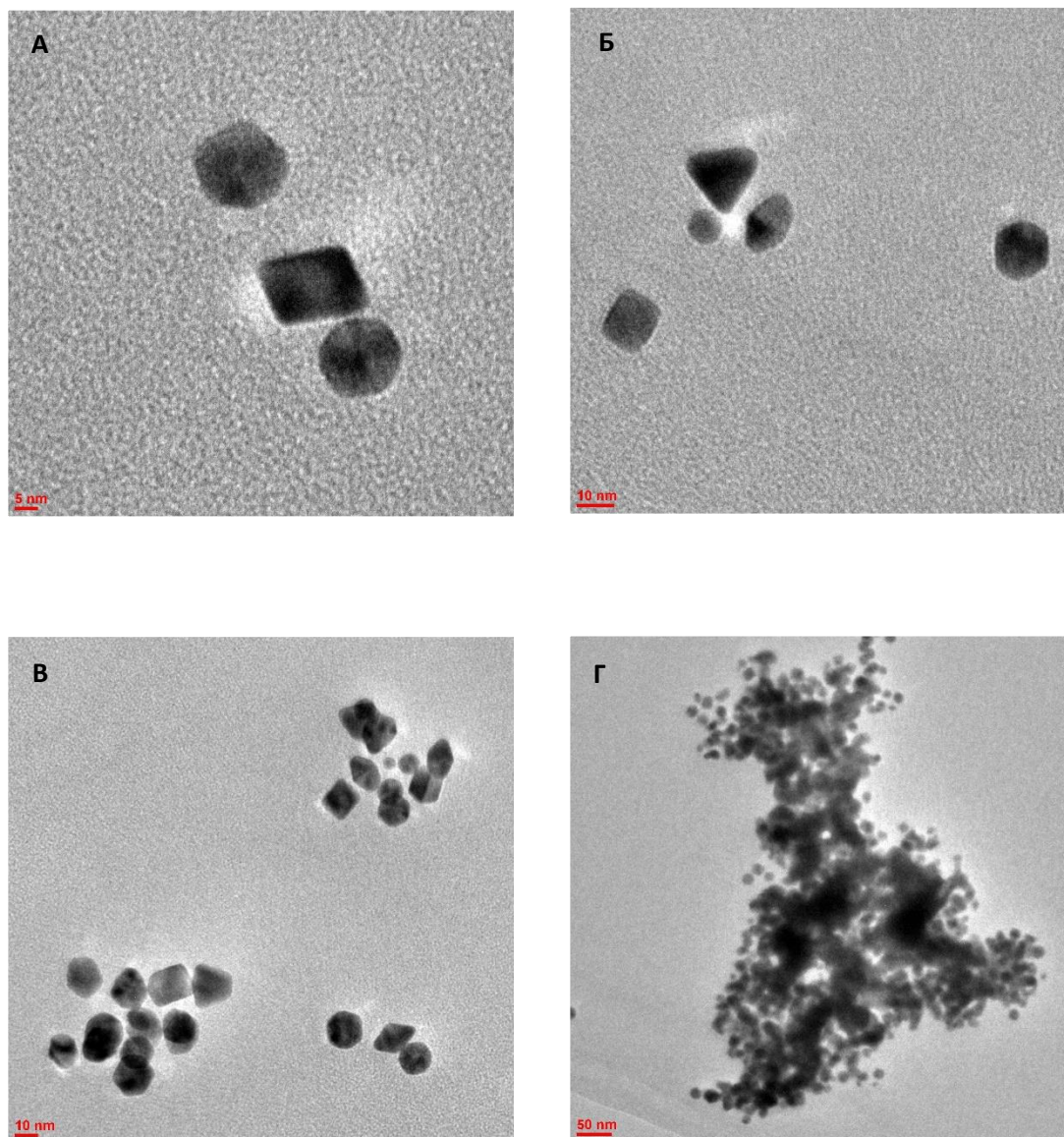
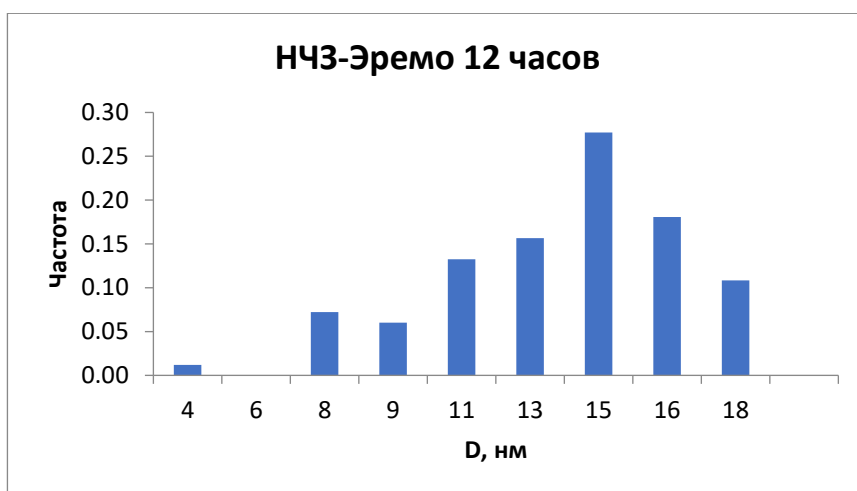


Рис. 61. Гистограмма распределения НЧЗ по размерам и микрофотографии ПЭМ для НЧЗ-Эремо (кипячение 8 часов) (А, Б, В, Г).



НЧЗ-Эремо (16 ч)

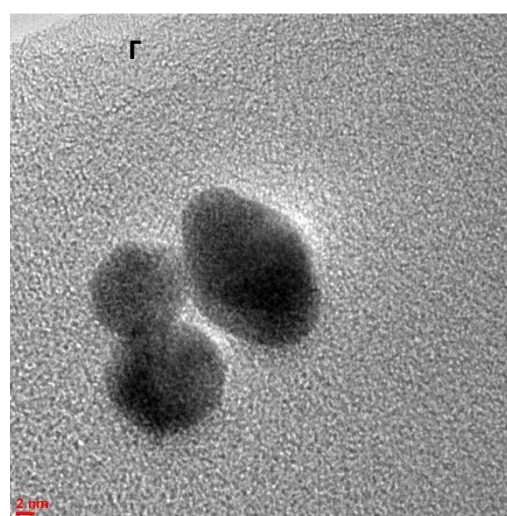
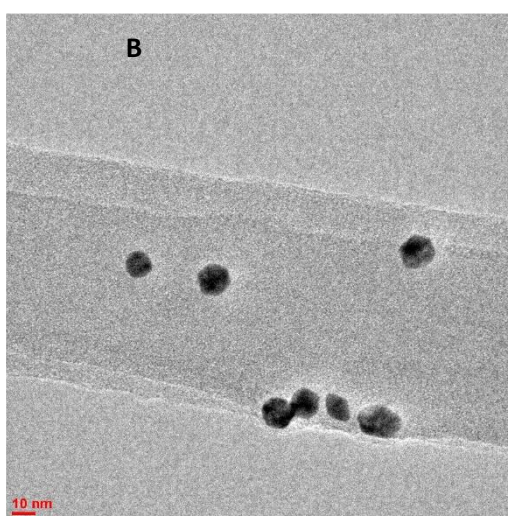
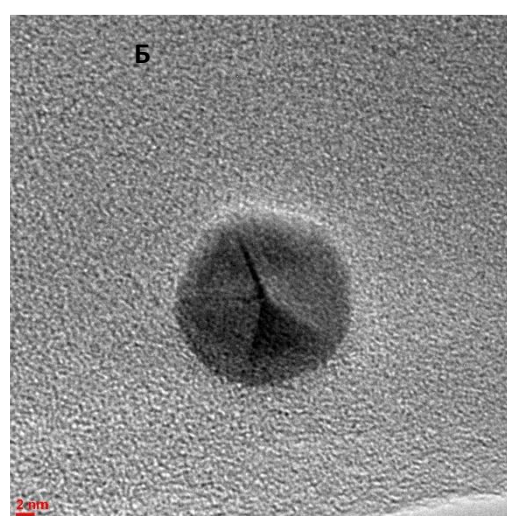
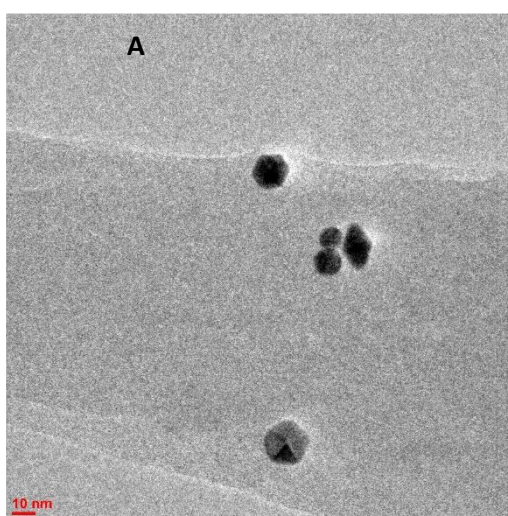
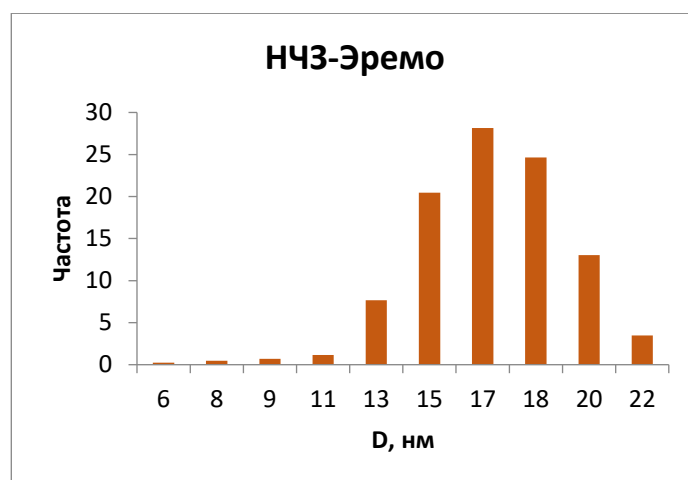


Рис. 62. Гистограмма распределения НЧЗ по размерам и микрофотографии ПЭМ для НЧЗ-Эремо (кипячение 12 часов) (А, Б, В, Г).



НЧЗ-Эремо

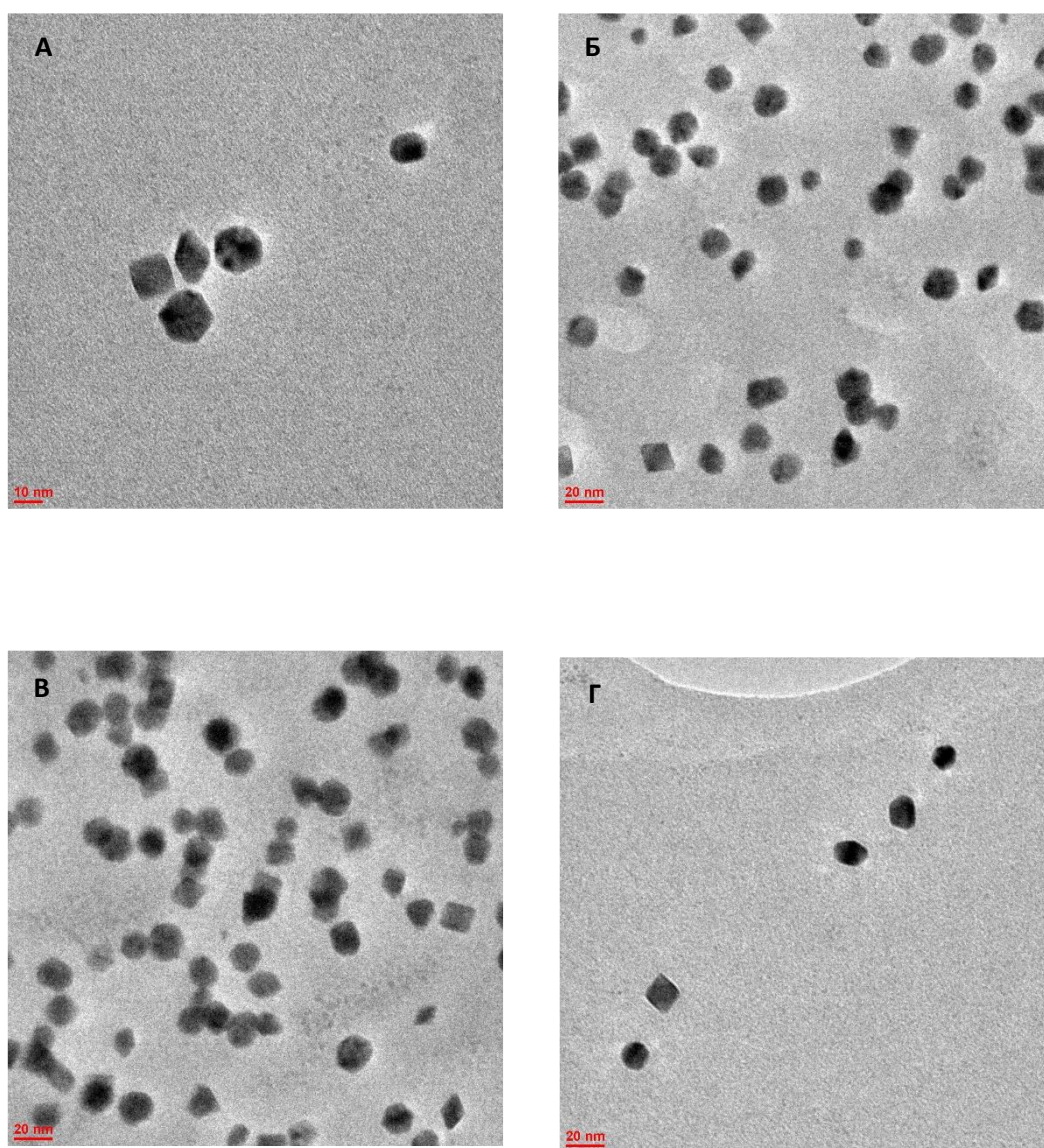
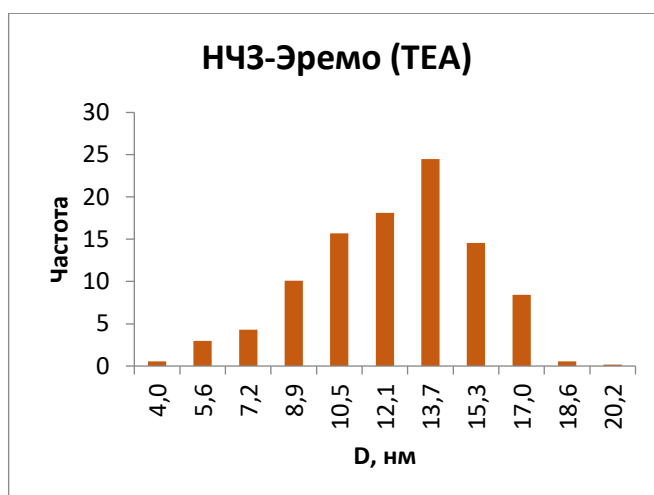


Рис. 63. Гистограмма распределения НЧЗ по размерам и микрофотографии ПЭМ для НЧЗ-Эремо (Методика 10) (А, Б, В, Г).



НЧЗ-Эремо(ТЕА)

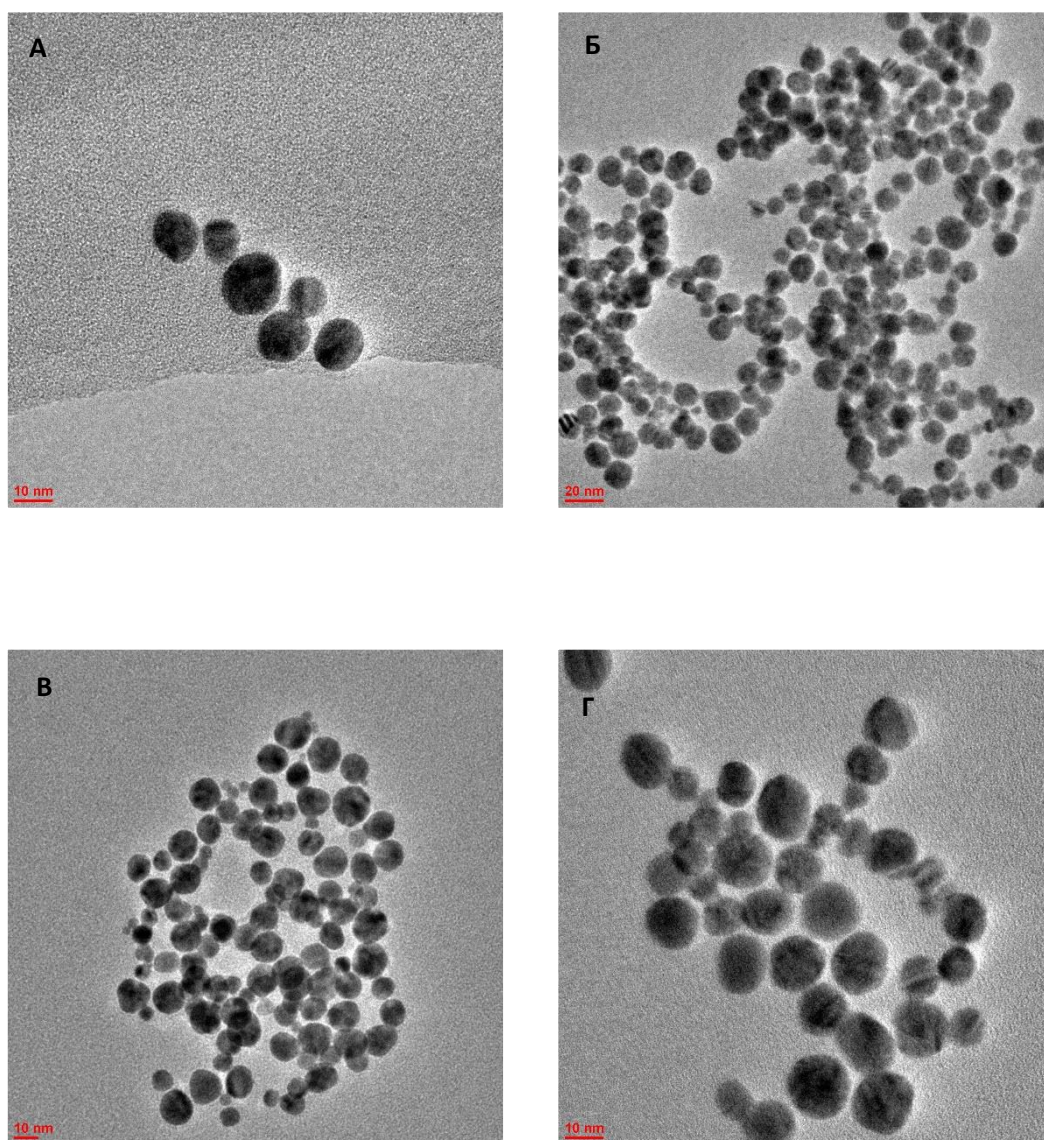


Рис. 64. Гистограмма распределения НЧЗ по размерам и микрофотографии ПЭМ для НЧЗ-Эремо(ТЕА) (Методика 11) (А, Б, В, Г).

2.1.2 Синтез и характеристика наночастиц золота, стабилизированных ванкомицином

По методике 10 (НЧЗ-Ванко) и методике 11 (НЧЗ-Ванко(ТЕА)) были получены наночастицы золота, стабилизированные антибиотиком ванкомицином. Полученные растворы имели винный цвет, методом спектрофотометрии подтверждали образование НЧЗ по характеристичному пику в районе 530 нм (рис. 65).

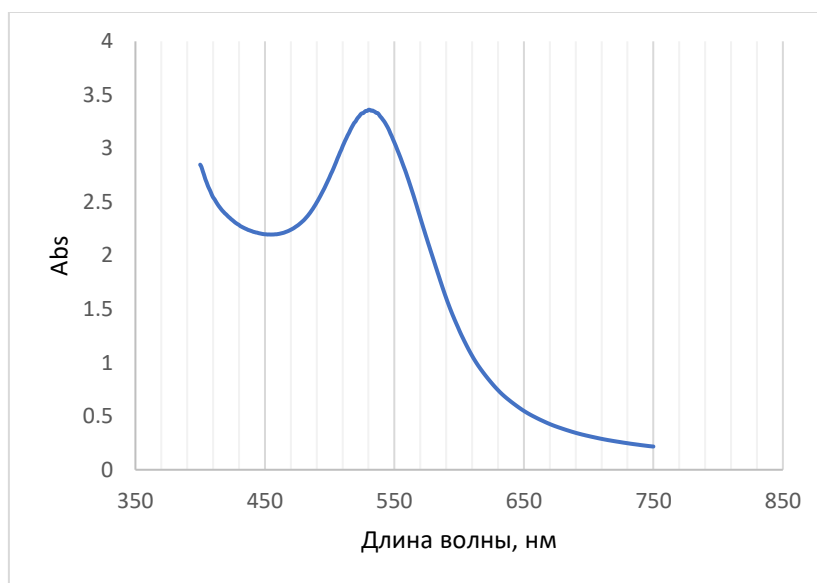
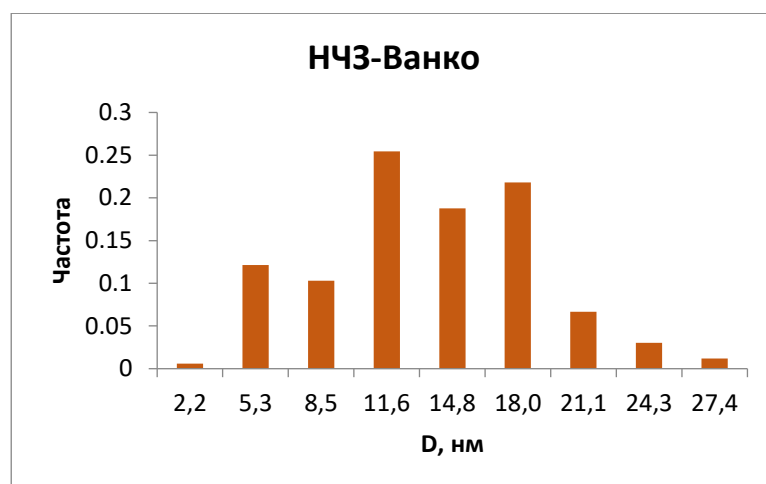


Рис. 65. Спектр наночастиц золота, стабилизированных ванкомицином.

Полученные наночастицы золота исследовали методом просвечивающей электронной спектроскопии. НЧЗ, синтезированные по обеим методикам, имели преимущественно сферическую форму, частиц других форм встречалось менее 1 %. В обоих случаях разброс по размерам был довольно большой. для НЧЗ-Ванко, в равной степени встречаются наночастицы размером от 10 до 20 нм (рис. 66), однако для НЧЗ-Ванко(ТЕА) можно выделить преобладающий размер около 18 нм (рис. 67).



НЧЗ-Ванко

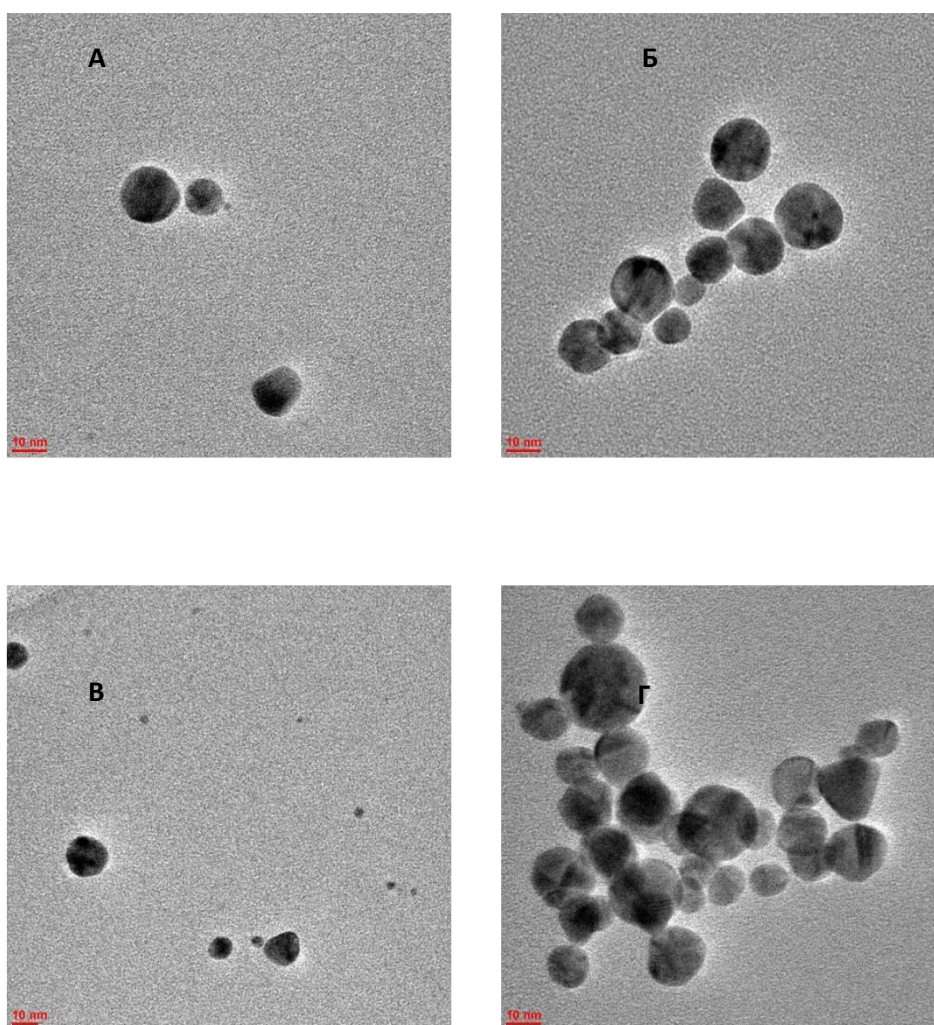


Рис. 66. Гистограмма распределения НЧЗ по размерам и микрофотографии ПЭМ для НЧЗ-Ванко (Методика 10) (А, Б, В, Г).

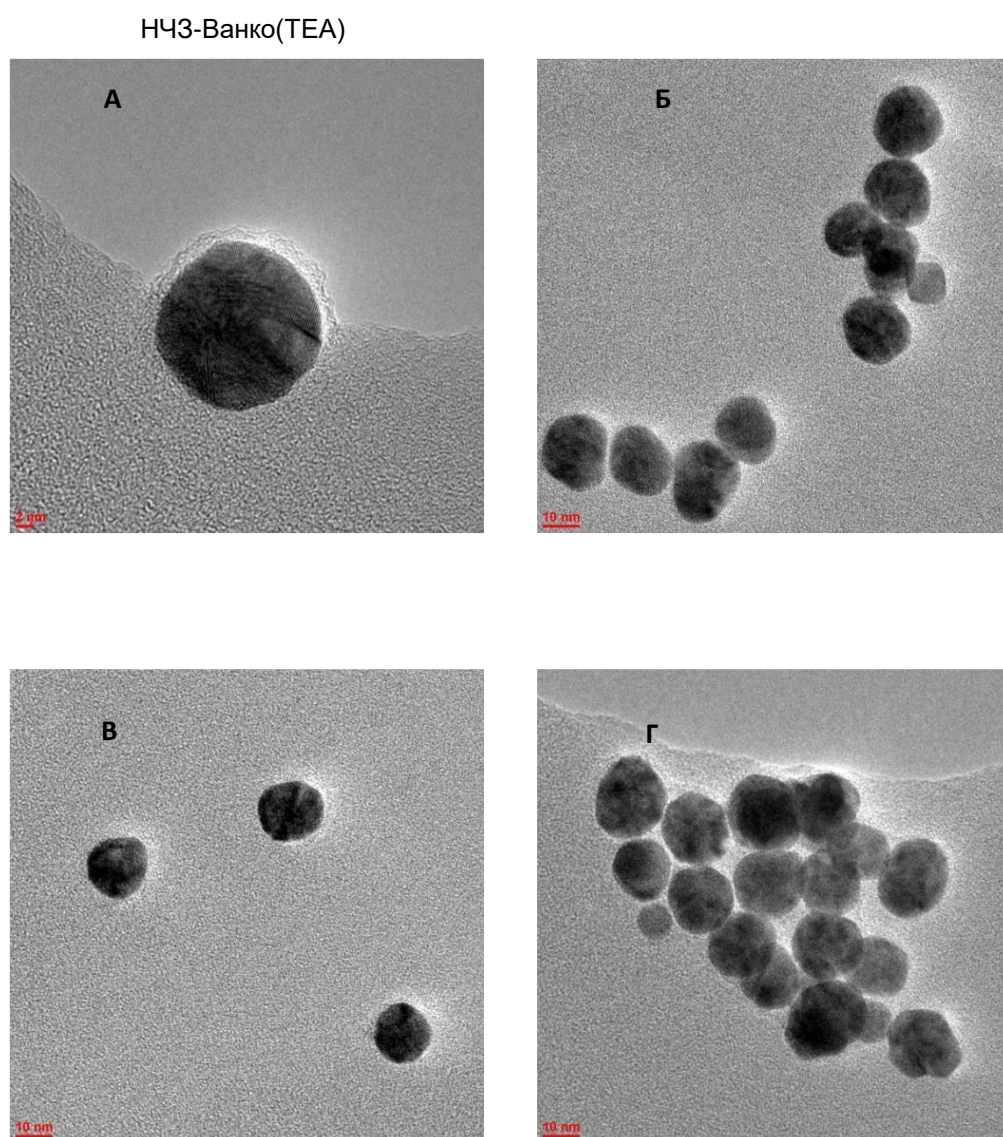
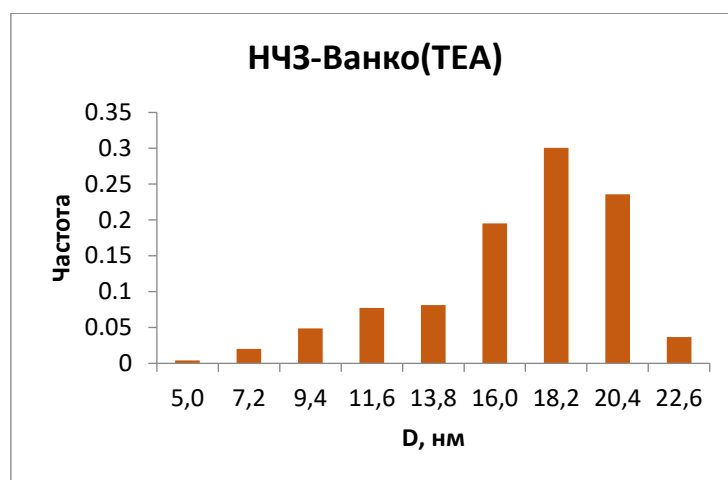


Рис. 67. Гистограмма распределения НЧЗ по размерам и микрофотографии ПЭМ для НЧЗ-Ванко(ТЕА) (Методика 11) (А, Б, В, Г).

2.2 Синтез и характеристика сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота, стабилизированными макроциклическим антибиотиком

Проводили сорбцию полученных НЧЗ, стабилизированных эремомицином, на микрочастицы полистирол-дивинилбензола. Изучали сорбцию НЧЗ на ПС-ДВБ с различными характеристиками, влияние условий сорбции на количество закреплённого золота, на структуру получаемых сорбентов. В качестве матрицы для модификации наночастицами золота были взяты три партии ПС-ДВБ. Все три сополимера имеют структуру с высокой степенью сшивки, у *ПС-ДВБ-2* и *ПС-ДВБ-3* средний диаметр пор около 10 нм, у *ПС-ДВБ-4* 20-30 нм. Учитывая, что все получаемые НЧЗ имеют размер меньше 20 нм, такое сравнение представляет интерес, так как при сорбции в последнем случае, наночастицы могут покрывать внутрипористую поверхность полимера. Геометрические характеристики сорбентов рассчитывали методом БЭТ с использованием данных по адсорбции азота при низких температурах. Матрицы имеют разную площадь функциональной поверхности от 270 до 610 м²/г (табл. 22).

Таблица 22. Характеристики используемых полимерных матриц

Сорбент	S поверхности, м ² /г	V пор, см ³ /г	S микропор, м ² /г
<i>ПС-ДВБ-2</i>	400	0.32	70
<i>ПС-ДВБ-3</i>	270	0.20	30
<i>ПС-ДВБ-4</i>	610	0.47	120

Сорбцию НЧЗ, стабилизированных эремомицином, проводили путём длительного интенсивного перемешивания суспензии ПС-ДВБ в подкисленном до pH=8 растворе наночастиц. Модифицированный сорбент фильтровали на стеклянном пористом фильтре, промывали водой и метанолом, высушивали на воздухе. Получали твёрдый порошок окраски от розовой до фиолетовой в зависимости от условий синтеза. Количество сорбированного золота определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопией по методике 13.

При сорбции на матрицу *ПС-ДВБ-2* варьировали время перемешивания. Для эксперимента брали одинаковое соотношение: на 1 г сорбента 20 мл раствора наночастиц, синтезированных по методике 10. Перемешивали на шейкере в конической колбе в течении 24 и 5 часов. В табл. 23 приведены геометрические характеристики и массовая доля золота. Существенной разницы в характеристиках сорбентов, который перемешивался 24 часа и 5 часов нет, можно сделать вывод, что для сорбции всех НЧЗ достаточно 5 часов. При времени перемешивания 24 часа на микрофотографиях СЭМ были обнаружены длинные структуры волокон. Возможно, при длительном перемешивании начинается полимеризация азотосодержащих соединений смеси, данный феномен был описан при синтезе НЧЗ [129]. ПС-ДВБ очень гидрофобное вещество, поэтому в чисто водном растворе плохо смачивается. Было интересно изучить как повлияет добавка органического растворителя к адсорбционной суспензии. Для этого готовили 2 раствора подкисленных наночастиц золота, к одному добавили 20% этанола, к другому столько же воды, чтобы учесть разбавление, добавляли одинаковое количество *ПС-ДВБ-2* и ставили перемешивать в течении 5 часов. По полученным результатам видно, что добавка этанола благоприятно влияет на сорбцию наночастиц, площадь поверхности, как и объем пор, увеличиваются сильнее в этом случае, и НЧЗ сорбируется больше. В обоих случаях площадь функциональной поверхности, объём и площадь пор в ходе модификации увеличивается по сравнению с исходным ПС-ДВБ. Проводили повторную адсорбцию НЧЗ, для этого брали уже модифицированный высушенный сорбент, добавили к нему свежий подкисленный раствор НЧЗ и перемешивали 5 часов. Повторная сорбция НЧЗ привела к увеличению в конечном образце количества золота, однако в таком варианте механизм сорбции может меняться, например, наночастицы будут сорбироваться друг на друга, что приведет к неравномерному покрытию поверхности. Дополнительное подкисление суспензии в ходе перемешивания, увеличивает сорбцию НЧЗ.

Таблица 23. Физико-химические характеристики сорбентов ПС-ДВБ-Аи-Эремо, полученных в разных условиях. В качестве матрицы использовали **ПС-ДВБ-2**

Сорбент	Условия синтеза	S поверхности, м ² /г	V пор, см ³ /г	S микропор, м ² /г	Au мг/г сорбента
ПС-ДВБ-2		400	0.32	70	-
ПС-ДВБ- Аи-Эремо	Перемешивание 24 часа	410	0.35	55	3.1
ПС-ДВБ- Аи-Эремо	Перемешивание 5 часов	420	0.34	60	3.7
ПС-ДВБ- Аи-Эремо	С добавлением 20% EtOH	440	0.36	70	3.2
ПС-ДВБ- Аи-Эремо	С добавлением 20% H ₂ O	420	0.35	50	2.6
ПС-ДВБ- Аи-Эремо	Повторная сорбция НЧЗ	-	-	-	4.1
ПС-ДВБ- Аи-Эремо	Дополнительное подкисление во время перемешивания	-	-	-	4.9

Проводили сорбцию наночастиц золота, полученных по методике 10 и 11 на **ПС-ДВБ-3** (табл. 24). Оба раствора НЧЗ подкисляли, перемешивали в течение 5 часов, дополнительно подкисляли через 2 часа. При сорбции НЧЗ наблюдается увеличение площади поверхности сорбентов. Наночастицы золота, полученные по методике 11, сорбируются в большем количестве.

Таблица 24. Физико-химические характеристики сорбентов ПС-ДВБ-3, ПС-ДВБ-Аи-Эремо и ПС-ДВБ-Аи-Эремо(ТЕА). В качестве матрицы использовали **ПС-ДВБ-3**

Сорбент	Условия синтеза	S поверхности, м ² /г	V пор, см ³ /г	S микропор, м ² /г	Au мг/г сорбента
ПС-ДВБ-3	-	270	0.20	30	-
ПС-ДВБ- Аи-Эремо	НЧЗ синтезированы по методике 10	340	0.26	60	6.3
ПС-ДВБ- Аи-Эремо (ТЭА)	НЧЗ синтезированы по методике 11	330	0.25	60	7.5

На полимерную матрицу **ПС-ДВБ-4** проводили сорбцию НЧЗ, стабилизированные эремомицином, в различных условиях (табл. 25). Уменьшение времени перемешивания до 2 часов приводит к снижению количества адсорбированных НЧЗ по сравнению с 5 ч. В одинаковых условиях при перемешивании на магнитной мешалке, сорбируется больше НЧЗ, чем при перемешивании на шейкере. Последовательные вторая и третья модификация сорбента приводила к значительному увеличению адсорбированного золота.

Таблица 25. Физико-химические характеристики сорбентов ПС-ДВБ-4, ПС-ДВБ-Аи-Эремо и ПС-ДВБ-Аи-Эремо(ТЕА)

Сорбент	Условия синтеза	S поверхности, м ² /г	V пор, см ³ /г	S микропор, м ² /г	Аи, мг/г сорбента	Эремомицин масс. %
ПС-ДВБ-4		610	0.47	120		
ПС-ДВБ-Аи-Эремо	Перемешивание 5 часов	390	0.27	160	8.1	12.2
ПС-ДВБ-Аи-Эремо	Перемешивание 2 часа на магнитной мешалке				6.9	
ПС-ДВБ-Аи-Эремо	Перемешивание 2 часа				3.9	
ПС-ДВБ-Аи-Эремо	Сорбция НЧЗ второй раз				7.1	
ПС-ДВБ-Аи-Эремо	Сорбция НЧЗ третий раз	350	0.21	130	10	
ПС-ДВБ-Аи-Эремо (ТЭА)	Перемешивание 5 часов с подкислением раствора НЧЗ				10.1	1.1
ПС-ДВБ-Аи-Эремо (ТЭА)	Перемешивание 5 часов без подкисления раствора НЧЗ	570	0.46	100	9.7	

Провели сорбцию НЧЗ, полученных по методике 11, такие НЧЗ сорбируются в большем количестве, чем синтезированные по методике 10. Также они одинаково сорбируются и без подкисления раствора, чего не происходит для НЧЗ, полученных в боратном буферном растворе. Для данной матрицы наблюдается уменьшение площади поверхности, объема и площади пор при модификации, хотя пористая структура сорбента сохраняется. Такой эффект проявляется сильнее при неоднократной модификации НЧЗ. При модификации НЧЗ, полученных по методике 11, уменьшение площади поверхности незначительное. Уменьшение наблюдаемых параметров по сравнению с немодифицированной матрицей для полимера с порами 20-30 нм, в отличие от обратного эффекта для сорбентов с порами 10 нм, может свидетельствовать о том, что НЧЗ адсорбируются внутри пор, возможно, перекрывая некоторые из них. Для сорбентов, модифицированных НЧЗ, полученных по методике 10 и 11, в одинаковых условиях, был выполнен элементный анализ на азот, по его результатам рассчитано процентное содержание эремомицина в синтезированном сорбенте. Содержание эремомицина в сорбенте ПС-ДВБ-Аи-Эремо на порядок больше, чем в ПС-ДВБ-Аи-Эремо(ТЭА). Это был ожидаемый результат, так как при синтезе НЧЗ изначальные концентрации антибиотика также отличаются на порядок. Вероятно, именно в такой разнице содержания эремомицина заключается причина различия в снижении площади поверхности при модификации.

2.3 Изучение физико-химических свойств сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированного наночастицами золота, стабилизированными макроциклическим антибиотиком

2.3.1 Метод сканирующей электронной микроскопии

Полученные сорбенты ПС-ДВБ, модифицированные НЧЗ, стабилизированными эремомицином, исследовали методом сканирующей электронной микроскопией. Частицы сорбентов имеют сферическую форму, размером 5-6 мкм. При одинаковых условиях проведения сорбции частицы *ПС-ДВБ-2* были подвержены разрушению (рис. 68). На поверхности ПС-ДВБ-Аи-Эремо на матрице *ПС-ДВБ-3* видны небольшие агрегаты НЧЗ. На матрицу *ПС-ДВБ-4* НЧЗ, синтезированные по обоим методикам, равномерно распределены по поверхности полимерных частиц.

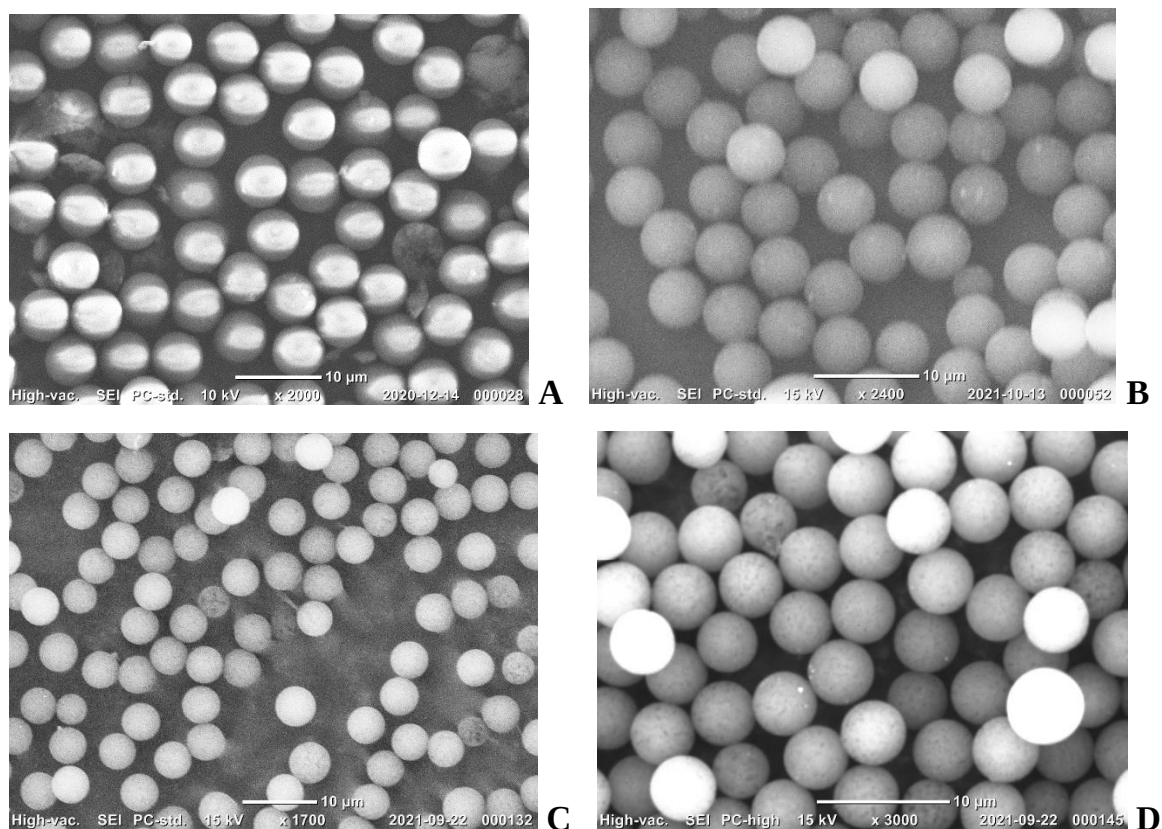


Рис. 68. Микрофотографии, полученные методом СЭМ, ПС-ДВБ-Ау-Эремо А: матрица ПС-ДВБ-2, В: матрица ПС-ДВБ-3, С: матрица ПС-ДВБ-4, D: ПС-ДВБ-Ау-Эремо(ТЭА) матрица ПС-ДВБ-4.

Перемешивание на магнитной мешалке в сравнении с шейкером было эффективнее с точки зрения количества адсорбировавшихся НЧЗ, однако, как видно по микрофотографиям частички полимера вследствие взаимодействия с якорем магнитной мешалки частично разрушаются (рис. 69).

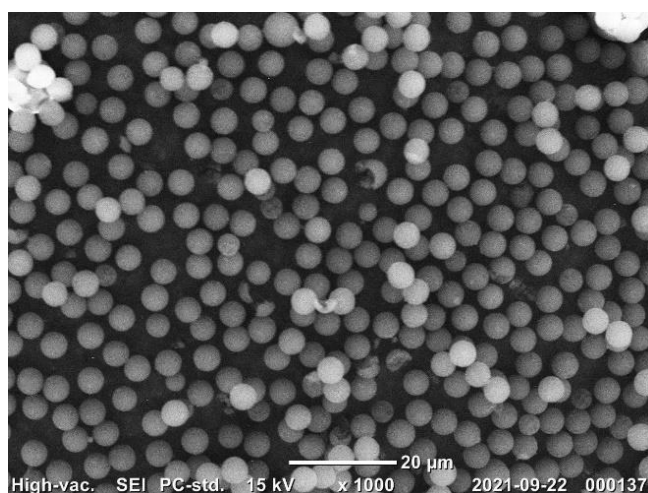


Рис. 69. Микрофотография, сделанная методом СЭМ, сорбента ПС-ДВБ-Ау-Эремо (матрица ПС-ДВБ-4), сорбцию НЧЗ проводили при перемешивании на магнитной мешалке.

Последовательное модифицирование сорбента несколько раз ведет к образованию больших агрегатов НЧЗ на поверхности полимера, их хорошо видно на микрофотографиях (рис. 70). По-видимому, при повторной сорбции НЧЗ преимущественно садятся на уже имеющиеся на поверхности наночастицы.

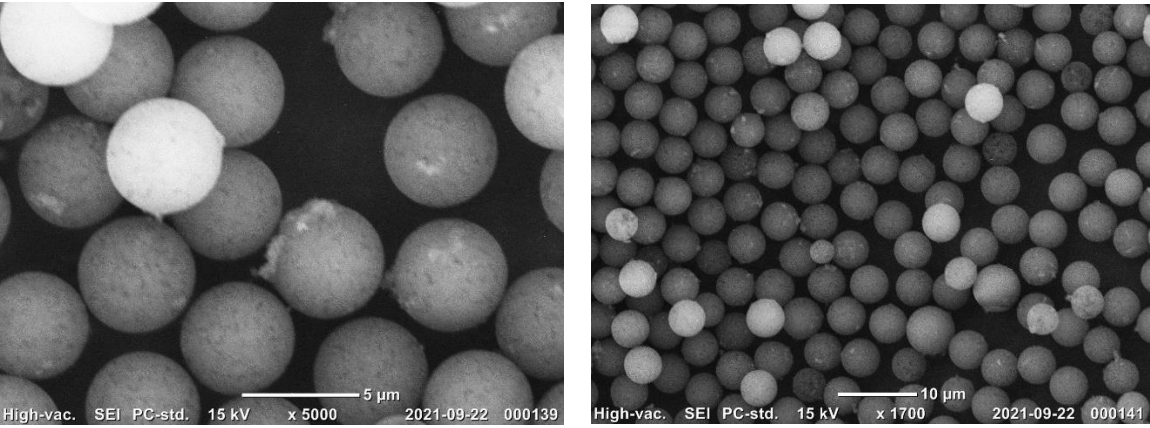


Рис. 70. Микрофотографии, сделанные методом СЭМ, сорбента ПС-ДВБ-Ау-Эремо (матрица ПС-ДВБ-4), после двукратной сорбции НЧЗ.

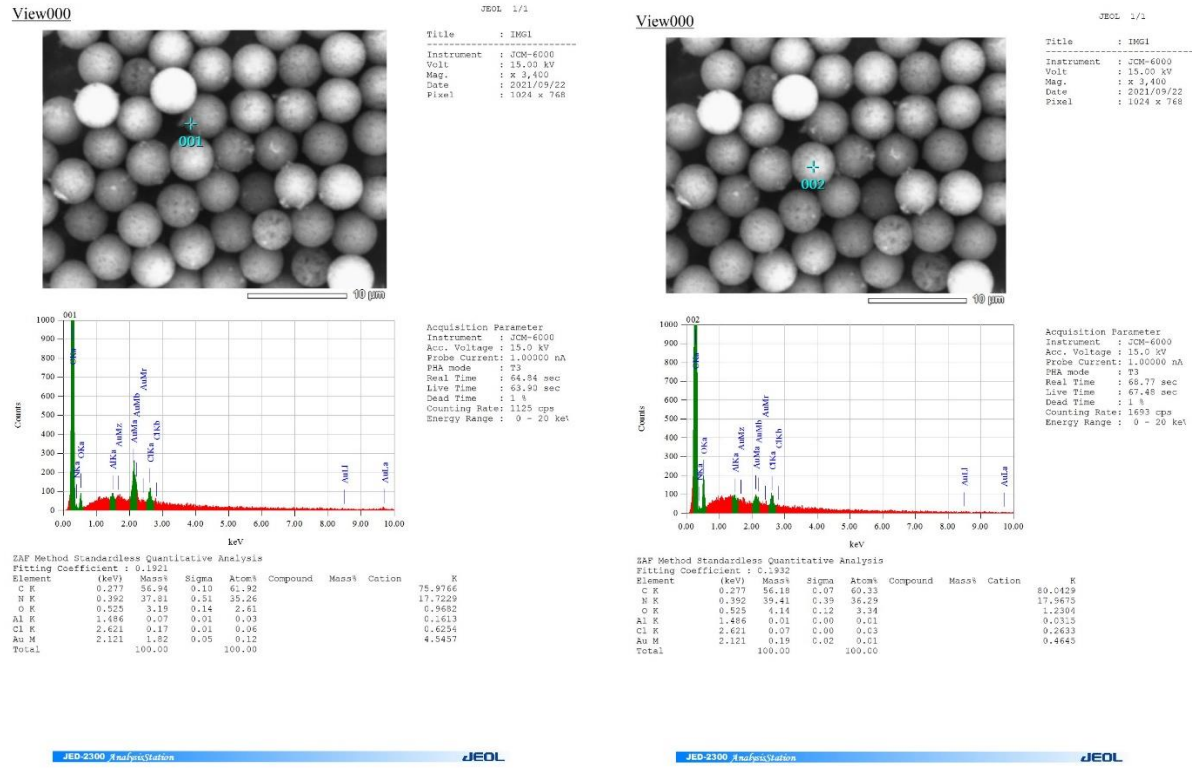


Рис. 71. Элементный анализ методом СЭМ сорбента ПС-ДВБ-Ау-Эремо (матрица ПС-ДВБ-4), после двукратной сорбции НЧЗ.

Природа агрегатов подтверждается по элементному анализу методом СЭМ (рис. 71). В точке на агрегате количество золота 1.82 масс. %, в точке на поверхности микрочастицы вне видимого агрегата количество золота 0.19 масс. %.

В пробах некоторых сорбентов при исследовании методом СЭМ были видны длинные волокна диаметром около 20 мкм. Такие структуры наблюдали для сорбента с эремомицином после 24 ч перемешивания, для других сорбентов после оставления на воздухе в течении нескольких недель. Данные структуры могут быть следствием полимеризации азотосодержащих соединений в составе получаемых сорбентов. Образование похожих структур при синтезе НЧЗ было исследовано в работе [129]. При работе с хроматографическими колонками с исследуемыми сорбентами не было замечено значительного повышения рабочего давления, также в образцах сорбентов из колонок данных структур не обнаружено.

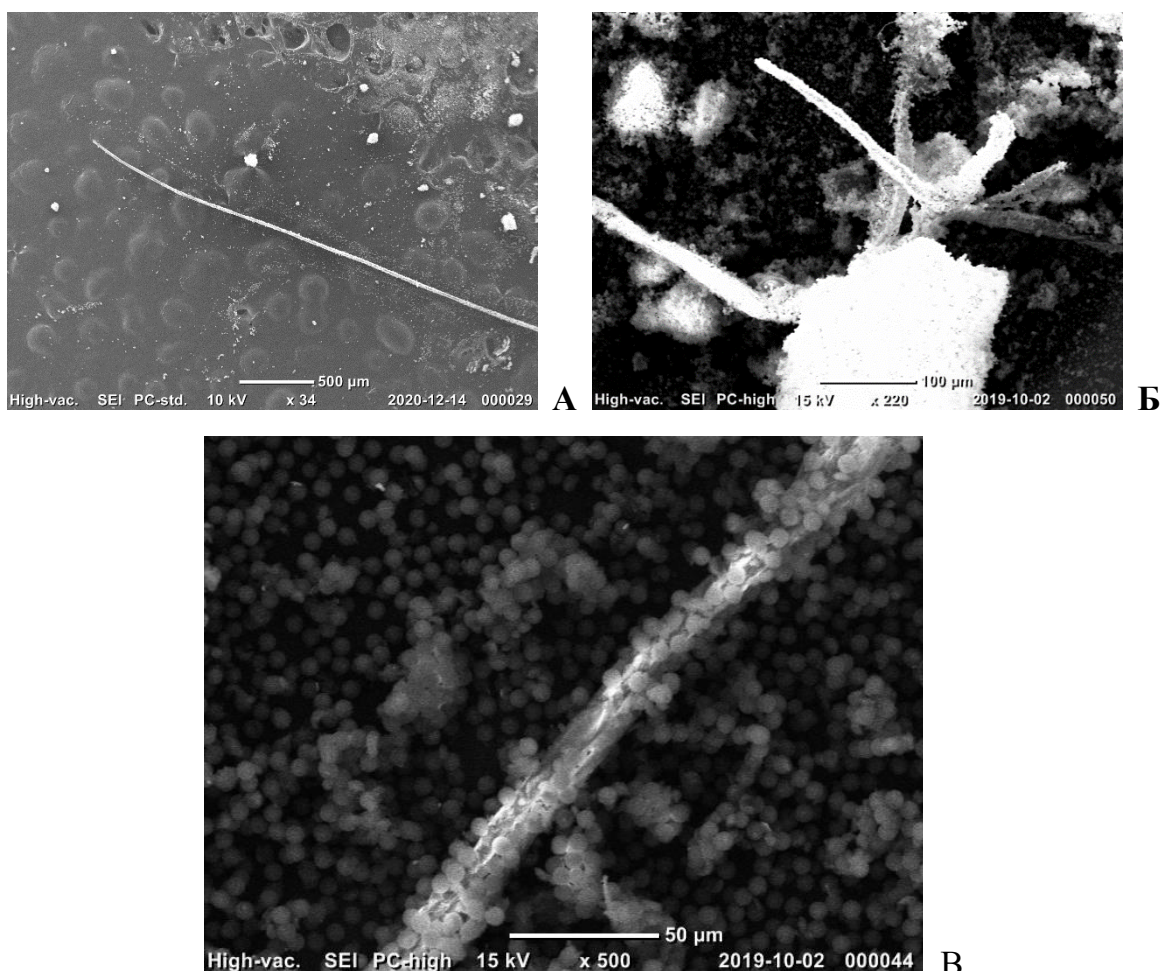


Рис. 72. Микрофотографии, сделанные методом СЭМ, сорбент ПС-ДВБ-Аи-Эремомицин после 24 ч. перемешивания (А), сорбенты ПС-ДВБ-Аи-липовая кислота-Lys (Б) и ПС-ДВБ-Аи-Ванкомицин (В) после длительного хранения на воздухе.

2.3.2 Спектроскопия диффузного отражения

Для подтверждения модификации полимерных матриц с сохранением структуры наночастиц золота были сняты спектры диффузного отражения твердых сухих сорбентов. Максимум на спектрах в районе 550 нм подтверждает наличие НЧЗ в неагрегированном состоянии на поверхности вещества (рис. 73, рис. 74).

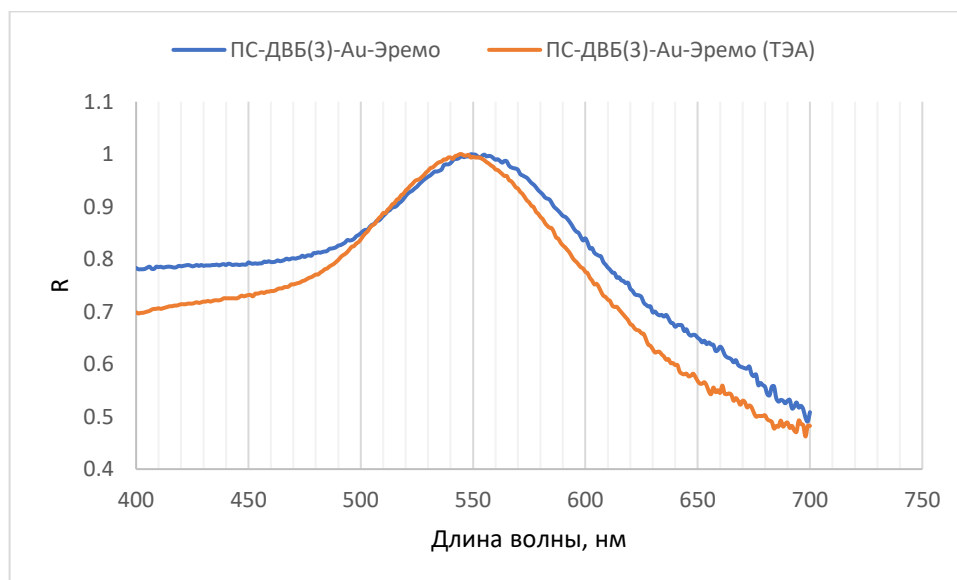


Рис. 73. Спектры диффузного отражения сорбентов PS-DVB-Au-Эремо и PS-DVB-Au-Эремо(ТЭА), матрица PS-DVB-4.

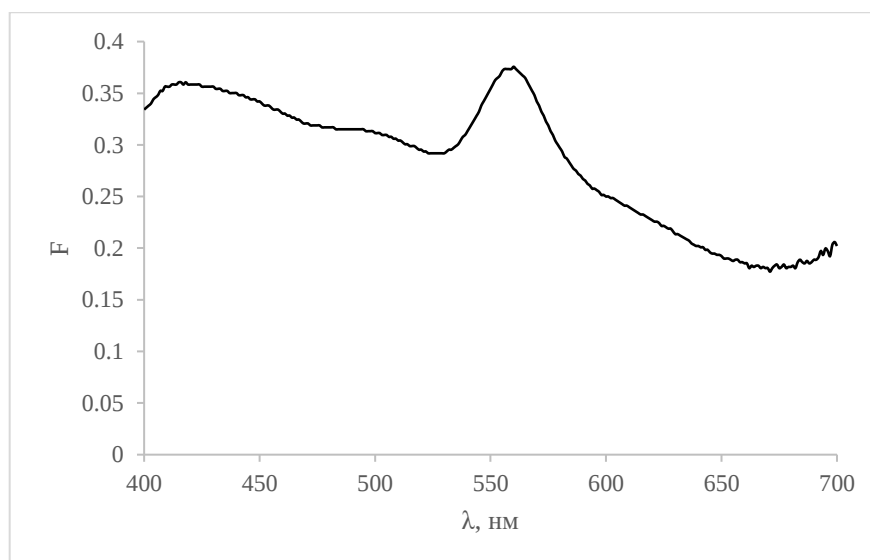


Рис. 74. Спектры диффузного отражения сорбента PS-DVB-Au-Эремо, матрица PS-DVB-3.

По результатам исследований была выбрана оптимальная методика получения сорбентов PS-DVB, модифицированных НЧЗ, стабилизированных эремомицином. Приготовить суспензию PS-DVB в этаноле (можно также

использовать метанол) объёмом 20% от общего объема. Смешать её с подкисленным раствором свежеприготовленных по методике 10 или 11 наночастиц золота, на 1 г полимера брать 20 мл НЧЗ, поставить интенсивно перемешиваться на шейкер в течение 5 часов. Отфильтровать на стеклянном пористом фильтре, промыть водой и метанолом, высушить на воздухе.

Проводили модификацию полимерной матрицы **ПС-ДВБ-4** НЧЗ, стабилизированными ванкомицином. Для этого ПС-ДВБ смачивали метанолом, добавляли раствор НЧЗ, суспензию перемешивали на шейкере в течение 5 часов. Адсорбцию НЧЗ подтверждали с помощью спектроскопии диффузного отражения (рис. 75). На полученных спектрах наблюдается характерный пик в районе 550 нм.

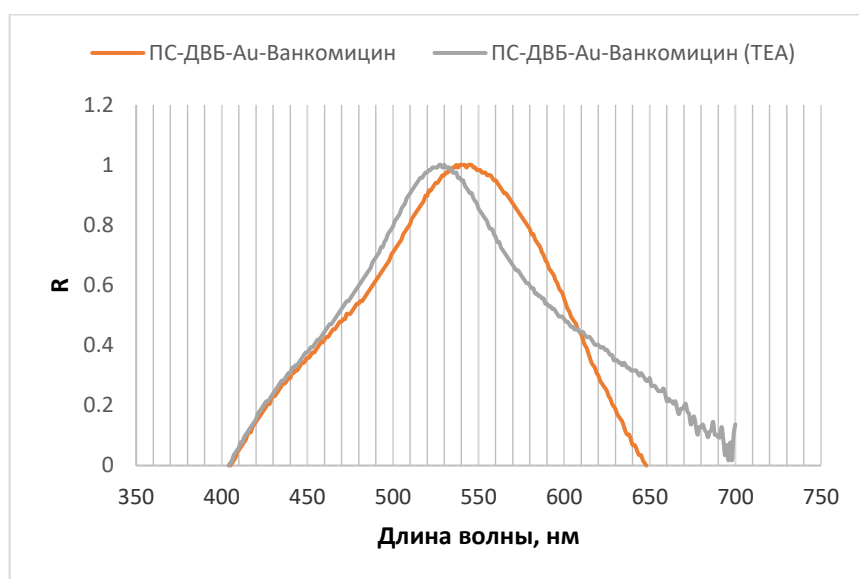


Рис. 75. Спектры диффузного отражения сорбентов ПС-ДВБ-Ау-Ванко и ПС-ДВБ-Ау-Ванко(ТЕА).

2.4 Исследование хроматографических свойств сорбентов ПС-ДВБ, модифицированного НЧЗ, стабилизированными эремомицином

По методике 12 были синтезированы сорбенты ПС-ДВБ(3)-Ау-Эремо с матрицей **ПС-ДВБ-3**, ПС-ДВБ(4)-Ау-Эремо и ПС-ДВБ(4)-Ау-Эремо(ТЕА) с матрицей **ПС-ДВБ-4**. Свойства полученных сорбентов охарактеризованы методом низкотемпературной адсорбции азота, количество золота на поверхности определяли методом АЭС, с помощью элементного анализа определяли количество азота и рассчитывали содержание антибиотика (табл. 26).

Таблица 26. Физико-химические характеристики сорбентов ПС-ДВБ-4, ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо и ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо(ТЕА), ПС-ДВБ(3)-Au-Эремо

Сорбент	S поверхности, м ² /г	V пор, см ³ /г	S микропор, м ² /г	Au, мг/г сорбента	Эремомицин, мкмоль/г
ПС-ДВБ-4	610	0.47	120		
ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо	500	0.39	130	13.9	37.5
ПС-ДВБ(4)-Au- Эремо(ТЕА)	570	0.46	100	16.8	16.07
ПС-ДВБ(3)-Au-Эремо	360	0.30	22	9	19.64

2.4.1 Хроматографическое исследование свойств неподвижных фаз ПС-ДВБ, модифицированного НЧЗ, стабилизированными эремомицином

Адсорбционные свойства и хроматографические характеристики микросфер ПС-ДВБ и ПС-ДВБ-Au-Эремо оценивали в режиме ВЭЖХ. Использовали стальные колонки размером 100 х 4.6 мм, заполненные суспензионным способом соответствующими адсорбентами. Гидрофильные и гидрофобные взаимодействия вносят значительный вклад в удерживание аналитов в обращённо-фазовой хроматографии и жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC). Для оценки гидрофобных свойств сорбентов обычно используют значения селективности по метиленовой группе $\alpha(\text{CH}_2)$ в соответствии с тестом Танака [128], разработанным для характеристики неподвижных фаз. В HILIC значение $\alpha(\text{CH})$ выражается как отношение удерживания факторы уридина и 5-метилуридина $k(\text{уридина})/k(5\text{-метилуридина})$. Так как 5-метилуридин имеет дополнительную метильную группу, которая способствует более сильным гидрофобным взаимодействиям, что приводит к более слабому удерживанию в условиях гидрофильной хроматографии. Точно так же гидрофильные взаимодействия оцениваются с использованием селективности по отношению к гидроксильной группе $\alpha(\text{OH})$ путем сравнения коэффициентов удерживания уридина и 2'-дезоксинуридина, в котором отсутствует одна гидроксильная группа и, следовательно, он менее гидрофилен, чем уридин. Чем выше коэффициент селективности $\alpha(\text{OH})$, тем более выражены гидрофильные свойства неподвижной фазы. Кислотно-основной характер неподвижной фазы также оказывает существенное влияние на разделение веществ, особенно содержащих ионные

группы и участвующих в электростатических взаимодействиях. Вещества теofilлин (Тр) и теобромин (Тб) имеют значения рКа 8.6 и 10 соответственно, поэтому теобромин сильнее удерживается кислыми адсорбентами, чем теofilлин.

Значения параметров селективности по метиленовой $\alpha(\text{CH}_2)$ и гидроксильной $\alpha(\text{OH})$ группам, отношение коэффициентов удерживания теofilлина и теобромина, а также коэффициенты удерживания для уридина и толуола приведены в табл. 27 для матрицы **ПС-ДВБ-4**, сорбентов ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо, ПС-ДВБ(3)-Au-Эремо, ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо(ТЕА). Значение параметра $\alpha(\text{OH})$ выше, чем параметра $\alpha(\text{CH}_2)$ для НФ ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо и ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо(ТЕА), что свидетельствует о том, что данные фазы проявляют гидрофильные свойства. $\alpha(\text{OH})$ слабо отличается от 1 для НФ ПС-ДВБ(3)-Au-Эремо, что говорит о слабых гидрофильных свойствах, однако $k(\text{уридина})$ для данной НФ немного выше, чем для немодифицированного ПС-ДВБ. Хроматограммы тестовых смесей приведены для ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо (рис. 76, рис. 77), в качестве неудерживаемого компонента использовали ацетон. Как видно из приведённых хроматограмм на данном сорбенте пики аналитов сильно размываются у основания, что говорит о небольшой эффективности полученной колонки. Отношение коэффициентов удерживания $k(\text{Тб})/k(\text{Тр})$ для ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо выше 1, что означает наличие выраженных кислотных свойств у НФ.

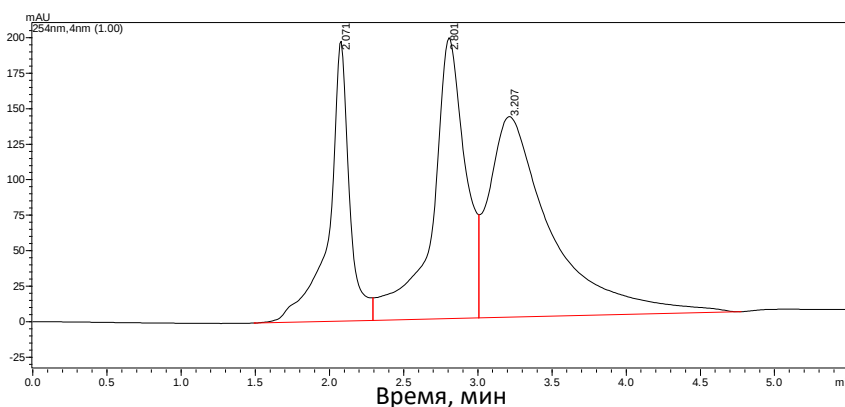


Рис. 76. Хроматограмма тестовой смеси на колонке с сорбентом ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо, порядок выхода аналитов: 1 – ацетон, 2 – 5-метилуридин, 3 – уридин.

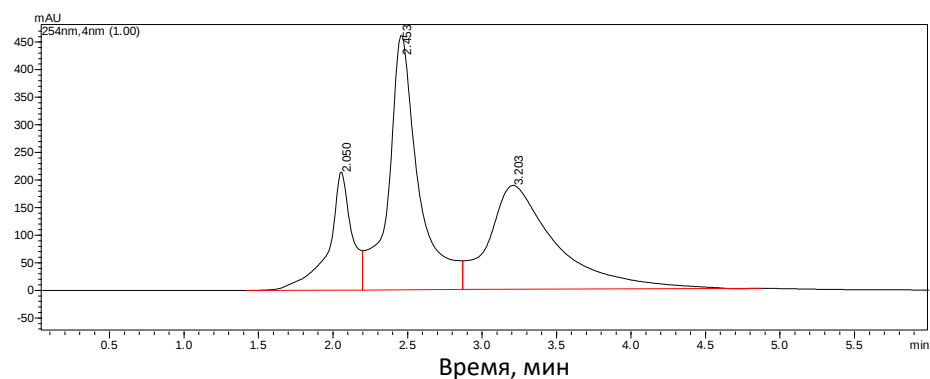


Рис. 77. Хроматограмма тестовой смеси на колонке с сорбентом ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо, порядок выхода аналитов: 1 – ацетон, 2 – 2-дезоксигуанидин, 3 – гуанидин.

Проводили сравнение коэффициентов удерживания гуанидина и толуола для полученных сорбентов (табл. 27). Гуанидин удерживается слабее на ПС-ДВБ, чем на модифицированных НФ, и выходит почти с неудерживаемым объёмом, так как ПС-ДВБ не вступает в гидрофильные взаимодействия. Гидрофобный толуол, удерживается значительно сильнее, чем гуанидин на всех сорбентах, что говорит о сильных гидрофобных взаимодействиях. На НФ ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо гуанидин удерживается дольше, чем на немодифицированном ПС-ДВБ, а удерживание толуола немного снижается, что говорит о значительном покрытии поверхность матрицы эремомицином, который содержит в молекуле большое количество полярных групп. На рис. 78 приведены хроматограммы тестовой смеси для ПС-ДВБ-4 и ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо, в качестве неудерживаемого компонента использовали ацетон. Как видно из рисунка пики гидрофильных веществ на модифицированном сорбенте уширяются по сравнению с матрицей ПС-ДВБ, что говорит о возникновении дополнительных взаимодействий.

Таблица 27. Факторы удерживания гуанидина и толуола, коэффициенты селективности по метиленовой и гидроксильной группам, отношение коэффициентов удерживания теофиллина и теобромину; ПФ: АСН:ацетат аммония (20 мМ) рН 4.7 (90:10 об. %), скорость потока 0.5 мл/мин

НФ	k(гуанидин)	k(толуол)	α (CH ₂)	α (ОН)	α (k (Tb)/k (Tp))
ПС-ДВБ-4	0.1	1.75	1.0	1.0	0.9
ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо	0.6	1.05	1.5	3.0	1.5
ПС-ДВБ(3)-Au-Эремо	0.3	1.87	1.34	1.03	1.04
ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо(ТЕА)	0.13	2.0	1.33	2.0	1.0

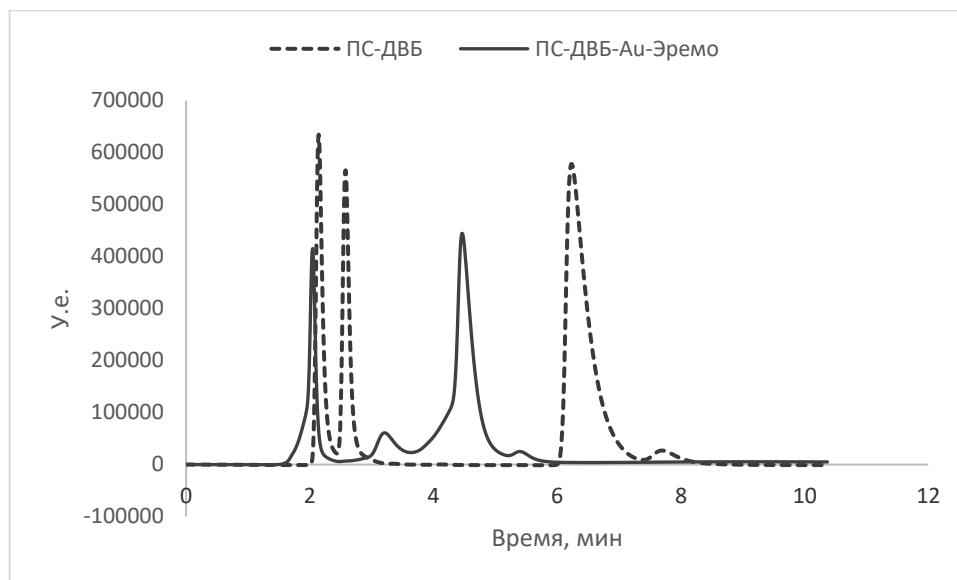


Рис. 78. Хроматограмма тестовой смеси на колонках с сорбентами ПС-ДВБ-4 и ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо, порядок выхода анализов одинаковый на обеих НФ: 1 – ацетон, 2 – уридин, 3 – толуол.

Влияние концентрации органического растворителя в элюенте было более тщательно исследовано для толуола и урацила, используемых в качестве тест-соединений на гидрофобные и гидрофильные взаимодействия, соответственно (рис. 79). В зависимости от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе НФ ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо может проявлять закономерности удерживания для тестовых соединений характерные как для варианта обращённо-фазовой, так и для режима гидрофильной хроматографии. Как показано на рис. 79, при концентрации ацетонитрила от 40 до 95 об. %, удерживание урацила увеличивалось с увеличением концентрации ацетонитрила, что согласуется с реализацией ННЛС. При концентрации ацетонитрила от 5 до 40 % удерживание урацила уменьшалось с увеличением концентрации ацетонитрила, что характерно для преобладания обращённо-фазового механизма удерживания. Удерживание толуола сильнее и уменьшается с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе для всего диапазона исследованных концентраций. Зависимость $\ln k$ толуола от содержания ацетонитрила имеет линейный характер, что указывает на чисто обращённо-фазовый механизм, связанный с гидрофобными и π - π взаимодействиями между ароматическими кольцами аналита и матрицей ПС-ДВБ.

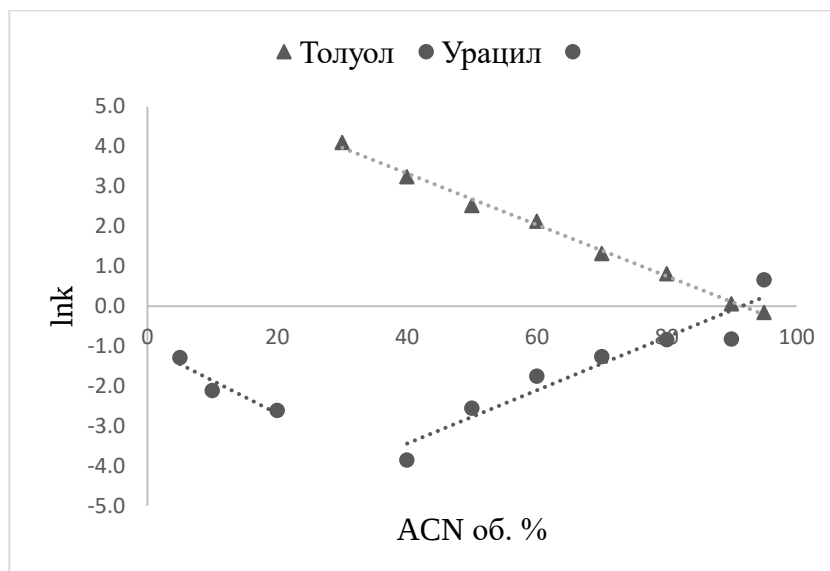


Рис. 79. Зависимость $\ln k$ для урацила и толуола от концентрации ацетонитрила в элюенте. Колонка: ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо. ПФ: ацетонитрил - 10 мМ ацетат аммония (рН 5.2), скорость потока: 1 мл/мин.

2.4.2 Исследование влияния состава подвижной фазы на удерживание аналитов на ПС-ДВБ-Au-Эремо

Проводили исследование удерживания различных групп веществ на неподвижной фазе ПС-ДВБ-Au-Эремо (с матрицей *ПС-ДВБ-3*) в зависимости от состава элюента. Были выбраны группы веществ: профены, β -блокаторы, производные аминокислот. В качестве подвижной фазы использовали смеси – АСН : буферный раствор (ТЕАА; фосфатный, аммиачный, ацетатный буферные растворы, ТРИС). Исследовано влияние содержания органического растворителя, рН, природы и концентрации буферных растворов на удерживание аналитов.

Профены

В работе исследовано удерживание профенов: индопрофен, кетопрофен, флурбипрофен, ибупрофен на синтезированном сорбенте. Эти вещества являются лекарственными препаратами, обладают противовоспалительными и жаропонижающим действием. Влияние содержания ацетонитрила в составе ПФ на времена удерживания соединений изучали на ПФ состава: ацетонитрил : АБ раствор (20 мМ, рН 4.0), ацетонитрил : АБ раствор (20 мМ, рН 6.2) и ацетонитрил/аммиачный буферный раствор (20 мМ рН 9.9). Содержание ацетонитрила варьировали от 5 до 95 об. %. На рис. 80 представлена зависимость коэффициентов удерживания профенов от содержания ацетонитрила в подвижной фазе.

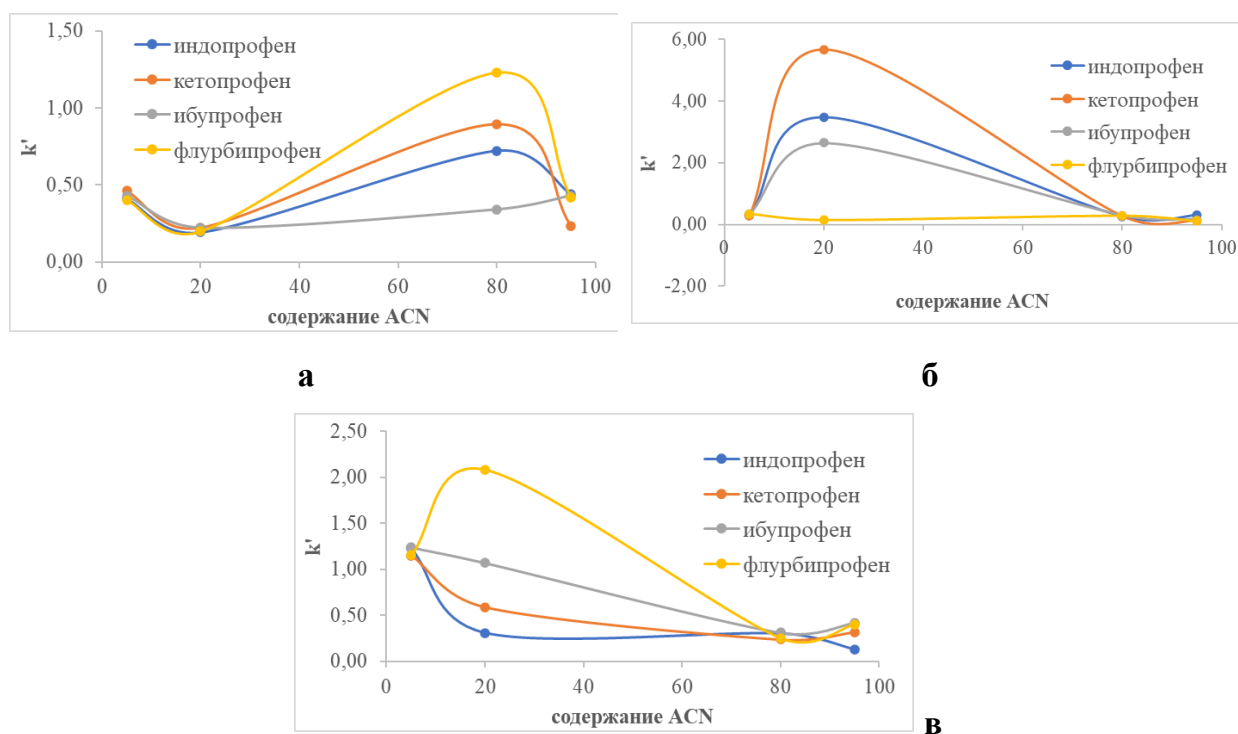


Рис. 80. Зависимость коэффициентов удерживания профенов от содержания ацетонитрила в ПФ: (а) ACN : AB (20 мМ, рН 4.0), (б) ACN : AB (20 мМ, рН 6.2), (в) ACN : аммиачный буферный раствор (20 мМ, рН 9.9).

Из рисунка видно, что при рН 4.0 профены лучше удерживаются при содержании ацетонитрила 80 об. %, а при рН 6.2 и 9.9 - при превалировании буферного раствора в составе подвижной фазы. При рН 9.9 коэффициент удерживания профенов падает с возрастанием органического компонента в ПФ. При 20 об. % содержании ацетонитрила удерживание профенов увеличивается в ряду: индопрофен < кетопрофен < ибупрофен < флурбипрофен, что соответствует параметрам $\log D$ (табл. 28), а именно, более гидрофобные вещества (с большим $\log D$) удерживаются сильнее. Это говорит о реализации обращённо-фазового механизма удерживания.

Таблица 28. рКа и параметр гидрофобности ($\log D$) при различных рН для профенов

Вещество	рКа	LogD				
		рН				
		4.0	6.2	7.0	9.1	9.9
Индопрофен	5.8	2.41	0.45	-0.21	-0.66	-0.67
Кетопрофен	4.0	3.25	1.34	0.64	0.09	0.08
Ибупрофен	5.2	3.79	2.48	1.71	0.42	0.33
Флурбипрофен	4.2	3.8	2.55	1.41	0.45	0.42

Однако, на граничных содержаниях органической добавки, зависимости не сохраняются. При рН 6.2 порядок выхода аналитов меняется, флурбипрофен удерживается меньше остальных профенов в смеси, что говорит об изменении механизма удерживания, также наблюдается наибольшее удерживание аналитов. Удержание веществ можно объяснить сочетанием ионообменного и классического адсорбционного механизмов. При низких значениях рН адсорбируются нейтральные молекулы, поскольку диссоциация кислот подавлена. С увеличением рН доля диссоциированных молекул, реагирующих по ионообменному механизму, возрастает, что приводит к увеличению вклада ионного компонента в общее удерживание k' . Однако с увеличением основности подвижной фазы доля протонированных аминогрупп эремомицина, которые являются центрами наиболее сильной адсорбции анионов, уменьшается, что приводит к снижению k' . Это снижение аналогично уменьшению параметров $\log D$ этих веществ, наблюдаемому выше рН 7. В связи с большим различием в коэффициентах емкости профенов, возможно разделение смеси профенов (табл. 29).

Таблица 29. Хроматографические параметры разделения смеси профенов

рН 6.2			рН 9.9		
вещество	k'	α	вещество	k'	α
Флурбипрофен	0.14	18.28	Индопрофен	0.31	1.92
Ибупрофен	2.65	1.31	Кетопрофен	0.59	1.82
Индопрофен	3.48	1.63	Ибупрофен	1.07	1.95
Кетопрофен	5.67	-	Флурбипрофен	2.08	-

Анализ полученных данных показал, что на удерживание профенов влияет природа буферного раствора, при рН 7.0 наибольшее удерживание на ТЕАА, наименьшее – на ФБ. С использованием буферных растворов ТЕАА и ТРИС аналиты удерживаются значительно лучше, по сравнению с АБ, ФБ и аммиачным буфером.

Из рис. 81 видно, что ибупрофен удерживается лучше при $\text{pH} > 7.0$. Его структура содержит 1 бензольное кольцо, остальные профены имеют 2 бензольных кольца в структуре. Это говорит о вкладе π - π взаимодействий в механизм удерживания.

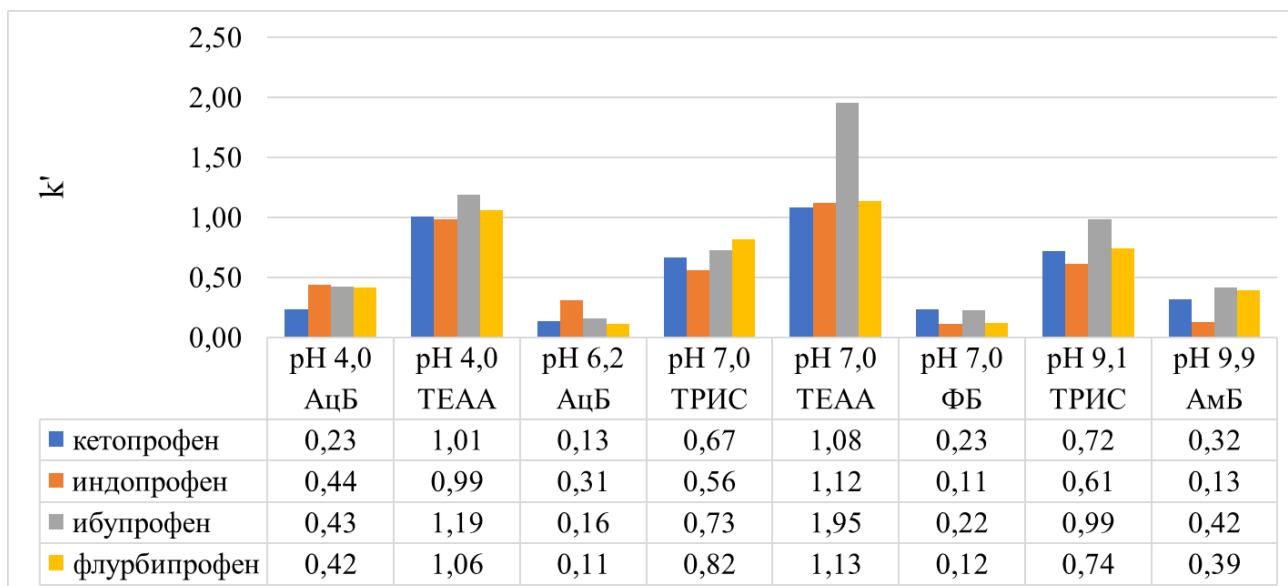


Рис. 81. Коэффициенты удерживания профенов при элюировании различными буферными растворами. ПФ: АСН : АБ (20 мМ, рН 4.0) – 95:5 об. %; АСН : ТЕАА (0.05%, рН 4.0) – 95:5 об. %; АСН : АБ (20 мМ, рН 6.2) – 95:5 об. %; АСН : ТРИС (10 мМ, рН 7.0) – 90:10 об. %; АСН : ТЕАА (0.05%, рН 7.0) – 95:5 об. %; АСН : ФБ (10 мМ, рН 7.0) – 90:10 об. %; АСН : ТРИС (10 мМ, рН 9.1) – 90:10 об. %; АСН : аммиачный буферный раствор (20 мМ, рН 9.9) – 95:5 об. %).

Таблица 30. Коэффициенты удерживания профенов при концентрациях 10 мМ и 20 мМ ацетатного буферного раствора, ПФ – АСН : АБ (рН 4.0) – 95:5 об. %

Вещество	k', 20 мМ	k', 10 мМ
Кетопрофен	0.23	0.54
Индопрофен	0.44	0.60
Ибупрофен	0.43	0.60
Флурбипрофен	0.42	0.62

Было изучено влияние концентрации буферного раствора на удерживание профенов. Выявлено, при увеличении концентрации буферного раствора увеличивалось удерживание веществ (ПФ: АСН : АБ (рН 4.0) – 95:5 об. %). В табл. 30 представлены коэффициенты удерживания.

Также количество бензольных колец влияет на энантиоразделение профенов. Удалось добиться частичного энантиоразделения кетопрофена, флурбипрофена и индопрофена (рис. 82), содержащих в своей структуре 2 ароматических кольца. Хроматографические параметры энантиоразделения профенов представлены в табл. 31.

Таблица 31. Хроматографические параметры разделения энантиомеров профенов

Подвижная фаза	Вещество	k'_1	k'_2	R_s	α
ACN : ТЕАА pH 7.0 (0.05%), 95:5 об. %	Кетопрофен	1.08	1.60	0.8	1.5
	Флурбипрофен	1.13	1.63	0.7	1.4
	Индопрофен	1.12	1.62	0.9	1.4
ACN : ФБ pH 7.0 (10 мМ), 90:10 об. %	Кетопрофен	0.23	0.55	0.7	2.4

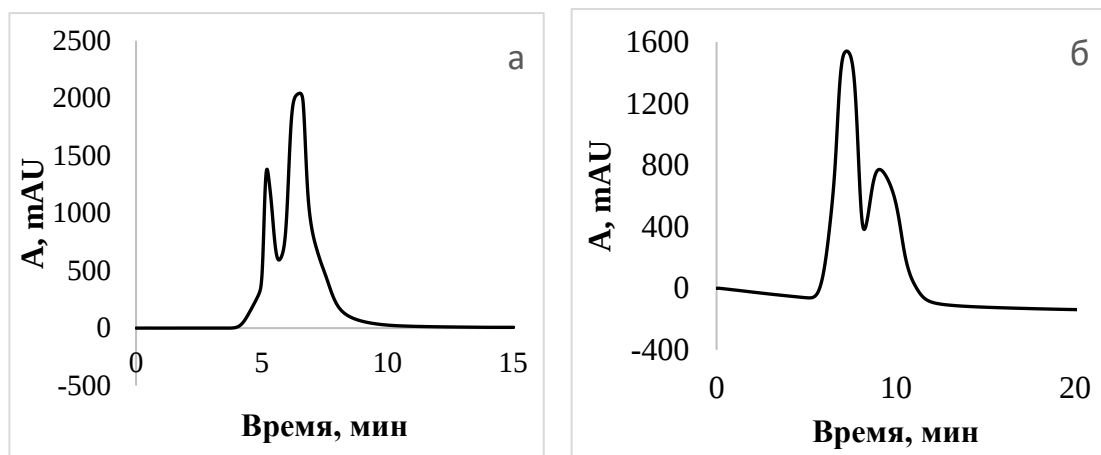


Рис. 82. Хроматограммы разделения энантиомеров кетопрофена. ПФ: (а) ACN : ТЕАА (0.05%, pH 7.0) – 95:5 об. %, скорость потока – 0.3 мл/мин; (б) ACN : ФБ (10 мМ, pH 7.0) – 90:10 об. %, скорость потока – 0.1 мл/мин; $\lambda = 254$ нм.

Энантиоселективность колонки достаточно хорошая (α), однако эффективность не позволила получить полного разделения энантиомеров.

Бета-блокаторы

В работе исследовано хроматографическое поведение β -блокаторов: атенолол, пиндолол, метопролол, алпренолол, лабеталол, окспренолол. Эти вещества блокируют действие адреналина и норадреналина на сердце. Влияние содержания ацетонитрила в составе ПФ на времена удерживания соединений проводили при элюировании ПФ в различных соотношениях: ацетонитрил : АБ раствор (20 мМ, pH 4.0), ацетонитрил : АБ раствор (20 мМ, pH 6.2) и ацетонитрил/аммиачный буферный раствор (20 мМ, pH 9.9). Содержание ацетонитрила варьировали от 5 до 95 об. %. На рис. 83 представлена зависимость коэффициентов удерживания β -блокаторов от содержания ацетонитрила в подвижной фазе.

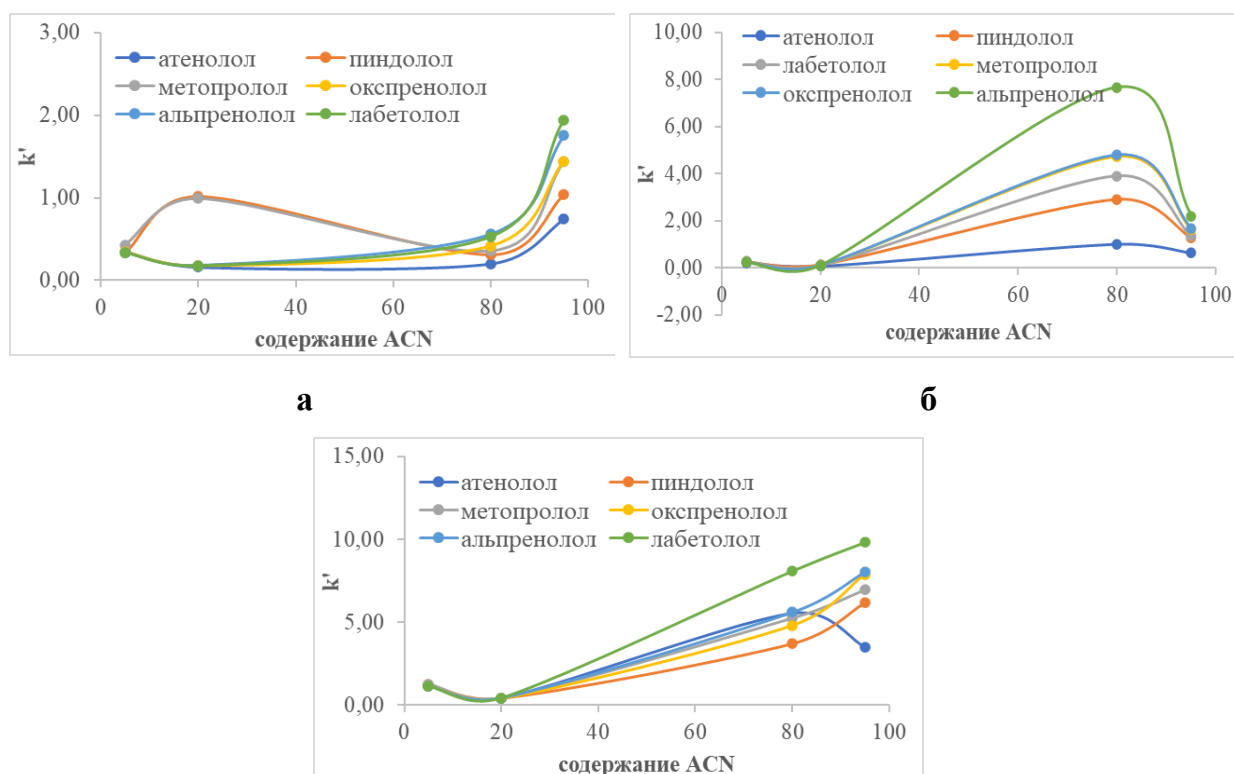


Рис. 83. Зависимость коэффициентов удерживания β -блокаторов от содержания ацетонитрила в ПФ: (а) ACN : АБ (20 мМ, pH 4.0), (б) ACN:АБ (20 мМ, pH 6.2), (в) ACN:аммиачный буферный раствор (20 мМ, pH 9.9).

Из графиков видно, что β -блокаторы лучше удерживаются при большем содержании ацетонитрила в подвижной фазе (80-95 об. %) при различных pH, что говорит о реализации механизма гидрофильной хроматографии.

Изучено влияние природы и pH буферного раствора в составе ПФ на удерживание β -блокаторов (рис. 84). Анализ полученных данных показал, что при $\text{pH} > 6.0$ β -блокаторы удерживаются лучше на всех буферных растворах, кроме ТРИС. Рассчитанные параметры $\log D$ этих веществ (табл. 32) резко повышаются для $\text{pH} > 6$. С использованием ТЕАА, аммиачного буферного раствора и ФБ аналиты удерживаются значительно лучше, по сравнению с ТРИС и АБ. Также выявлено, что природа буферного раствора сильно влияет на форму хроматографического пика.

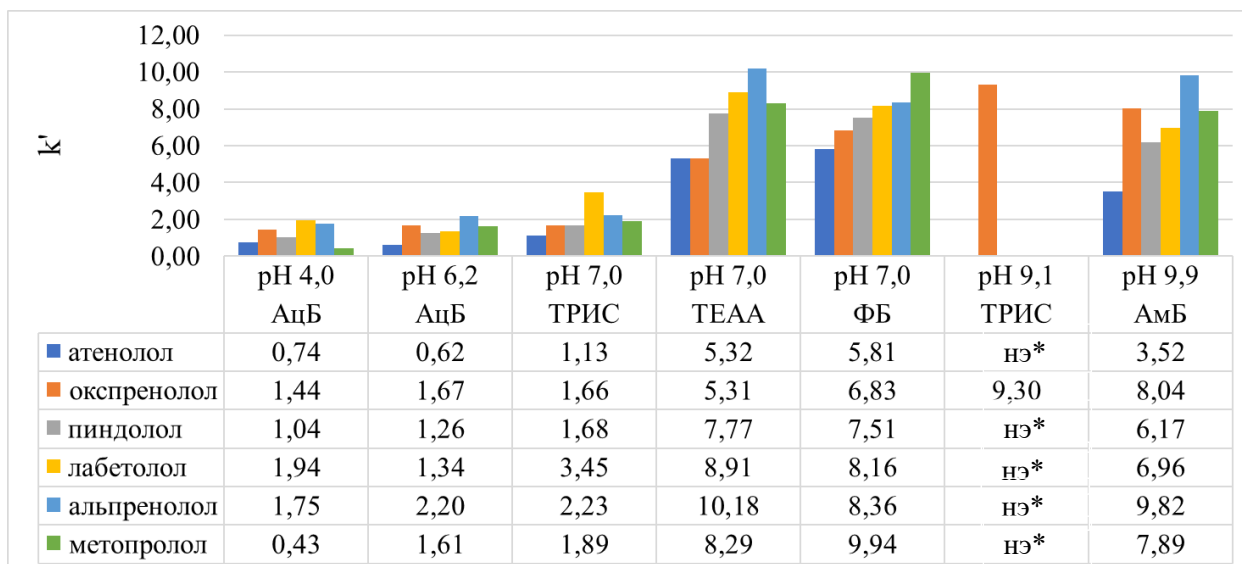


Рис. 84. Коэффициенты удерживания β -блокаторов при элюировании различными буферными растворами. ПФ: АСН : АБ (20 мМ, рН 4.0) – 95:5 об. %; АСН : АБ (20 мМ, рН 6.2) – 95:5 об. %; АСН : ТРИС (10 мМ, рН 7.0) – 90:10 об. %; АСН : ТЕАА (0.05%, рН 7.0) – 95:5 об. %; АСН : ФБ (10 мМ, рН 7.0) – 90:10 об. %; АСН : ТРИС (10 мМ, рН 9.1) – 90:10 об. %; АСН : аммиачный буферный раствор (20 мМ, рН 9.9) – 95:5 об. %.). нэ* – не элюируется.

Таблица 32. рКа и параметр гидрофобности (logD) при различных рН для β -блокаторов

Вещество	рКа	LogD				
		рН				
		4.0	6.2	7.0	9.1	9.9
Атенолол	9.6	-2.82	-2.57	-2.14	-0.25	0.23
Пиндолол	9.5	-1.55	-1.3	-0.87	1.01	1.47
Метопролол	9.6	-1.48	-1.23	-0.81	1.07	1.53
Окспренолол	9.6	-1.07	-0.83	-0.4	0.48	1.94
Алпренолол	9.5	-0.55	-0.3	0.13	1.72	2.48
Лабеталол	9.3	-0.26	-0.14	0.92	1.86	1.65

При рН 9.9 β -блокаторы удерживаются в ряду: атенолол<пиндолол<лабеталол<метопролол<окспренолол<алпренолол. В этом случае на удерживание в большей степени влияют гидрофобные взаимодействия. При понижении рН реализуется комплексный механизм удерживания, так как эремомицин содержит в своей структуре различные функциональные группы с рКа: 3.1 для карбоксильной группы, 6.9, 7.9 и 9.0 для аминогрупп, 9.7, 10.4, и 11.35 для

фенольных групп; изоэлектрическая точка – 7.2. Порядок выхода β -блокаторов изменяется. В удерживание вносят вклад образование водородных связей, ионный взаимодействия, также сохраняется влияние гидрофобных взаимодействий, так, например, атенолол, который имеет наименьший $\log D$, удерживается слабее остальных при всех pH.

Выявлено, при увеличении концентрации буферного раствора увеличивалось удерживание β -блокаторов (ПФ: ACN : AB (pH 4.0) – 95:5 об.%). В табл. 33 представлены коэффициенты удерживания.

Таблица 33. Коэффициенты удерживания β -блокаторов при концентрациях 10 мМ и 20 мМ ацетатного буферного раствора, ПФ – ACN : AB (pH 4.0) – 95:5 об.%

Вещество	k', 20 мМ	k', 10 мМ
Метопролол	0.43	0.09
Атенолол	0.74	0.08
Пиндолол	1.04	0.05
Оксспренолол	1.44	0.11
Алпренолол	1.75	0.12
Лабеталол	1.94	0.07

Было получено полное разделение смеси четырех различных бета-блокаторов, распространённых фармацевтических соединений. Разделение было достигнуто при элюировании сильнощелочной подвижной фазой при pH 10. Это возможно благодаря высокой гидролитической стабильности разработанной неподвижной фазы в сильнощелочных элюентах, которые необходимы для депротонирования аминогрупп в бета-блокаторах. Параметры разделения приведены в табл. 34.

Таблица 34. Коэффициент удерживания (k) и селективности (α) для смеси β -блокаторов. ПФ: ACN-20 мМ ацетат аммония pH 10 (80:20, об. %); скорость потока 0.5 мл/мин, 230 нм

	k	α
Атенолол	1.05	3.13
Пиндолол	3.27	
Оксспренолол	5.00	1.53
Алпренолол	7.24	

Удалось добиться энантиоразделения некоторых β -блокаторов (рис. 85) при элюировании ПФ: АСН : ТРИС рН 7.0 10 мМ (10:90 об. %). Хроматографические параметры представлены в табл. 35.

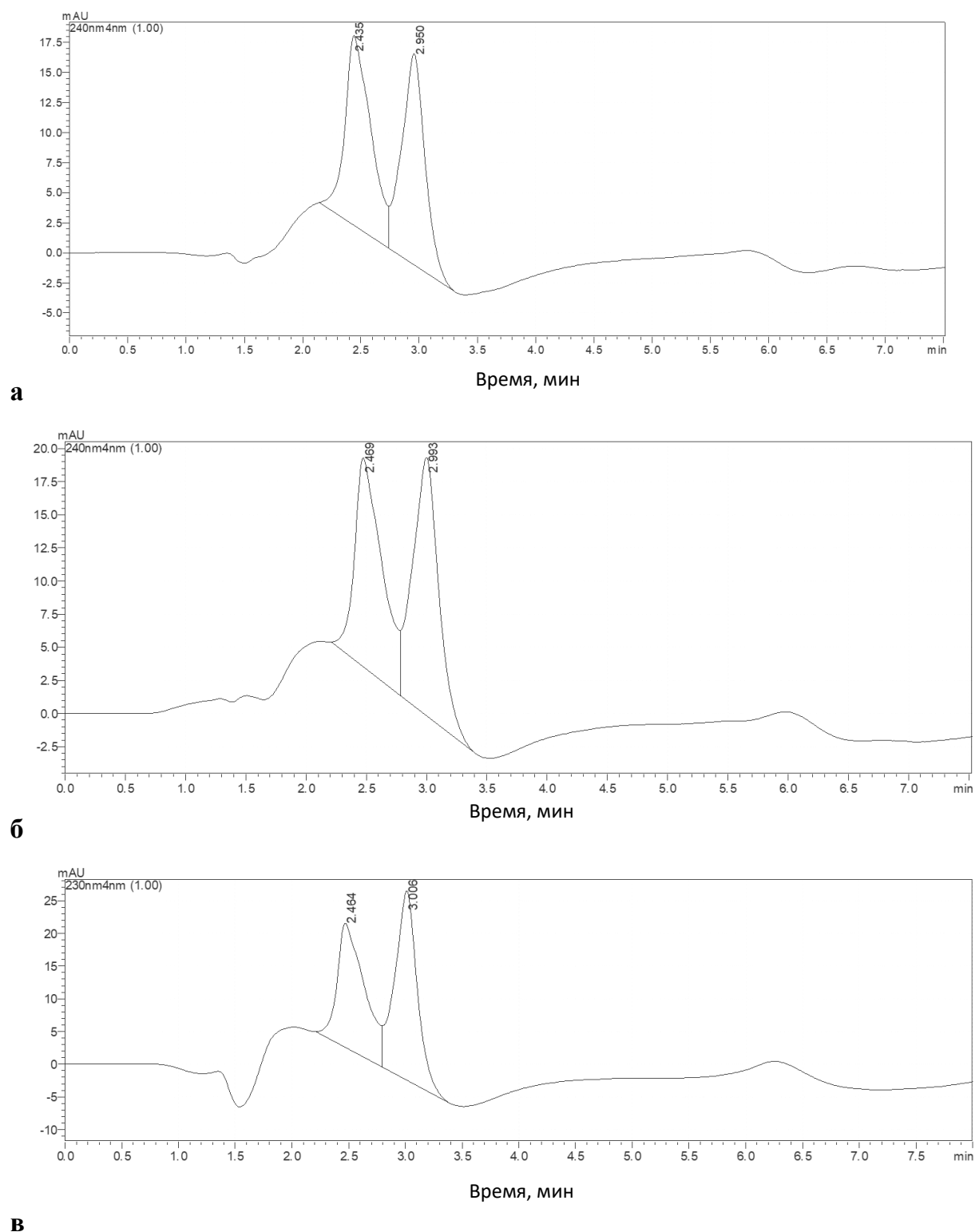


Рис. 85. Хроматографии разделения алпренолола (а), метопролола (б), окспренолола (в). ПФ: АСН : ТРИС (10 мМ, рН 7.0) – 10:90 об. %, скорость потока – 0.35 мл/мин; $\lambda = 240$ нм.

Таблица 35. Хроматографические параметры разделения β -блокаторов (ПФ: АСН : ТРИС (рН 7.0, 10 мМ), 10:90 об. %)

Вещество	k'(1)	k'(2)	Rs	α
Алпренолол	0.42	0.73	0.8	1.7
Окспренолол	0.45	0.75	0.8	1.7
Метопролол	0.44	0.76	0.7	1.7

Производные аминокислот

В работе исследовано удерживание производных аминокислот: БОК-аланин, БОК-валин, бензоилвалин, бензоилфенилаланин, бензоилаланин, КБЗ-триптофан, КБЗ-аспаргин, КБЗ-аланин, КБЗ-валин, КБЗ-лейцин. Влияние содержания ацетонитрила в составе ПФ на времена удерживания соединений проводили при элюировании ПФ в различных соотношениях: ацетонитрил : АБ раствор (20 мМ, рН 4.0), ацетонитрил : АБ раствор (20 мМ, рН 6.2) и ацетонитрил/аммиачный буферный раствор (20 мМ, рН 9.9). Содержание ацетонитрила варьировали от 5 до 95 об. %. На рис. 86 представлена зависимость коэффициентов удерживания производных аминокислот от содержания ацетонитрила в подвижной фазе.

Исследуемые анализы являются кислотами, а НФ, как было показано выше, обладает преимущественно основными свойствами, как следствие, мы видим низкое удерживание производных аминокислот на сорбенте (табл. 36). При рН 9.9, при котором все аминогруппы эремомицина не заряжены, наблюдается повышение коэффициента удерживания при высоком содержании водной фазы. Сильнее удерживаются бензоил-производные аминокислот, что может быть связано с содержанием в их структуре на один кислород меньше, чем у КБЗ- и БОК-производных. БОК производные аминокислот лучше удерживаются при большем содержании ацетонитрила при рН 4.0, на что может влиять отсутствие в их структуре бензольного кольца.

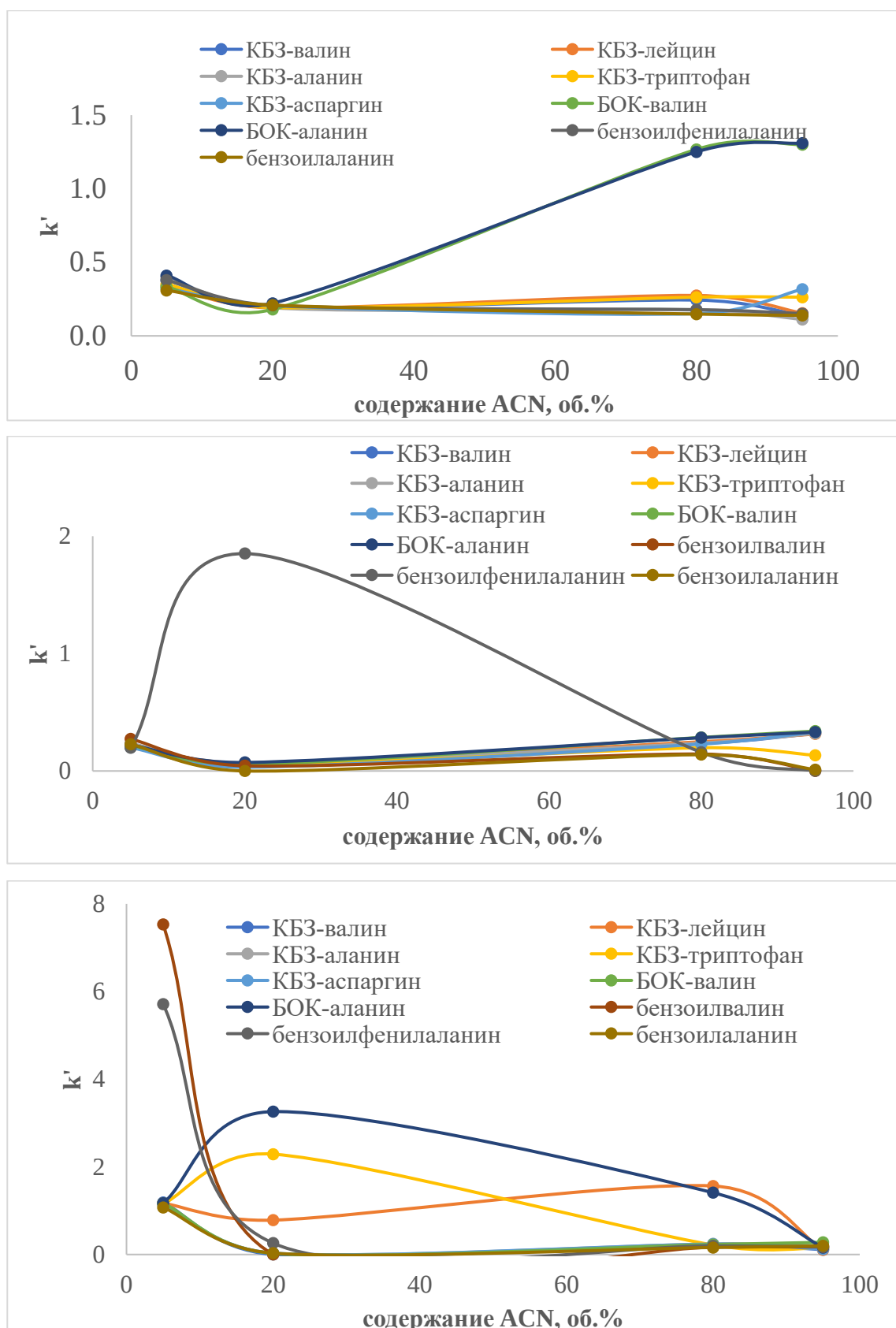


Рис. 86. Зависимость коэффициентов удерживания КБЗ-производных, БОК-производных и бензоил-производных аминокислот от содержания ацетонитрила в ПФ: (а) АСН : АБ (20 мМ рН 4.0), (б) АСН:АБ (20 мМ рН 6.2), (в) АСН : аммиачный буферный раствор (20 мМ рН 9.9).

Таблица 36. Коэффициенты удерживания производных аминокислот при элюировании различными буферными растворами

Вещество	ПФ 1	ПФ 2	ПФ 3	ПФ 4	ПФ 5	ПФ 6	ПФ 7	ПФ 8
КБЗ-валин	0.14	0.69	0.32	0.29	0.30	0.12	0.56	0.11
КБЗ-лейцин	0.15	0.71	0.32	0.33	0.31	0.11	0.56	0.11
КБЗ-аланин	0.11	0.52	0.32	0.23	0.33	0.11	0.53	0.19
КБЗ-триптофан	0.26	0.55	0.13	0.39	0.31	0.12	0.46	0.15
КБЗ-аспаргин	0.32	0.52	0.33	0.23	0.33	0.12	0.54	0.12
БОК-валин	1.30	1.01	0.34	0.17	0.07	0.20	0.61	0.28
БОК-аланин	1.31	0.68	0.33	0.22	0.31	0.21	0.51	0.16
Бензоил-валин	0.14	0.76	*н.у	0.22	0.19	0.13	0.53	0.17
Бензоил-фенилаланин	0.15	0.79	*н.у	0.28	*н.у	0.13	0.55	0.18
Бензоил-аланин	0.14	0.68	*н.у	0.21	0.07	0.15	0.49	0.20

*н.у. – не удерживается

ПФ:

1. АСН : АБ (20 мМ рН 4.0) – 95:5 об. %;
2. АСН : ТЕАА (0.05% рН 4.0) – 95:5 об. %;
3. АСН : АБ (20 мМ рН 6.2) – 95:5 об. %;
4. АСН : ТРИС (10 мМ рН 7.0) – 90:10 об. %;
5. АСН : ТЕАА (0.05% рН 7.0) – 95:5 об. %;
6. АСН : ФБ (10 мМ рН 7.0) – 90:10 об. %;
7. АСН : ТРИС (10 мМ рН 9.1) – 90:10 об. %;
8. АСН : аммиачный буферный раствор (20 мМ рН 9.9) – 95:5 об. %).

Показатель $\log D$, коррелирующий с гидрофобными свойствами молекул, для производных аминокислот больше единицы только для рН 4 (табл. 37), в тоже время при данном рН аналиты и ПФ одинаково заряжены, что ведет к малым коэффициентам удерживания.

При анализе данных было замечено, что для класса производных аминокислот удерживание веществ на сорбенте увеличивается по мере усложнения структуры аминокислоты и увеличения размера молекулы. Хотя все производные слабо удерживаются, производные БОК показали самое высокое удерживание в

идентичных условиях среди исследованных производных аминокислот (рис. 87). Это можно объяснить отсутствием бензольного кольца в их структуре, что препятствует образованию π - π комплексов между сорбатом и неподвижной фазой.

Таблица 37. Параметр гидрофобности ($\log D$) при различных pH для производных аминокислот

Вещество	LogD				
	pH				
	4.0	6.2	7.0	9.1	9.9
КБЗ-триптофан	-0.63	-0.53	-0.54	-0.95	-1.34
КБЗ-аспаргин	-0.4	-2.38	-3.02	-3.39	-3.39
КБЗ-аланин	1.14	-0.82	-1.48	-1.94	-1.94
КБЗ-валин	2.12	0.21	-0.49	-1.05	-1.06
КБЗ-лейцин	2.52	0.63	-0.08	-0.68	-0.69
БОК-аланин	0.61	-1.27	-1.98	-2.6	-2.61
БОК-валин	1.56	-0.24	-0.98	-1.71	-1.73
Бензоилаланин	0.59	-1.38	-2.03	-2.43	-2.43
Бензоилвалин	1.59	-0.34	-1.03	-1.47	-1.54
Бензоилфенилаланин	2.36	0.43	-0.26	-0.77	-0.78

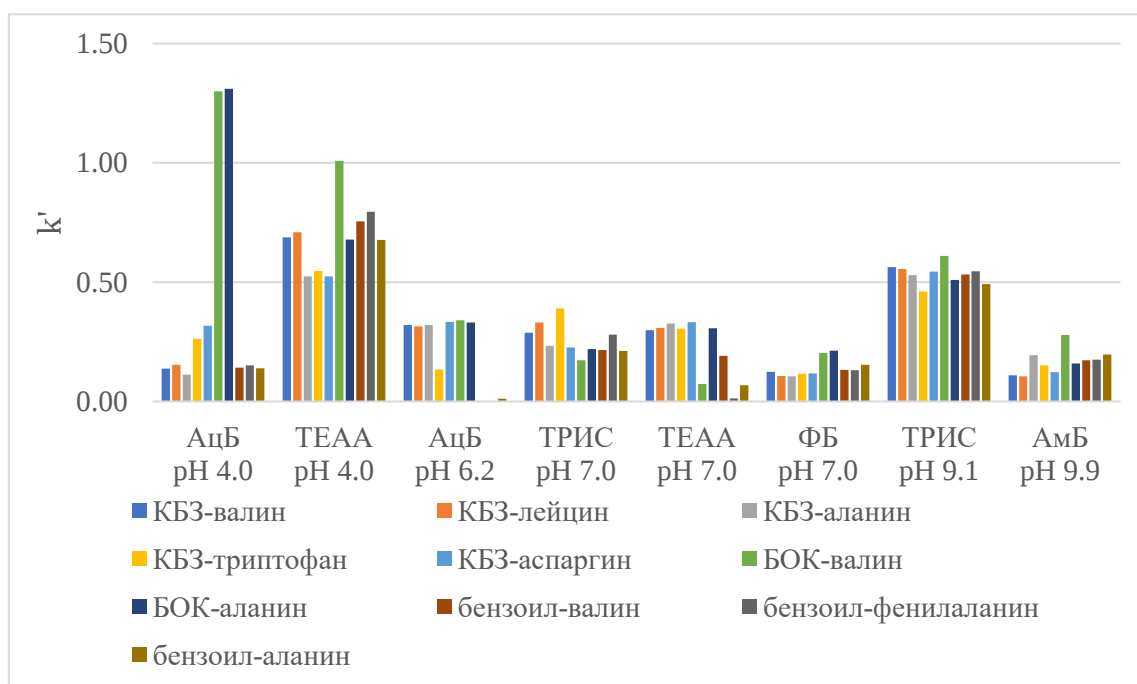


Рис. 87. Коэффициенты удерживания производных аминокислот при элюировании различными буферными растворами. ПФ: АСН : АБ (20 мМ, pH 4.0) – 95:5 об. %; АСН : ТЕАА (0.05%, pH 4.0) – 95:5 об. %; АСН : АБ (20 мМ, pH 6.2) – 95:5 об. %; АСН : ТРИС (10 мМ, pH 7.0) – 90:10 об. %; АСН : ТЕАА (0.05%, pH 7.0) – 95:5 об. %; АСН : ФБ (10 мМ, pH 7.0) – 90:10 об. %; АСН : ТРИС (10 мМ, pH 9.1) – 90:10 об. %; АСН : аммиачный буферный раствор (20 мМ, pH 9.9) – 95:5 об. %).

При рН близких к 7 природа буферных растворов не сильно влияет на удерживание аналитов. Выявлено, что производные аминокислот лучше удерживаются в элюентах, содержащих ТЕАА (рН 4.0) и ТРИС буферные растворы. БОК-производные сильно удерживаются в ацетатном буферном растворе (рН 4.0), они имеют углеводородный радикал в своей структуре. Природа буферного раствора не влияет существенно на удерживание (рН 7.0).

Установлено, что при понижении концентрации буферного раствора увеличивается удерживание КБЗ- и бензоил- производных аминокислот, для БОК- производных удерживание уменьшается.

Удалось добиться частичного разделения энантиомеров производных аминокислот (табл. 38). Хроматограммы представлены на рис. 88, рис. 89.

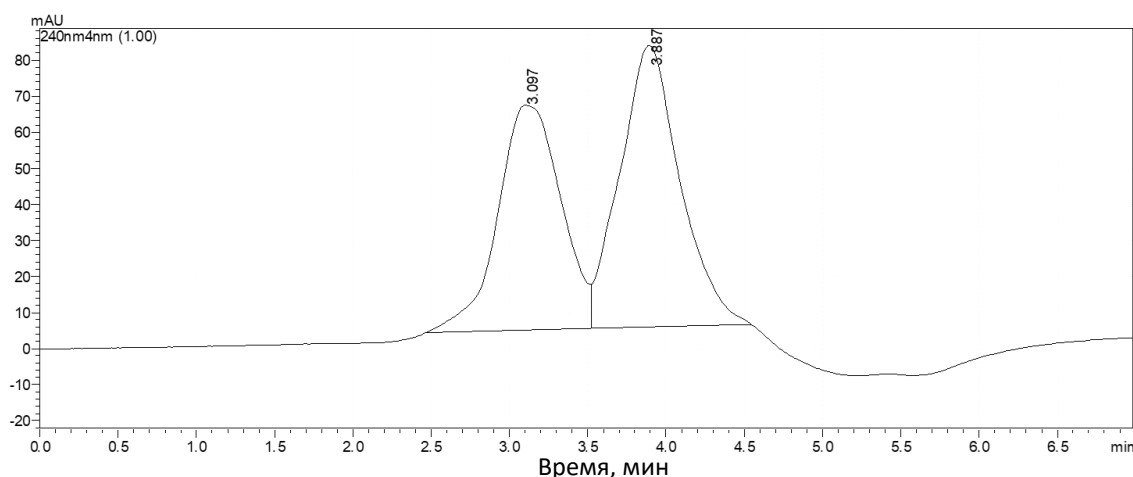


Рис. 88. Хроматограмма разделения КБЗ-валина. ПФ: АСН : ТРИС (10 мМ, рН 7.0) – 90:10 об. %, скорость потока – 0.3 мл/мин; $\lambda = 240$ нм.

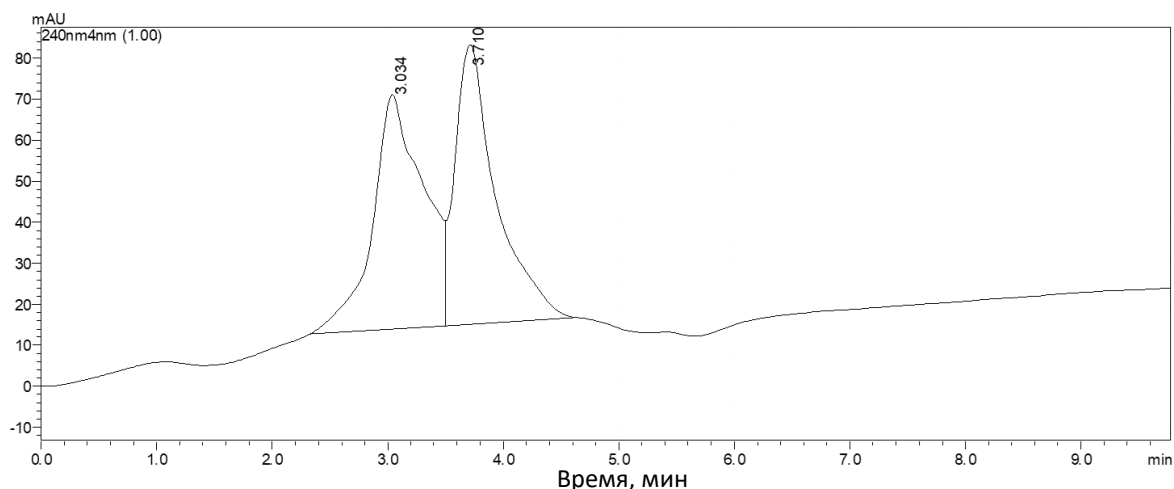


Рис. 89. Хроматограмма разделения КБЗ-аланина. ПФ: АСН : ТРИС (10 мМ, рН 7.0) – 90:10 об. %, скорость потока – 0.3 мл/мин; $\lambda = 240$ нм.

Таблица 38. Хроматографические параметры разделения производных аминокислот

Подвижная фаза	Вещество	k'(1)	k'(2)	Rs	α
ACN : ТЕАА (0.05%, рН 7.0) 95:5 об. %	Бензоил- валин	0.10	0.29	0.5	2.9
ACN : ТРИС (10 мМ, рН 7.0) 90:10 об. %	КБЗ-валин	0.58	0.98	0.8	1.7
	КБЗ-аланин	0.55	0.89	0.6	1.6
ACN : ТРИС (10 мМ, рН 9.1) 90:10 об. %	КБЗ-валин	0.47	0.55	0.4	1.2
	КБЗ-лейцин	0.46	0.54	0.4	1.2

ПС-ДВБ(4)-Аи-Эремо

Проводили хроматографические исследования на колонке с сорбентом ПС-ДВБ(4)-Аи-Эремо. Исследуемые аналиты при удерживании показывали схожие закономерности, что и на сорбенте ПС-ДВБ(3)-Аи-Эремо, однако эффективность колонки была существенно выше. Это может быть связано с более однородной полимерной матрицей в данном случае и большим покрытием НЧЗ. Как показал анализ литературных данных, для разделения профенов и β -блокаторов на колонках с эремомицином использовали полярно-органический вариант хроматографии. Было проведено исследование удерживания аналитов при элюировании 100% органическими ПФ (метанол, ацетонитрил) с добавками ТЕАА. Наблюдалась тенденция в росте удерживания профенов при большей добавке ТЕАА, что является следствием подавления ионообменных взаимодействий между карбоксильными группами профенов и аминогруппами эремомицина. Замена метанола на ацетонитрил приводила к невозможности разделения смеси профенов из-за малого удерживания (рис.90). Стоит отметить, что все профены элюируются в течении пяти минут, что в два раза меньше, чем для силикагелевой колонки с эремомицином при элюировании метанолом с 0.1% добавкой ТЕАА (111).

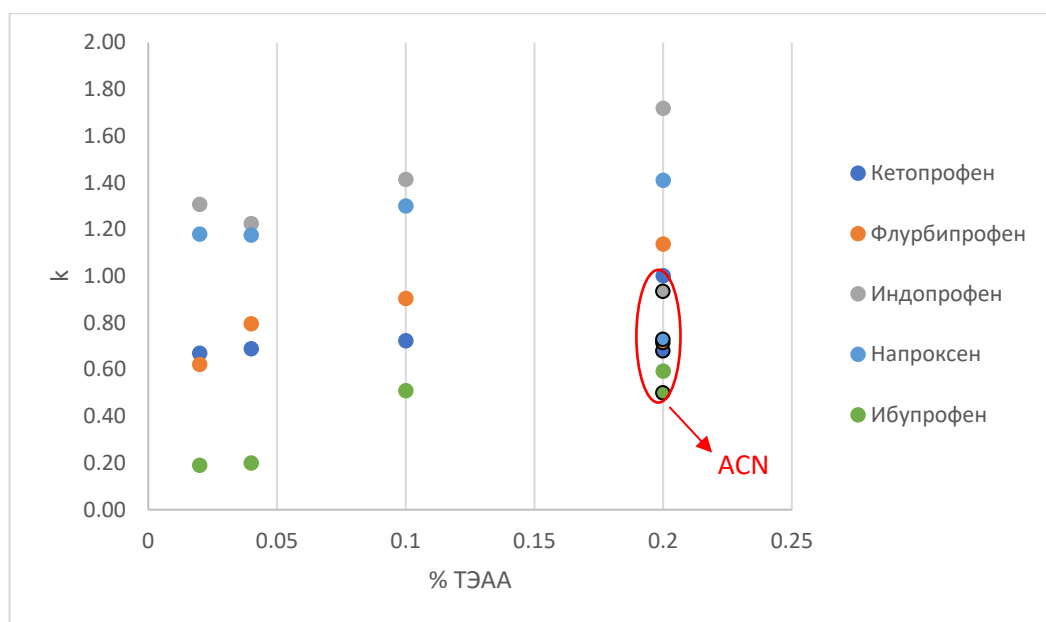


Рис. 90. Зависимость факторов удерживания профенов от добавки ТЭАА. ПФ 100% MeOH, 100% ACN.

Удерживание β -блокаторов падало с ростом добавки ТЭАА в ПФ (рис. 91). При замене метанола на апротонный ацетонитрил β -блокаторы удерживались заметно лучше, что говорит о вкладе водородных взаимодействий.

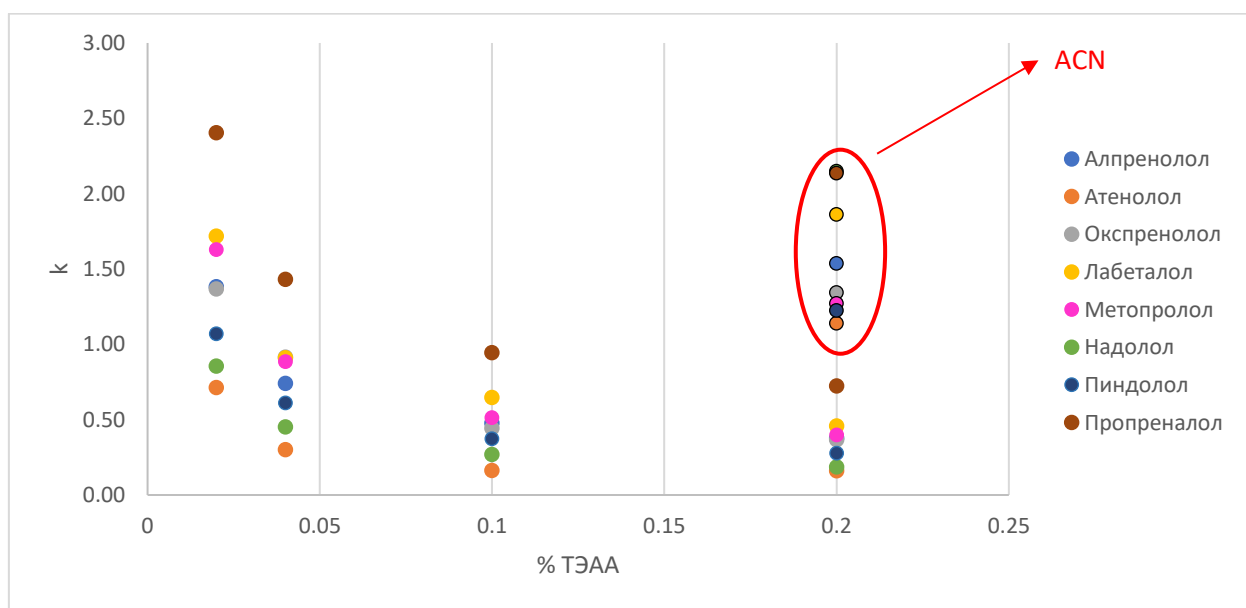


Рис. 91. Зависимость факторов удерживания β -блокаторов от добавки ТЭАА. ПФ 100% MeOH, 100% ACN.

Сорбентом ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо проявил энантиоселективность к различным группам аналитов (табл. 39, рис. 92). Показатели селективности и разрешения были выше, чем для сорбента с матрицей ПС-ДВБ(3).

Таблица 39. Хроматографические параметры (разрешение (R_s) и селективность) разделения энантиомеров аналитов, сорбент ПС-ДВБ(4)-Аи-Эремо

Аналит	Подвижная фаза	R_s	α
Аланин	MeOH : 0.1 М NH ₄ OAc, pH 5.6 (60:40, об. %)	1.9	2.8
Бензои-фенилаланин		0.9	1.4
КБЗ-аспарагин	MeOH : 0.1 М NH ₄ OAc, pH 5.6 (90:10, об. %)	1.2	5.1
Фенилаланин	ACN : MeOH : ТЭАА (84.9:15:0.1, об. %)	1.2	4.1
КБЗ-триптофан	ACN : ТЭАА (99.8:0.2, об. %)	4.4	12
БОК-аланин	MeOH : ТЭАА (99.8:0.2, об. %)	0.7	3.0
БОК-валин		0.8	3.4
Пиндолол	MeOH : ТЭАА (99.98:0.02, об. %)	1.0	1.5
Надолол	MeOH : NH ₄ OAc (0.1 М, pH 5.6) (98:2, об. %)	0.9	1.4

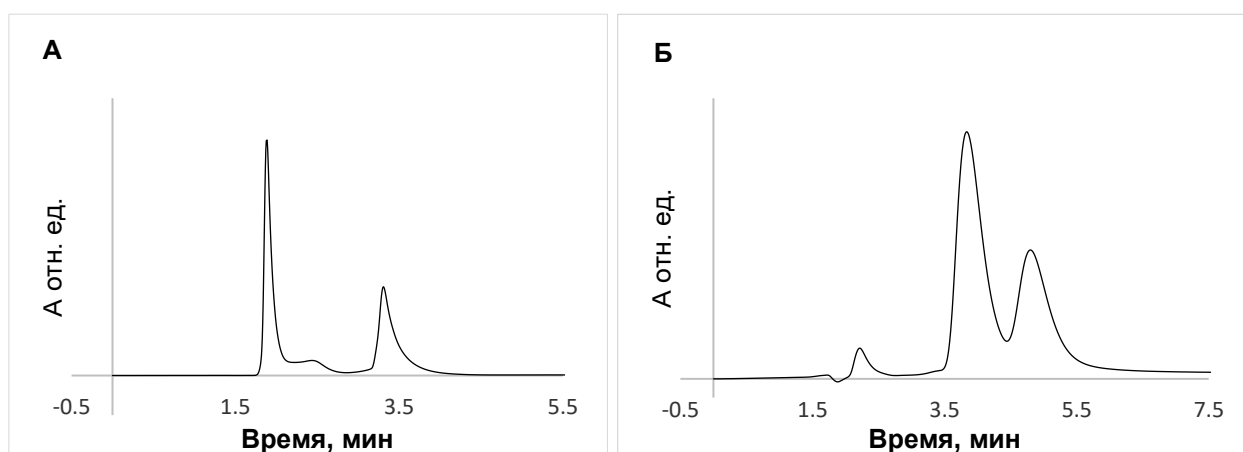


Рис. 92. Хроматограммы разделения энантиомеров КБЗ-триптофана (270 нм) (А) и пиндолола (230 нм) (Б). Условия разделения представлены в табл. 39.

2.5 Разделение энантиомеров кетопрофена в препарате «Кетонал»

На основании проведенных исследований, которые показали возможность частичного разделения энантиомеров профенов с использованием элюентов, содержащих ФБ и ТЕАА (pH 7.0), был проведен анализ коммерческого препаратом «Кетонал» в тех же условиях. Фармацевтический препарат предназначен для терапии болезненных и воспалительных процессов различного происхождения. Выпускается в капсулах (производитель: Novartis, Словения).

Состав 1 капсулы:

Действующее вещество: кетопрофен - 50.0 мг; *вспомогательные вещества:* лактоза - 186.1 мг; магния стеарат - 2,4 мг; кремния диоксид коллоидный - 1.5 мг;

Состав оболочки капсулы: титана диоксид - 0,94 мг; краситель синий патентованный - 0,17 мг; желатин до 47 мг.

Пробоподготовку препарата осуществляли по методике 14. Изучали возможности разделения энантиомеров кетопрофена методов ВЭЖХ на колонке с синтезированным сорбентом ПС-ДВБ-Аи-Эремо. При использовании ПФ АСН : ФБ (10 мМ, рН 7.0) – 90:10 об. %, которая продемонстрировала разделение энантиомеров на стандартных соединениях, не удалось разделить энантиомеры кетопрофена. Это может быть связано с сильным размытием пиков за счёт матричного эффекта. Однако при элюировании ПФ АСН : ТЕАА (0.05 %, рН 7.0) – 95:5 об. % удалось частично разделить энантиомеры кетопрофена (табл. 40). Как видно из приведённых данных селективность разделения энантиомеров кетопрофена препарата «Кетонал» хорошая, однако разрешение пиков энантиомеров недостаточно. Это связано с уширением пиков в связи с матричным эффектом и небольшой эффективности используемой колонки.

Таблица 40. Хроматографические параметры разделения энантиомеров кетопрофена препарат «Кетонал». ПФ – ТЕАА (0.05%, рН 7.0)–АСН (95:5 об. %), скорость потока 0.1 мл/мин; $\lambda = 254$ нм

	k'(1)	k'(2)	α	Rs
Вещество кетопрофен препарата «Кетонал»	0.65	1.15	1.76	0.7

2.6 Определение энантиомерного состава напроксена

Актуальным подходом в лечении агрессивных видов рака является сочетание химиотерапии с противовоспалительным воздействием. В последние годы уделяется большое внимание дизайну таких лекарственных препаратов на основе платины с нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) [132]. Пролекарство платины (IV) с НПВП в качестве аксиальных лиганд предназначено для эффективного проникновения в опухолевые клетки за счет высокой липофильности. Высвобождение внутриклеточно НПВП и цитотоксического метаболита способствует снижению побочных эффектов и повышению эффективности химиотерапии платины.

Напроксен является одним из нестероидных противовоспалительных препаратов. На кафедре органической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова была получена смесь энантиомеров напроксена из стандарта S-изомера напроксена. Данное соединение в дальнейшем используется для синтеза биологически активного соединения с платиной. В процессе синтеза протолекарства с Pt(IV) в зависимости от энантиомерного состава напроксена аксиальные лиганды могут быть по-разному ориентированы. Для сопоставления ориентации в конечном продукте необходимо знать энантиомерный состав исходного реагента напроксена. На колонке с сорбентом ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо(ТЭА) было проведено разделение энантиомеров напроксена на ПФ состава MeOH-H₂O 90-10 об. % (рис. 93). Проводили сравнение хроматограмм, полученных для рацемической смеси стандарта и для синтезированного напроксена, для оценки соотношения R и S-изомеров. Для подтверждения энантиоразделения получали спектры двух хроматографических пиков (рис. 93). По форме спектры идентичны, что свидетельствует об их одинаковом составе. Также проводили анализ напроксена в тех же хроматографических условиях на колонке, заполненной немодифицированным ПС-ДВБ(4) (рис. 94). Соединение выходило одним хроматографическим пиком и имела идентичный с пиками энантиомеров спектр, что подтверждает приобретение способности к хиральному разделению неподвижной фазы после модифицирование ПС-ДВБ НЧЗ с эремомицином. В синтезированной в лаборатории смеси напроксена соотношение изомеров составило R 70%, S 30%.

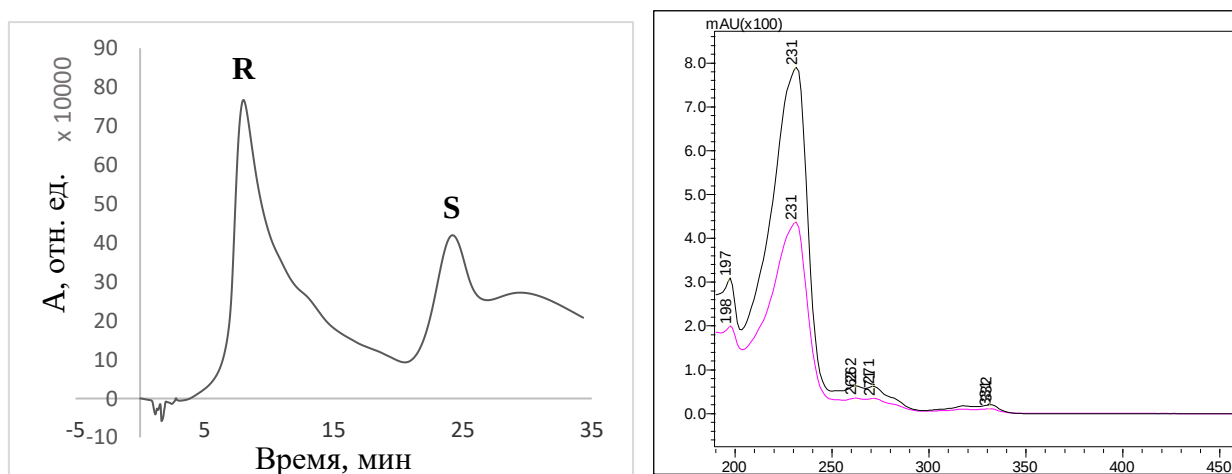


Рис. 93. Хроматограмма и спектры энантиомеров напроксена. Сорбент: ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо(ТЭА), ПФ: MeOH-H₂O 90-10 об. %, скорость потока 0.5 мл/мин, 230 нм.

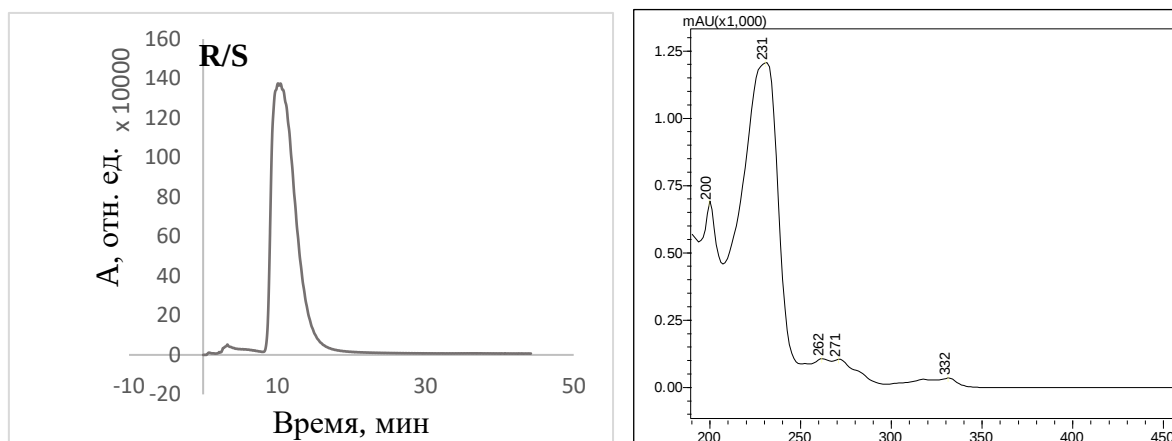


Рис. 94. Хроматограмма и спектры напроксена. Сорбент: ПС-ДВБ(4), ПФ: МеОН-Н₂O 90-10 об. %, скорость потока 0.5 мл/мин, 230 нм.

2.7 Сополимер стирола и дивинилбензола, модифицированный эремомицином без НЧЗ⁴

Для сравнения было проведено исследование хроматографических свойств сорбента полистирол-дивинилбензола с ковалентно закреплённым эремомицином [133]. Данный сорбент обладает основными свойствами в отличии от сорбентов с НЧЗ (табл. 41). Показатель α (ОН) для него больше показателя α (СН₂), что говорит о гидрофильных свойствах сорбента, однако он ниже, чем для сорбента с эремомицином, закреплённом с помощью НЧЗ.

Таблица 41. Факторы удерживания уридина и толуола, коэффициенты селективности по метиленовой и гидроксильной группам, отношение коэффициентов удерживания теофиллина и теобромина. Подвижная фаза: АСН : ацетат аммония (20 мМ) рН 4.7 (90:10 об. %)

НФ	к(уридин)	к(толуол)	α (СН ₂)	α (ОН)	α (к (Тб)/к (Тр))
ПС-ДВБ-4	0.1	1.75	1.0	1.0	0.9
ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо	0.6	1.05	1.5	3.0	1.5
ПС-ДВБ-Эремо	0.69	1.36	1.03	1.49	0.78

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:

1. Чикурова, Н. Ю., Просунцова, Д. С., Ставрианиди, А. Н., Староверов, С. М., Ананьева, И. А., Смоленков, А. Д., and Чернобровкина, А. В. Новые многофункциональные сорбенты для ВЭЖХ на основе различных матриц, модифицированных эремомицином. // Журнал аналитической химии. — 2023. — Т. 78, № 5. — С. 1–14. ИФ (Web of Science) – 1.237. 10%.

Зависимость удерживания аналитов от добавки ацетонитрила в ПФ характерна для гидрофильной неподвижной фазы (рис. 95). Толуол удерживается по обращённо-фазовому механизму и имеет достаточно высокие коэффициенты удерживания, что говорит о гидрофобных свойствах неподвижной фазы.

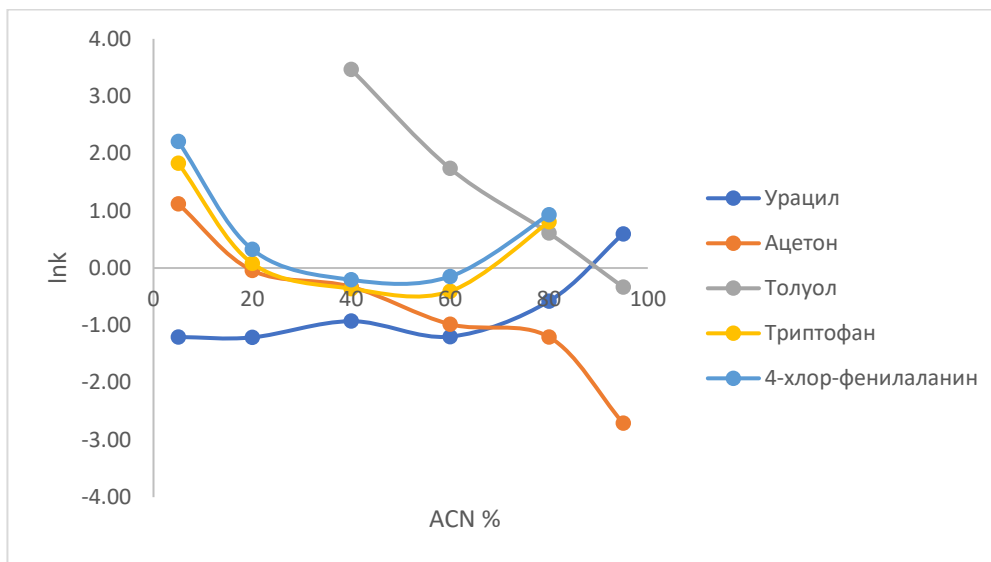


Рис. 95. Зависимость $\ln k$ аналитов от концентрации ацетонитрила в элюенте. Колонка: ПС-ДВБ-Эремо. ПФ: ацетонитрил - 10 мМ ацетат аммония (рН 5.2), скорость потока: 1 мл/мин.

Из табл. 42 видно, что колонка с сорбентом с ковалентно пришитым эремомицином уступает по числу теоретических тарелок на метр колонке с сорбентом с НЧЗ. Модифицирование ПС-ДВБ эремомицином с помощью НЧЗ позволяет сохранить лучшую эффективность колонки, это может быть связано с меньшими потерями в функциональной площади поверхности.

Таблица 42. Число теоретических тарелок на метр по ацетону и толуолу для сорбентов ПС-ДВБ, ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо, ПС-ДВБ-Эремо

Неподвижная фаза	Ацетон	Толуол
ПС-ДВБ	14990	1230
ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо	1830	810
ПС-ДВБ-Эремо	690	420

Удерживание аминокислот увеличивается с увеличением содержания органической добавки в ПФ MeOH-H₂O и становится отличным от мертвого времени начиная с 80% метанола. Профены не элюируются при содержании в ПФ воды. Вероятно, из-за наличия сильных ионообменных взаимодействий с

заряженными группами эремомицина. β -блокаторы при ПФ ACN 80%-H₂O 20% имеют оптимальное время удерживания, выходя в течении 5-20 минут.

На полистирол-дивинилбензольном сорбенте с эремомицином исследовали удерживание оптически активных веществ, триптофана, 4-хлорфенилаланина, кетопрофена, при элюировании подвижной фазой состава ацетонитрил - 10 мМ буферный раствор ацетата аммония с рН 5.2. Варьировали содержание органической добавки в ПФ от 95% до 5%. Кетопрофен сильно удерживался при всех соотношениях ПФ. Сорбент проявил энантиоселективность к 4-хлорфенилаланину. Наилучшее разделение энантиомеров наблюдалось при содержании ацетонитрила 60 %, $R_s = 1.8$, $\alpha = 3.5$ (рис. 96). Дальнейшее исследование удерживания аминокислот позволило разделить также энантиомеры фенилаланина ($\alpha = 1.3$, $R_s = 0.7$), валина ($\alpha = 2.2$, $R_s = 1.13$), лейцина ($\alpha = 2.5$, $R_s = 1.3$), КБЗ-аспарагина ($\alpha = 1.7$, $R_s = 1.3$) при элюировании подвижной фазой метанол : 0.05% буферный раствор ацетата триэтиламмония рН=4 (80:20 об.%).

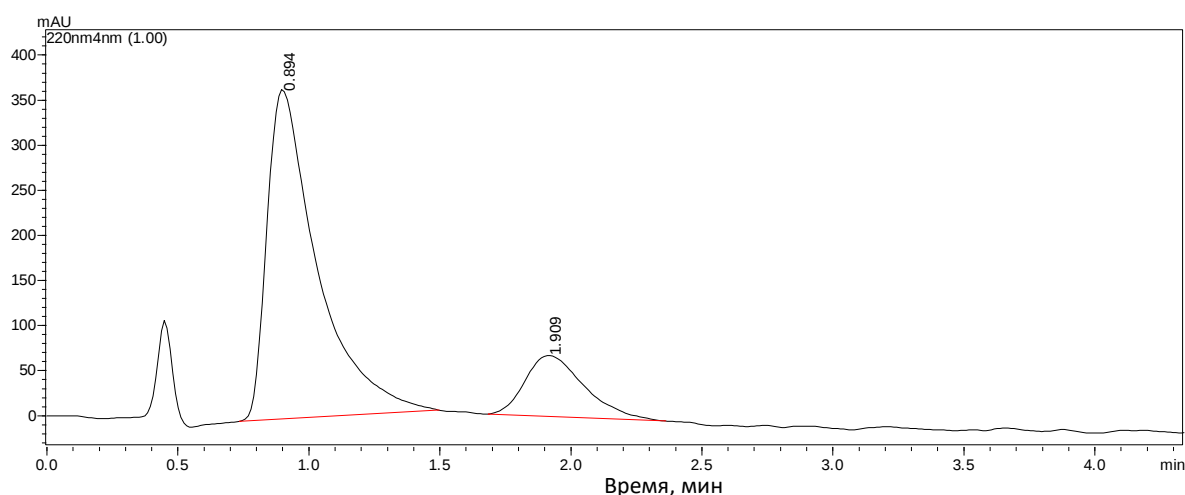


Рис. 96. Хроматограмма разделения энантиомеров 4-хлор-фенилаланина.

Ковалентное закрепление эремомицина на ПС-ДВБ с введением спейсера для уменьшения влияния матрицы по сравнению с использованием НЧЗ требует многостадийного сложного синтеза. Сорбент ПС-ДВБ(4)-Au-Эремо проявил более гидрофильные свойства, чем ПС-ДВБ-Эремо, что расширяет возможности его применения в варианте гидрофильной хроматографии, а также его эффективность вдвое выше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

В работе представлен новый подход к синтезу полимерных наногибридных сорбентов с наночастицами золота и впервые описано применение таких сорбентов в высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Предложен простой способ функционализации полимерных матриц ПС-ДВБ наночастицами золота. Получены новые сорбенты на основе ПС-ДВБ с НЧЗ, стабилизированными аминокислотами. В одном из вариантов синтеза использован спейсер для удаления аминокислоты от поверхности матрицы. Полученные наногибридные сорбенты обладают физико-химическими характеристиками, подходящими для неподвижных фаз в ВЭЖХ, а использование НЧЗ позволяет увеличить их функциональную поверхность. В работе установлены закономерности удерживания на синтезированных неподвижных фазах органических веществ различной природы. Полученные сорбенты подходят для решения разных задач: показана возможность разделения смесей нитроанилинов, аминопиридинов, профенов, β -блокаторов в ОФ и ПО режимах хроматографии. Синтезированные сорбенты проявили энантиоселективность, позволяя экспрессно проводить разделение энантиомеров профенов. Главными преимуществами предложенных сорбентов являются простота синтеза и возможность изменения свойств за счет использования различных лигандов для стабилизации наночастиц. По сравнению с ранее описанными аналогичными сорбентами с НЧЗ на основе силикагелевой матрицы наблюдается большая адсорбция наночастиц, а гидрофобный вклад ПС-ДВБ позволяет повысить удерживание неполярных соединений, что расширяет круг возможных аналитов. Использование полимерной матрицы также даёт возможность работать в широком диапазоне значений pH.

Полученные новым способом НЧЗ, стабилизированные макроциклическими антибиотиками эремомицином и ванкомицином, продемонстрировали устойчивость к агрегации на протяжении длительного времени. Успешно проведена сорбция НЧЗ, стабилизированных эремомицином, на полистирол-дивинилбензольную матрицу с получением наногибридного полимерного хроматографического сорбента. Исследования физико-химическими методами показали, что микрочастицы

сорбента сохраняют исходную сферическую форму после модифицирования, а эффективность иммобилизации антибиотика сопоставима с ковалентным закреплением. Сорбент ПС-ДВБ с НЧЗ, стабилизированными эремомицином, продемонстрировал гидрофильные свойства, что делает возможным использовать его в вариантах обращённо-фазовой и гидрофильной хроматографии. Проявленная энантиоселективность к профенам, β -блокаторам, аминокислотам и их производным позволяет говорить об универсальности полученной хиральной неподвижной фазы, что является преимуществом данного сорбента.

Предложенный подход демонстрирует перспективность применения полимерных матриц с наночастицами золота для получения новых хроматографических сорбентов.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный способ синтеза наночастиц золота, стабилизированных макроциклическими антибиотиками, путём восстановления золотохлористоводородной кислоты, в котором антибиотик одновременно выступает в качестве восстановителя и стабилизатора, позволяет получить устойчивые НЧЗ. С помощью просвечивающей электронной микроскопии было показано, что НЧЗ имеют размер 15-20 нм.
2. Разработаны способы синтеза новых сорбентов для ВЭЖХ, полученных путём адсорбции наночастиц золота на поверхность сополимера стирола и дивинилбензола с разными размерами частиц и пор исходной матрицы с использованием в качестве модификаторов наночастиц золота липоевой кислоты, конъюгата липоевой кислоты и лизина, макроциклических антибиотиков эремомицина и ванкомицина.
3. Синтезированные сорбенты охарактеризованы методами ИК-спектроскопии, атомно-эмиссионной спектроскопии, элементного анализа, сканирующей электронной микроскопии, спектроскопии диффузного отражения, низкотемпературной адсорбции азота, что позволило подтвердить модифицирование исходного ПС-ДВБ, показать увеличение площади функциональной поверхности сорбентов с НЧЗ, отметить, что большее покрытие наночастицами золота осуществляется для матриц с большим диаметром пор и меньшим размером частиц; продемонстрировать, что частицы получаемых сорбентов имеют размер 3-6 мкм, сферическую форму, площадь функциональной поверхности 300-600 м²/г, что делает их подходящим материалом для хроматографических колонок в ВЭЖХ.
4. Проведено исследование хроматографических свойств сорбентов на основе полистирол-дивинилбензола и наночастиц золота, модифицированных L-цистеином, липоевой кислотой, липоевой кислотой с лизином, эремомицином, в том числе с помощью теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз. Установлено, что для всех синтезированных сорбентов значимый вклад во взаимодействия с аналитами даёт гидрофобная

полимерная матрица, однако отмечена гидрофилизация сорбентов после модифицирования.

5. Установлены закономерности удерживания нитроанилинов, аминопиридинов, профенов, β -блокаторов, производных аминокислот на синтезированных сорбентах полистирол-дивинилбензола с наночастицами золота, модифицированными L-цистеином и липоевой кислотой с лизином и эремомицином в обращённо-фазовом и полярно-органическом режимах хроматографии. Показана способность синтезированных сорбентов разделять аналиты разной природы. Продемонстрирована возможность использовать сорбент ПС-ДВБ с НЧЗЭ для работы в обращённо-фазовом и гидрофильном вариантах хроматографии, что было невозможно на схожих сорбентах с силикагелевыми подложками. Это позволило провести анализ смеси шести β -блокаторов за 14 минут на сорбенте ПС-ДВБ-Au-Липоевая кислота-Лизин в щелочных условиях, смеси четырёх профенов за 10 минут, и смеси четырёх β -блокаторов за 15 минут на сорбенте ПС-ДВБ-Au-Эремомицин.
6. Показана возможность экспрессного разделения энантиомеров профенов на сорбенте ПС-ДВБ-Au-липоевая кислота-Лизин в обращённо-фазовом режиме хроматографирования с селективностью 1.28-1.45, такая энантиоселективность хирального селектора лизина к профенам продемонстрирована впервые.
7. Показана возможность сорбента ПС-ДВБ-Au-Эремомицин разделять энантиомеры профенов, β -блокаторов, производных аминокислот, что говорит об универсальности полученной хиральной неподвижной фазы. Продемонстрирована принципиальная возможность определения энантиомерного состава лекарственного средства «Кетонал», определён энантиомерный состав напроксена для синтеза биологически активного соединения с платиной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moriarty P. Nanostructured materials // Reports Prog. Phys. 2001. Vol. 64. №. 3. P. 297.
2. Sajid M., Płotka-Wasyłka J. Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences // Microchem. J. 2020. Vol. 154 P. 104623. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104623>
3. Elizabeth G. Nanoparticles in modern separation science // Trends Anal. Chem. 2013. Vol. 46.
4. Minakshi P., Ghosh M., Brar B., Ranjan K., Patki H.S., Kumar R. Separation techniques with nanomaterials // Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry: Modern Trends in Analysis. 2019. P. 99-158.
5. Bushra R., Chapter 15 - Functionalized Nanomaterials for Chromatography // Elsevier Inc. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812792-6.00015-7>
6. Ai-Hong D., Sheng-Ming X., Li-Ming Y. Nanoparticles as stationary and pseudo-stationary phases in chromatographic and electrochromatographic separations // Trends Anal. Chem. 2011. Vol. 30. № 3. P. 484.
7. Hu W., Hong T., Gao X., Ji Y. Applications of nanoparticle-modified stationary phases in capillary electrochromatography // Trends Anal. Chem. 2014. Vol. 61. P. 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.05.011>.
8. Zhang, Z., Wang, Z., Liao, Y., & Liu, H. Applications of nanomaterials in liquid chromatography: Opportunities for separation with high efficiency and selectivity // J. Sep. Sci. 2006. Vol. 29. №. 12. P. 1872-1878. doi:10.1002/jssc.200600154
9. Nesterenko E. P., Nesterenko P. N., Connolly D., He X., Floris P., Duffy E., Paull B. Nano-particle modified stationary phases for high-performance liquid chromatography // Analyst. 2013. Vol. 138. P. 4229–4254.
10. Gama M. R., Bottoli C. B. G. Nanomaterials in liquid chromatography: recent advances in stationary phases // Nanomater. Chromatogr. 2018. P. 255-297.
11. Sykora D., Kasicka V., Miksik I., Rezanka P., Zaruba K., Matejka P., Krai V. Application of gold nanoparticles in separation sciences // J. Sep. Sci. 2010. Vol. 33. P. 372.

12. Duan A., Xie S., Yuan L. Nanoparticles as stationary and pseudo-stationary phases in chromatographic and electrochromatographic separations // Trends Anal. Chem. 2011. Vol. 30, P. 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.007>.
13. Gama M. R., Bottoli C. B. G. Nanomaterials in liquid chromatography: recent advances in stationary phases // Nanomater. Chromatogr. 2018. P. 255-297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812792-6.00009-1>
14. Li Y., Chen Y., Xiang R., Cinparu D., Pfefferle L.D., Horvath C., Wilkins J.A. Incorporation of Single-Wall Carbon Nanotubes into an Organic Polymer Monolithic Stationary Phase for μ -HPLC and Capillary Electrochromatography // Anal. Chem. 2005. Vol. 77. P. 1398.
15. Kwon S.H., Park J.H. Intermolecular interactions on multiwalled carbon nanotubes in reversed-phase liquid chromatography // J. Sep. Sci. 2006. Vol. 29. P. 945.
16. Chang Y.X., Zhou L.L., Li G.X., Wang J.Y., Yuan L.M. Single-Wall Carbon Nanotubes Used as Stationary Phase in HPLC // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2007. Vol. 30. P. 2953.
17. Chang Y.X., Ren C.X., Ruan Q., Yuan L. Effect of Single-walled Carbon Nanotubes on Cellulose Phenylcarbamate Chiral Stationary Phases // Chem. Res. Chin. Univ. 2007. Vol. 23. P. 646.
18. Andre C., Gharbi T., Guillaume Y.C. A novel stationary phase based on amino derivatized nanotubes for HPLC separations: Theoretical and practical aspects // J. Sep. Sci. 2009. Vol. 32. P. 1757.
19. Jinno K., Yamamoto K., Fetzer J.C., Biggs W.R. C60 as a Stationary Phase for Microcolumn Liquid Chromatographic Separation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons // J. Microcol. Sep. 1992. Vol. 4. P. 187.
20. Cintro'n J.M., Colo'n L.A. Organo-silica nano-particles used in ultrahigh-pressure liquid chromatography // Analyst 2002. Vol. 127. P. 701.
21. Duan H.J., Zhang W.Q., Wei Y., Song X., Li Y. Layer-by-Layer Self-Assembly of Multilayer Zirconia Nanoparticles on Silica Spheres for HPLC Packings // L. Chen, Anal. Chem. 2004. Vol. 76. P. 5016.
22. Wu J., Li X., Zhao Y., Zhang W., Guo L., Feng Y., Application of liquid phase deposited titania nanoparticles on silica spheres to phosphopeptide enrichment and

- high performance liquid chromatography packings // J. Chromatogr. A. 2011. Vol. 1218 P. 2944–2953.
23. Silveira J.L.R., Dib S.R., Faria A.M., New support for high-performance liquid chromatography based on silica coated with alumina particles // Anal. Sci. 2014. Vol. 30 P. 285–291.
 24. Sandron S., Paull B., N Nesterenko P. Investigation on selectivity of mercaptopropylsilica and silver nanoparticles-functionalised mercaptopropylsilica // Curr. Chromatogr. 2015. Vol. 2. №. 2. P. 122-135.
 25. Alothman Z.A., Wabaidur S.M., Application of carbon nanotubes in extraction and chromatographic analysis: A review // Arabian Journal of Chemistry, 2019. Vol. 12 P. 633-651.
 26. Krenkova J., Lacher N.A., Svec F., Control of Selectivity via Nanochemistry: Monolithic Capillary Column Containing Hydroxyapatite Nanoparticles for Separation of Proteins and Enrichment of Phosphopeptides // Anal. Chem, 2010. Vol. 82 P. 8335-8341.
 27. Nesterenko P.N., Nesterenko E.P., Hydrophobicity of polymer based anion-exchange columns for ion chromatography // Heliyon, 2021. Vol. 7. № 6. P. e07290.
 28. Aqel A., Using of nanomaterials to enhance the separation efficiency of monolithic columns // Nanomaterials in Chromatography: Current Trends in Chromatographic Research Technology and Techniques 2018. P. 299-322.
 29. Niidome T., Gold nanoparticles // Drug Deliv. Syst. 2017. Vol. 31. P. 477–479. <https://doi.org/10.2745/dd.31.477>.
 30. De Souza C.D., Nogueira B.R., Rostelato M.E.C.M., Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction // J. Alloys Compd. 2019. Vol. 798. P. 714–740. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153>.
 31. Dykman L.A., Khlebtsov N.G., Methods for chemical synthesis of colloidal gold // Russ. Chem. Rev. 2019. Vol. 88. P. 229–247. <https://doi.org/10.1070/rcr4843>.
 32. Khan A.R., Shamim M., Mamun A., Habib A., Islam A.B.M.N., Karim K.R., Naime J., Saha P., Dey S.K., Ara M.H., Results in Chemistry A review on gold nanoparticles : Biological synthesis , characterizations , and analytical applications // Results Chem. 2022. Vol. 4. P. 100478. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100478>.

33. Sharma N., Bhatt G., Kothiyal P., Gold Nanoparticles synthesis, properties, and forthcoming applications : A review // Indian J. Pharm. Biol. Res. 2015. Vol. 3. P. 13–27. <https://doi.org/10.30750/ijpbr.3.2.3>
34. Бычковский П., Кладиев А., Соломевич С., Щеголев С., Золотые Наночастицы: Синтез, Свойства, Биомедицинское Применение // Российский Биотерапевтический Журнал. 2011. Т. 10. С. 37-46.
35. Vericat C., Vela M.E., Benitez G., Carro P., Salvarezza R.C., Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system // Chem. Soc. Rev. 2010. Vol. 39. P. 1805-1834. <https://doi.org/10.1039/b907301a>.]
36. Dykman L.A., Khlebtsov N.G., Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects // Acta Naturae. 2011. Vol. 3. P. 34–55. <https://doi.org/10.32607/20758251-2011-3-2-34-56>.
37. Saha K., Agasti S.S., Kim C., Li X., Rotello V.M., Gold nanoparticles in chemical and biological sensing // Chem. Rev. 2012. Vol. 112. P. 2739–2779. <https://doi.org/10.1021/cr2001178>.
38. Lazarus N., Jin R., Fedder G.K., The use of coated gold nanoparticles in high performance chemical sensors // Woodhead Publishing Limited, 2014. P. 231-253. <https://doi.org/10.1533/9780857096722.2.231>.
39. Wang Z., Ma L., Gold nanoparticle probes // Coord. Chem. Rev. 2009. Vol. 253. P. 1607–1618. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.005>.
40. Sýkora D., Kašička V., Mikšík I., Řezanka P., Záruba K., Matějka P., Král V., Application of gold nanoparticles in separation sciences // J. Sep. Sci. 2010. Vol. 33. P. 372–387. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900677>.
41. Liu F.K., Analysis and applications of nanoparticles in the separation sciences: A case of gold nanoparticles // J. Chromatogr. A. 2009. Vol. 1216. P. 9034–9047. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.026>.
42. Qu Q.S., Zhang X.X., Zhao Z.Z., Hu X.Y., Yan C. Gold microspheres modified with octadecanethiol for capillary liquid chromatography. // J. Chromatogr. A. 2008. Vol. 1198. P. 95-100.
43. Bouri M., Salghi R., Zougagh M., Ríos A. Enantioselective discrimination of menthone enantiomers by using achiral liquid chromatography with circular

- dichroism detection and penicillamine-coated gold nanoparticles // *Microchem. J.* 2016. Vol. 124. P. 736–742.
44. Ананьева, И. А., Полякова, Я. А., Шаповалова, Е. Н., & Шпигун, О. А. Использование в хроматографии сорбентов, модифицированных наночастицами золота // *Журн. аналит. Химии.* 2017. Т. 72. №. 8. С. 714-726. <https://doi.org/10.7868/S0044450217080023>.
45. Qu Q., Peng S., Mangelings D., Hu X., Yan C. Silica spheres coated with C18-modified gold nanoparticles for capillary LC and pressurized CEC separations // *Electrophoresis.* 2010. Vol. 31. P. 556–562.
46. Liu F.K., Wei G.T., Cheng F.C. Immobilization of a Monolayer of Bovine Serum Albumin on Gold Nanoparticles for Stereo-specified Recognition of Dansyl-norvaline // *Chin. J. Chem. Soc.* 2003. Vol. 50. P. 931.
47. Шаповалова Е.Н., Ананьева И.А., Елфимова Я.А., Гринева Л.А., Мажуга А.Г., Шпигун О.А. Разделение азотсодержащих соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на силикагеле, модифицированном наночастицами золота, стабилизированными хитозаном // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2012. Т. 53. № 2. С. 108.
48. Ананьева, И. А., Елфимова, Я. А., Мажуга, А. Г., Рудаковская, П. Г., Шаповалова, Е. Н., Зык, Н. В., Шпигун, О. А. Новый наногибридный функциональный материал для ВЭЖХ на основе наночастиц золота, стабилизированных L-цистеином // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2011. Т. 11, № 2. С. 281–291.
49. Ya. A. Elfimova, D. A. Pichugina, I. A. Anan'eva, A. G. Mazhuga, Shpigun O. A. Regularities of the Retention of Aminopyridines by Silica Gel Modified with Gold Nanoparticles // *J. Phys. Chem. A.* 2012 Vol. 86. № 10. P. 1623-1629.
50. Елфимова Я. А., Ананьева И. А., А. Г. Мажуга А. Г., Шпигун О. А. Разделение замещенных гидразинов методом вэжх в виде производных с 2,3-нафталиндикарбоксальдегидом на силикагеле, модифицированном наночастицами золота // *Заводск. лаборатория. Диагностика материалов.* 2012. Т. 78. № 6. С. 20.

51. Li Y., Wei M., Chen T., Zhu N., Ma Y., Self-assembled cyclodextrin-modified gold nanoparticles on silica beads as stationary phase for chiral liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography // *Talanta*. 2016. Vol. 160. P. 72–78.
52. Majouga A., Pichugina D., Ananieva I., Kurilova S., Shpigun O., Kuz'Menko N., Zyk N., New separation materials based on gold nanoparticles // *J. Manuf. Technol. Manag.* 2010. Vol. 21. P. 950–955. <https://doi.org/10.1108/17410381011086775>.
53. Цюрупа, М. П., Блинникова, З. К., Павлова, Л. А., Пастухов, А. В., & Даванков, В. А. Сверхсшитому полистиролу полвека: от нетривиальной идеи до промышленной реализации. // *Лаборатория и производство*. 2020. № 1. С. 86-96.
54. Zatirakha, A. V., Smolenkov, A. D., & Shpigun, O. A. Preparation and chromatographic performance of polymer-based anion exchangers for ion chromatography: A review. // *Anal. Chim. Acta*. 2016. Vol. 904 P. 33-50.
55. Mahouche-Chergui S., Guerrouache M., Carbonnier B., Chehimi M. M. Polymer-immobilized nanoparticles // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2013. Vol. 439. P. 43– 68.
56. Huang Z., Yao P., Zhu Q., Wang L., Zhu Y., The polystyrene-divinylbenzene stationary phase hybridized with oxidized nanodiamonds for liquid chromatography // *Talanta*. 2018. Vol. 185. P. 221–228.
57. Wiest L.A., Jensen D.S., Hung C.H., Olsen R.E., Davis R.C., Vail M.A., Dadson A.E., Nesterenko P.N., Linford M.R., Pellicular Particles with Spherical Carbon Cores and Porous Nanodiamond/Polymer Shells for Reversed-Phase HPLC // *Anal. Chem.* 2011. Vol. 83. P. 5488-5501.
58. Gupta V., Kazarian A., Gaskell B., Linford M., Jensen D., Paull B., Nesterenko P., Mixed-mode liquid chromatography on core shell stationary phases based on layer-by-layer nanodiamond/polyamine architecture // *Curr. Chromatogr*, 2018. Vol. 5. P. 5-17.
59. Bandari R., Buchmeiser M. R. Polymeric monolith supported Pt-nanoparticles as ligand-free catalysts for olefin hydrosilylation under batch and continuous conditions // *Catalysis Science & Technology*. 2012. Vol. 2. №. 1. P. 220-226. <https://doi.org/10.1039/c1cy00351h>.

60. Li Y., Sha S., Wu Z., Yang C., Ngai T., Facile synthesis of gold nanoparticle-coated polystyrene composite particles templated from Pickering emulsion // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2016. Vol. 494. P. 116-124.
61. Bo J., Yu L., Qi W., Hao J., Kaiguang Y., Lihua Z., Zhen L., Xiaojun P., Yukui Z. New GO-PEI-Au-L-Cys ZIC-HILIC composites: synthesis and selective enrichment of glycopeptides // *Nanoscale*. 2014. Vol. 6. P. 5616.
62. Cao Q., Xu Y., Liu F., Svec F., Fre J.M.J., Polymer Monoliths with Exchangeable Chemistries : Use of Gold Nanoparticles As Intermediate Ligands for Capillary Columns with Varying Surface Functionalities its epoxide moieties with cysteamine to afford a monolith // *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82. P. 7416–7421.
63. L. Terborg, J.C. Masini, M. Lin, K. Lipponen, M. Riekolla, F. Svec, Porous polymer monolithic columns with gold nanoparticles as an intermediate ligand for the separation of proteins in reverse phase-ion exchange mixed mode // *J. Adv. Res.* 2015. Vol. 6. P. 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.10.004>.
64. Lv Y., Alejandro F.M., Fréchet J.M.J., Svec F., Preparation of porous polymer monoliths featuring enhanced surface coverage with gold nanoparticles // *J. Chromatogr. A*. 2012. Vol. 1261. P. 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.007>.
65. Xu Y., Cao Q., Svec F., Fre J.M.J., Porous Polymer Monolithic Column with Surface-Bound Gold Nanoparticles for the Capture and Separation of Cysteine-Containing Peptides // *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82. P. 3352–3358.
66. Lv Y., Lin Z., Svec F., Hypercrosslinked Large Surface Area Porous Polymer Monoliths for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography of Small Molecules Featuring Zwitterionic Functionalities Attached to Gold Nanoparticles Held in Layered Structure // *Anal. Chem.*. 2012. Vol. 84. P. 8457-8460.
67. Kobayashi K., Kitagawa S., Ohtani H. Development of capillary column packed with thiol-modified gold-coated polystyrene particles and its selectivity for aromatic compounds Ken Kobayashi // *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1110. P. 95–101.
68. Teixeira J., Tiritan M.E., Pinto M.M.M., Fernandes C., Chiral stationary phases for liquid chromatography: Recent developments // *Molecules*. 2019. Vol. 24. №. 5. P. 865.

69. Zhang J.H., Xie S.M., Yuan L.M. Recent progress in the development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* 2022. Vol. 45, № 1. P. 51–77.
70. Berthod A. Chiral recognition mechanisms with macrocyclic glycopeptide selectors // *Chirality*. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 21, № 1. P. 167–175.
71. Armstrong D.W. et al. Macrocyclic Antibiotics as a New Class // *Anal. Chem.* 1994. Vol. 66, № 9. P. 1473–1484.
72. Fouad A. et al. Colistin sulfate chiral stationary phase for the enantioselective separation of pharmaceuticals using organic polymer monolithic capillary chromatography † // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 5.
73. Ward T.J., Farris A.B. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review // *J. Chromatogr. A*. Elsevier, 2001. Vol. 906, № 1–2. P. 73–89.
74. Scriba G.K.E. Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences // *Chromatogr.* 2012 7515. Springer, 2012. Vol. 75, № 15. P. 815–838.
75. Ribeiro A.R. et al. Enantioseparation of chiral pharmaceuticals in biomedical and environmental analyses by liquid chromatography: An overview // *J. Chromatogr. B*. Elsevier, 2014. Vol. 968. P. 8–21.
76. Staroverov S.M. et al. New chiral stationary phase with macrocyclic glycopeptide antibiotic eremomycin chemically bonded to silica // *J. Chromatogr. A*. 2006. Vol. 1108, № 2. P. 263–267.
77. Petrusevska K. et al. Chromatographic enantioseparation of amino acids using a new chiral stationary phase based on a macrocyclic glycopeptide antibiotic // *J. Sep. Sci.* John Wiley & Sons, Ltd, 2006. Vol. 29, № 10. P. 1447–1457.
78. Zhang L. et al. Application of an eremomycin-chiral stationary phase for the separation of dl-methionine using simulated moving bed technology // *J. Chromatogr. A*. Elsevier, 2007. Vol. 1162, № 1. P. 90–96.
79. Kuznetsov M.A. et al. Sorbents with immobilized glycopeptide antibiotics for separating optical isomers by high-performance liquid chromatography // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006 426. Springer, 2006. Vol. 42, № 6. P. 536–544.
80. Gause G.F. et al. Eremomycin--new glycopeptide antibiotic: chemical properties and structure // *J. Antibiot. (Tokyo)*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1989. Vol. 42, № 12. P. 1790–1799.

81. Gogolishvili O.S., Reshetova E.N. Chromatographic enantioseparation and adsorption thermodynamics of hydroxy acids and their derivatives on antibiotic-based chiral stationary phases as affected by eluent pH // *Chromatographia*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021. Vol. 84, № 1. P. 53–73.
82. Cancelliere G. et al. Transition from enantioselective high performance to ultra-high performance liquid chromatography: A case study of a brush-type chiral stationary phase based on sub-5-micron to sub-2-micron silica particles // *J. Chromatogr. A*. 2010. Vol. 1217, № 7. P. 990–999.
83. Kotoni D. et al. Introducing enantioselective ultrahigh-pressure liquid chromatography (eUHPLC): Theoretical inspections and ultrafast separations on a new sub-2- μ m Whelk-O1 stationary phase // *Anal. Chem.* 2012. Vol. 84, № 15. P. 6805–6813.
84. Anan'eva I.A. et al. Separation of β -blocker enantiomers on silica modified with gold nanoparticles with immobilized macrocyclic antibiotic vancomycin // *J. Anal. Chem.* 2018. Vol. 73, № 2. P. 152–159.
85. Folprechtová D. et al. Enantioseparation performance of superficially porous particle vancomycin-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography and high performance liquid chromatography; applicability for psychoactive substances // *J. Chromatogr. A*. 2021. Vol. 1637.
86. Hellinghausen G. et al. Evaluation of the Edman degradation product of vancomycin bonded to core-shell particles as a new HPLC chiral stationary phase // *Chirality*. 2018. Vol. 30, № 9. P. 1067–1078.
87. Patel D.C. et al. Gone in Seconds: Praxis, Performance, and Peculiarities of Ultrafast Chiral Liquid Chromatography with Superficially Porous Particles // *Anal. Chem.* 2015. Vol. 87, № 18. P. 9137–9148.
88. Patel D.C. et al. Separations at the Speed of Sensors // *Anal. Chem.* 2018. Vol. 90, № 5. P. 3349–3356.
89. Gonçalves M. da S. et al. Development and validation of a fast HPLC method for methyl dopa enantiomers using superficially porous particle based macrocyclic glycopeptide stationary phase // *Microchem. J.* 2021. Vol. 164, № November 2020. P. 105957.

90. Yu B. et al. Light-assisted preparation of vancomycin chiral stationary phase based on diazotized silica and its enantioseparation evaluation by high-performance liquid chromatography // *Talanta*. 2018. Vol. 182, P. 171–177.
91. Li L. et al. Preparation of a teicoplanin-bonded chiral stationary phase for simultaneous determination of clenbuterol and salbutamol enantiomers in meat by LC-MS/MS // *Microchem. J.* 2020. Vol. 157, P. 104925.
92. Hellinghausen G. et al. Effective methodologies for enantiomeric separations of 150 pharmacology and toxicology related 1° 2° and 3° amines with core-shell chiral stationary phases // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. Vol. 155. P. 70–81.
93. Kopchenova M. V., Stepanova M. V., Asnin L.D. Unusual Difference in Enantioselectivity of Two Chiral Stationary Phases with Grafted Antibiotic Ristocetin A // *Chromatographia*. Springer Berlin Heidelberg, 2021. Vol. 84, № 3. P. 307–311.
94. Tanács D. et al. Enantioseparation of β 2-amino acids by liquid chromatography using core-shell chiral stationary phases based on teicoplanin and teicoplanin aglycone // *J. Chromatogr. A*. 2021. Vol. 1653, P. 462383.
95. Hsieh M.L., Chau L.K., Hon Y.S. Single-step approach for fabrication of vancomycin-bonded silica monolith as chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*. 2014. Vol. 1358. P. 208–216.
96. Pittler E., Schmid M.G. Enantioseparation of dansyl amino acids by HPLC on a monolithic column dynamically coated with a vancomycin derivative // *Biomed. Chromatogr.* 2010. Vol. 24, № 11. P. 1213–1219.
97. Fedorova I.A. et al. Bovine serum albumin adsorbed on eremomycin and grafted on silica as new mixed-binary chiral sorbent for improved enantioseparation of drugs // *J. Food Drug Anal.* Elsevier Ltd, 2016. Vol. 24, № 4. P. 848–854.
98. Armstrong D.W., Rundlett K.L., Chen J. -R. Evaluation of the macrocyclic antibiotic vancomycin as a chiral selector for capillary electrophoresis // *Chirality*. 1994. Vol. 6, № 6. P. 496–509.
99. Armstrong D.W., Liu Y., Ekborgott K.H. A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparations // *Chirality*. 1995. Vol. 7, № 6. P. 474–497.

- 100.** Shapovalova E.N. et al. Macrocyclic Antibiotics as Chiral Selectors in High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis // J. Anal. 2018. Vol. 73, № 11. P. 1064–1075.
- 101.** Anan'eva I.A. et al. Separation of amino acid enantiomers and enantiomers of their derivatives on macrocyclic antibiotic «TEICOPLANIN» // Vestn. Mosk. Univ. 2001. Vol. 42, № 4.
- 102.** Berdnikova T.F. et al. The structure and antimicrobial activity of the partial degradation products of the antibiotic eremomycin. // Antibiot. i Khimioterapiia = Antibiot. Chemotherapy. 1991. Vol. 36, № 6. P. 28–31.
- 103.** Kuznetsov M.A. et al. High-performance liquid chromatography of α -amino acid enantiomers on eremomycin-modified silica // J. Anal. Chem. 2008. Vol. 63, № 1. P. 57–64.
- 104.** D'Acquarica I. et al. HPLC chiral stationary phases containing macrocyclic antibiotics: Practical aspects and recognition mechanism // Adv. Chromatogr. 2007. Vol. 46. P. 109–174.
- 105.** Kuznetsov M.A. et al. Sorbents with immobilized glycopeptide antibiotics for separating optical isomers by high-performance liquid chromatography // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. Vol. 42, № 6. P. 536–544.
- 106.** Anan'eva I.A. et al. Separation of β -Blockers on Chiral Stationary Phases Based on the Teicoplanin Macrocyclic Antibiotic // J. Anal. Chem. 2003. Vol. 58, № 7. P. 663–664.
- 107.** Bosáková Z., Cuřínová E., Tesařová E. Comparison of vancomycin-based stationary phases with different chiral selector coverage for enantioselective separation of selected drugs in high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1088, № 1–2. P. 94–103.
- 108.** Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Староверов С.М. Разделение энантиомеров производных аминокислот на силикагеле, модифицированном макроциклическим антибиотиком эремомицином // Сорбционные и хроматографические процессы. 2015. Т. 15, № 6. С. 769–775.
- 109.** Fedorova I.A., Shapovalova E.N., Shpigun O.A. Separation of β -blocker and amino acid enantiomers on a mixed chiral sorbent modified with macrocyclic

- antibiotics eremomycin and vancomycin // J. Anal. Chem. 2017. Vol. 72, № 1. P. 76–82.
110. Sarvin, N., Puzankov, R., Vasiyarov, G., Nesterenko, P. N., & Staroverov, S. M. (2022). Silica Immobilised Chloro-and Amido-Derivatives of Eremomycine as Chiral Stationary Phases for the Enantioseparation of Amino Acids by Reversed-Phase Liquid Chromatography // *Molecules*. 2022. Vol. 28. № 1. P. 85.
 111. Сарвин, Н. А., Пузанков, Р. В., Нестеренко, П. Н., & Староверов, С. М. (2022). Энантиоселективность жидкостно-хроматографического разделения профенов на хиральных сорбентахс иммобилизованными производными эремомицина и оритаванцином // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22ю № 5. С. 638-649.
 112. Kuznetsov, M. A., Staroverov, S. M., Sarvin, N., Puzankov, R., & Nesterenko, P. N. Enantioseparation of β -Blockers Using Silica-Immobilised Eremomycin Derivatives as Chiral Stationary Phases in HPLC // *Symmetry*. 2023. Vol. 15. № 2. P. 373.
 113. Gogoi, A., Mazumder, N., Konwer, S., Ranawat, H., Chen, N. T., & Zhuo, G. Y. Enantiomeric recognition and separation by chiral nanoparticles // *Molecules*. 2019. Vol. 24. № 6. P. 1007.
 114. Li Y. et al. Preparation of polysaccharide-based chiral stationary phases on SiO₂@Ag core-shell particles by means of coating and intermolecular polycondensation and comparative liquid chromatography enantioseparations // *Anal. Bioanal. Chem*. 2018. Vol. 410, № 2. P. 441–449.
 115. Li Y. et al. Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases on Gold Nanoparticles Modified Silica Beads for Liquid-Phase Separation of Enantiomers // *J. Chromatogr. Sci*. 2020. Vol. 58, № 8. P. 731–736.
 116. Navarro-Pascual-Ahuir M. et al. Preparation and evaluation of lauryl methacrylate monoliths with embedded silver nanoparticles for capillary electrochromatography // *Electrophoresis*. 2013. Vol. 34, № 6. P. 925–934.
 117. Amoli-Diva M., Pourghazi K. Gold nanoparticles grafted modified silica gel as a new stationary phase for separation and determination of steroid hormones by thin layer chromatography // *J. Food Drug Anal*. 2015. Vol. 23, № 2. P. 279–286.

- 118.** Shapovalova E.N. et al. Sorbent for the separation of enantiomers of amino acids based on silica gel modified with stabilized Au nanoparticles // *Mendeleev Commun. Elsevier*, 2019. Vol. 29, № 6. P. 702–704.
- 119.** Pirkle, W. H., & Sikkenga, D. L. Resolution of optical isomers by liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1976. Vol. 123. № 2. P. 400-404
- 120.** Fernandes, C., Tiritan, M. E., & Pinto, M. Small molecules as chromatographic tools for HPLC enantiomeric resolution: Pirkle-type chiral stationary phases evolution // *Chromatographia*. 2013. Vol. 76. P. 871-897
- 121.** Fernandes, C., Phyto, Y. Z., Silva, A. S., Tiritan, M. E., Kijjoa, A., & Pinto, M. M. Chiral stationary phases based on small molecules: An update of the last 17 years. // *Sep. Purif. Rev.* 2018. Vol. 47. № 2. P. 89-123.
- 122.** Forjan, D. M., Kontrec, D., & Vinković, V. Performance of brush-type HPLC chiral stationary phases with tertiary amide in the connecting tether. // *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry*. 2006. Vol. 18. № 10. P. 857-869.
- 123.** Дыкман Л. А., Богатырев В. А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии // *Успехи химии*. 2017. № 2. С. 76
- 124.** Tirla A., Hansen M., Rivera-Fuentes P., Synthesis of Asparagusic Acid Modified Lysine and its Application in Solid-Phase Synthesis of Peptides with Enhanced Cellular Uptake // *Synlett*. 2018. Vol. 29, P. 1289–1292.
- 125.** Amendola V., Meneghetti M., Stener M., Guo Y., Chen S., Crespo P., García M., Hernando A., Pengo P., Pasquato L. Chapter 3 - Physico-Chemical Characteristics of Gold Nanoparticles // *Compr. Anal. Chem.* 2014. Vol. 66. P. 81-152.
- 126.** Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа / Пер. с англ. М.: Мир, 1989. 348 с.
- 127.** Долгоносков А. М., Рудаков О. Б., Прудковский А. Г. Колоночная аналитическая хроматография: практика, теория, моделирование. СПб.: Лань, 2015. 468 с.
- 128.** Dolci M. Chromatographic Characterization of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography // *Thermo Fisher Scientific*. 2013.

129. Kuo, P. L., & Chen, C. C. Generation of gold thread from Au (III) and triethylamine. // *Langmuir*. 2006. Vol. 22(18). P. 7902-7906.
130. Datta, A., & Pal, S. Effects of conjugation length and donor–acceptor functionalization on the non-linear optical properties of organic push–pull molecules using density functional theory. // *Journal of Molecular Structure*. 2005. Vol. 715(1-3). P. 59-64.
131. Ali, S., Perveen, S., Shah, M. R., Zareef, M., Arslan, M., Basheer, S., Ali, M. (2020). Bactericidal potentials of silver and gold nanoparticles stabilized with cefixime: A strategy against antibiotic-resistant bacteria. // *J. Nanoparticle Res.* 2020. Vol. 22. P. 1-12.
132. Spector, D., Krasnovskaya, O., Pavlov, K., Erofeev, A., Gorelkin, P., Beloglazkina, E., & Majouga, A. Pt (IV) prodrugs with NSAIDs as axial ligands. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22(8). P. 3817.
133. Чикурова, Н. Ю., Просунцова, Д. С., Ставрианиди, А. Н., Староверов, С. М., Ананьева, И. А., Смоленков, А. Д., and Чернобровкина, А. В. Новые многофункциональные сорбенты для ВЭЖХ на основе различных матриц, модифицированных эремомицином. // *Журн. аналит. Химии*. 2023. Т. 78. № 5. С. 1–14.