



**Иоутси Анна Николаевна**

**РАЗДЕЛЕНИЕ ПОЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КАПИЛЛЯРНЫМ  
ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ И ВЭЖХ НА МАТЕРИАЛАХ,  
ПОСЛОЙНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИКАТИОНАМИ И  
ПОЛИАНИОНАМИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ имени М.В. Ломоносова)

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

**Шаповалова Елена Николаевна**

кандидат химических наук, доцент

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

**Курганов Александр Александрович**

доктор химических наук

ФГБУН Институт нефтехимического синтеза

имени А.В. Топчиева РАН (ИНХС РАН),

заведующий лабораторией хроматографии

**Буданова Наталья Юрьевна**

кандидат химических наук

ООО «НПО ДНК-Технология», инженер-химик

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

**ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (ИФХЭ РАН)**

Защита состоится «17» февраля 2016 г. в 16.30 в аудитории 446 на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова <http://chem.msu.ru>. Текст автореферата размещен на сайте ВАК <http://vak.ed.gov.ru>

Автореферат разослан « » декабря 2015 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета Д 501.001.88,

кандидат химических наук

Моногорова О.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Получение новых стационарных фаз для ВЭЖХ – активно развивающееся направление в ВЭЖХ, особое внимание привлекают сорбенты для разделения маленьких полярных молекул, органических и неорганических анионов, структурных или оптических изомеров. Широко используемый тип стационарных фаз – силикагель, модифицированный синтетическими или природными полимерами или их производными. Важно выбрать способы модифицирования матрицы, не требующие дорогих исходных материалов и длительного многостадийного органического синтеза. Метод последовательного осаждения полиэлектролитов на заряженные субстраты – это активно развивающийся в последние двадцать лет метод создания новых материалов для решения различных задач.

Однако не так хорошо исследованы хроматографические системы на основе полиэлектролитных покрытий (ПЭП), поэтому *актуальны* исследования как закономерностей формирования полислоев на поверхности матрицы, так и изучение возможности и особенностей удерживания различных полярных веществ с помощью таких сорбентов.

В последние пятнадцать лет появилось много работ по ПЭП в КЭ, где в качестве поликатионов используют полимерные четвертичные аммониевые соли (полибрены). Некоторые из класса полибреннов – ионены принимают в водном растворе линейную конформацию. Это способствует достаточно равномерному модифицированию поверхности за счёт электростатических сил. Кроме того, ионены способны образовывать полиэлектролитные комплексы (ПЭК) с отрицательно заряженными полимерными молекулами. 6,10-ионен обладает высокой плотностью заряда цепи и средней гидрофобностью, что очень важно при создании полиэлектролитного покрытия для разделения полярных органических соединений. Полисахариды – одни из самых популярных модификаторов для синтеза полярных хроматографических сорбентов. Анионные полисахариды широко применяются в капиллярном электрофорезе (КЭ) для разделения полярных соединений и их энантиомеров.

Образование ПЭП на поверхности многих матриц и силикагеля в частности открывает возможности по созданию целого класса хроматографических сорбентов, отличных от силикагелей, модифицированных каким-либо полимером или ковалентно связанными полимерами. Во время послойной самоорганизации монослои полиэлектролитов не только электростатически взаимодействуют друг с другом, но также имеют склонность к взаимопроникновению. Установлено, что использование двух и более слоёв полиэлектролитов приводит к гораздо более упорядоченной структуре на поверхности матрицы и зачастую более тонкому модифицирующему слою по сравнению с единичным модифицирующим слоем полиэлектролита. Успехи, достигнутые с применением ПЭП, включающих наночастицы золота (НЧЗ) в КЭ и капиллярной электрохроматографии (КЭХ), позволяют прогнозировать возможность получения и перспективность аналогичных сорбентов для ВЭЖХ.

Из достоинств получаемых материалов отметим простоту их синтеза на основе методики послойного нанесения, коммерческую доступность и простоту синтеза исходных реагентов, механическую прочность и стабильность работы в течение длительного времени, совместимость с масс-спектрометрическим детектированием и, главное, способность к разделению нескольких классов полярных соединений одновременно.

**Цель работы** заключалась в получении и изучении полиэлектролитных систем на основе 6,10-ионена, хитозана в качестве поликатионов и лигносульфоната натрия (ЛСТ),

N-(3-сульфо, 3-карбоксо)-пропионилхитозана (СКПХ) и сульфата декстрана (СД) в качестве полианионов, и НЧЗ, стабилизируемых цитратом натрия, а также оценка их возможностей в варианте КЭ и ВЭЖХ на примере разделения полярных органических соединений.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- получить ПЭП на кварцевом капилляре по методике послойного нанесения и исследовать влияние модифицирования поверхности на направление и скорость электроосмотического потока (ЭОП);
- изучить возможность применения полученных модифицированных капилляров для разделения и определения азотсодержащих фармакологически активных органических соединений методом КЭ;
- получить и исследовать сорбенты для ВЭЖХ, послойно модифицированные 6,10-ионеном, анионными полиэлектролитами и НЧЗ;
- изучить условия разделения разных классов полярных органических соединений – фенолкарбоновых кислот (ФКК) и азотсодержащих соединений ( $\alpha$ -,  $\beta$ - и Н-блокаторов,  $\beta$ -агонистов,  $\alpha$ - и  $\beta$ -адреномиметиков, М-холиноблокаторов) на полученных сорбентах;
- апробировать новые синтезированные сорбенты при анализе реальных объектов;
- проверить возможность использования масс-спектрометрического детектирования при анализе реальных объектов на примере одного из полученных в работе сорбентов.

#### **Научная новизна работы.**

Предложены и изучены новые ПЭП для кварцевых капилляров в КЭ: 6,10-ионен–СКПХ, 6,10-ионен–СД, 6,10-ионен–ЛСТ. Для СКПХ и СД также получены покрытия 6,10-ионен–НЧЗ–СКПХ и 6,10-ионен–НЧЗ–СД. На примере СД исследовано влияние количества модифицирующих слоёв на способность капилляра к разделению, а также энантиоразделению азотсодержащих соединений.

Предложен способ получения полиэлектролитных сорбентов для ВЭЖХ на основе методики послойного нанесения, включающий в себя первичное модифицирование поверхности силикагеля поликатионом с последующей иммобилизацией полианиона или НЧЗ, а затем – полианиона.

Синтезирован ряд новых полиэлектролитных сорбентов для ВЭЖХ на основе СД, ЛСТ, 6,10-ионена, хитозана, НЧЗ, стабилизированных цитратом натрия, и немодифицированного силикагеля (в случае хитозана – аминопропилсиликагеля). Сорбенты получены с применением модификаторов силикагеля, практически не описанных в ВЭЖХ.

Установлены закономерности удерживания ФКК и азотсодержащих соединений на полученных неподвижных фазах (НФ) для ВЭЖХ.

Найдены условия разделения некоторых ФКК и азотсодержащих соединений отдельно и совместно в смеси на следующих сорбентах:

- силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и ЛСТ;
- силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и СД;
- силикагель, двукратно модифицированный 6,10-ионеном и СД;
- силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, НЧЗ, стабилизированными цитратом натрия, и СД;

**Практическая значимость.** В ходе работы синтезированы 6 новых сорбентов на основе вышеуказанных полиэлектролитов для разделения полярных органических соединений разных классов.

Практическую значимость имеют следующие разработанные методики определения ФКК и азотсодержащих соединений с помощью некоторых предложенных полиэлектролитных систем:

- тетрагидрозолин, карбиноксамин и фурацилин в моче человека в кварцевом капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СД (определяемые содержания составляли доли мкг/мл);
- ванилиновая, галловая и бензойная кислоты в красном вине “Изабелла” на силикагеле, модифицированном 6,10-ионеном и ЛСТ (десятки мкг/мл);
- сорбиновая, галловая, *n*-кумаровая и кофеиновая кислоты в цитрусовом мёде на силикагеле, модифицированном 6,10-ионеном и СД (десятые доли – единицы мкг/мл);
- кофеин, парацетамол и хлорфенирамин в сыворотке крови на силикагеле, двукратно модифицированном 6,10-ионеном и СД (десятки – сотни нг/л).

Показана возможность использования новых сорбентов – силикагеля, двукратно модифицированного 6,10-ионеном и СД, и силикагеля, модифицированного 6,10-ионеном, НЧЗ, стабилизированными цитратом натрия, и СД – для одновременного разделения смеси ФКК и азотсодержащих соединений методом ОФ ВЭЖХ.

На примере силикагеля, двукратно модифицированного 6,10-ионеном и СД, показана возможность применения данных НФ для определения азотсодержащих соединений в сыворотке крови на уровне 0.5 нг/мл методом ВЭЖХ-МС.

#### **На защиту выносятся:**

- данные по разделению азотсодержащих фармакологически активных соединений и их энантимеров в капиллярах с предложенными ПЭП методом КЭ;
- результаты исследования влияния количества модифицирующих слоёв в составе ПЭП и включения в него НЧЗ на характеристики капилляра;
- разработанные способы синтеза 6 новых сорбентов для ВЭЖХ;
- результаты исследования синтезированных сорбентов комплексом физико-химических методов (методы элементного анализа, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), низкотемпературной адсорбции азота, спектроскопии диффузного отражения (ДО), ИК-спектроскопии, потенциометрического и осадительного титрования);
- данные по разделению ФКК и азотсодержащих соединений на синтезированных сорбентах;
- выявленные закономерности удерживания данных классов соединений на полученных НФ;
- методики определения ФКК и азотсодержащих соединений в различных реальных объектах методами КЭ, ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС с использованием предложенных ПЭП;

**Апробация работы.** XVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010» (Москва, 2010), 5-я Всероссийская конференция студентов и аспирантов с международным участием «Химия в современном мире-2011» (Санкт-Петербург, 2011), XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011» (Москва, 2011), 2-я Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2013), 9<sup>th</sup> Balaton symposium on high-performance separation methods (Шиофок, Венгрия, 2013), 30<sup>th</sup> International symposium on chromatography (Зальцбург, Австрия, 2014).

**Публикации.** Основное содержание работы изложено в 8 печатных работах: в 3 статьях и 5 тезисах докладов.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 4 глав обзора литературы, 4 глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой

литературы. Материал диссертации изложен на 198 страницах машинописного текста, содержит 81 рисунок, 60 таблиц, в списке цитируемой литературы 256 наименований.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Обзор литературы

В обзоре литературы систематизированы и обсуждены сведения из научных публикаций, посвященных полиэлектролитам и в частности их свойству образовывать ПЭК. Рассмотрены основные виды полиэлектролитов, используемых в сепарационных аналитических методах для создания сорбентов, капилляров и прочих материалов. Также представлена информация по НЧЗ в качестве модификатора различных матриц, в том числе и для сепарационных методов, в основном – КЭ, КЭХ и ГХ. В жидкостной хроматографии сорбентов с НЧЗ, изготовленных вне нашей научной группы, в литературе описано мало. Показана перспективность использования полисахаридов, ионенов, а также НЧЗ в качестве модификаторов НФ в различных вариантах хроматографии.

Кратко изложена суть и достоинства метода послойного нанесения на частном примере иммобилизации полиэлектролитов на различные матрицы. Определённый акцент сделан на отличии свойств полиэлектролитных слоёв, входящих в ПЭК, от полиэлектролитов, иммобилизованных на матрицу иным способом, что позволяет предполагать наличие новых свойств у полиэлектролитных сорбентов.

Систематизированы литературные данные по определению в реальных объектах фенольных кислот и азотсодержащих фармакологически активных соединений хроматографическими и электромиграционными методами. Показана актуальность создания полярных НФ, а также сорбентов смешанного типа для определения методом ВЭЖХ этих классов соединений в различных объектах.

### Экспериментальная часть

#### Физико-химическое исследование полученных полиэлектролитных сорбентов

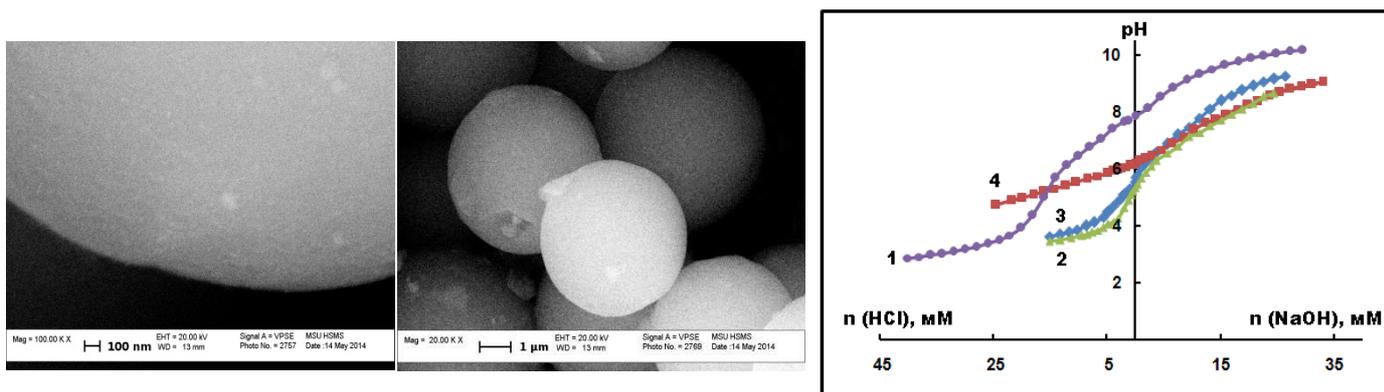
В работе в качестве основных и дополнительных модификаторов использовали 6,10-ионен ( $M_r$  10 кДа, строение и элементный состав подтверждены методами ЯМР-спектроскопии и элементного анализа соответственно), хитозан ( $M_r$  5 кДа), СД ( $M_r$  15 кДа), СКПХ ( $M_r$  5 кДа), ЛСТ ( $M_r$  24.2 кДа). В качестве матриц сорбентов выступали силикагель Kromasil 100–5-Sil (5 мкм, площадь поверхности 300 м<sup>2</sup>/г, “Ekachemicals”), “SilasorbNH<sub>2</sub>” (размер частиц 7.5 мкм, “Merk”).

Для контроля процесса модифицирования силикагеля и оценки некоторых свойств полученных сорбентов в работе использовали следующие физико-химические методы анализа: элементный анализ, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), метод низкотемпературной адсорбции азота, спектроскопия диффузного отражения (ДО), потенциометрическое титрование, а также осадительное титрование и ИК-спектроскопия.

Установлено, что при модифицировании на поверхности силикагеля сорбируется 183.4 мг 6,10-ионена на г силикагеля, а при последующем нанесении слоя СД – 17.5 мг полисахарида на г силикагеля. ЛСТ сорбируется в меньшей степени – 14.4 мг на г силикагеля. Показано, что при использовании 6,10-ионена вместо хитозана в качестве поликатиона количество сорбируемого полианиона на поверхности сорбента в 2 раза больше. Выявлено, что наличие в структуре полислоистого покрытия НЧЗ немного повышает степень закрепления СД на поверхности матрицы (18.7 мг на г силикагеля). Факт модифицирования также подтверждён методом низкотемпературной адсорбции азота: площадь поверхности силикагеля и объём микропор снижается по мере увеличения количества слоев модификаторов.

Методом осадительного титрования постреакционных растворов и промывных вод установлено, что потери исходно сорбированного 6,10-ионена не превышают 5 %. Методом ИК-спектроскопии показано, что не менее 90 % СД сорбируется на поверхности в результате модифицирования и промывки силикагеля. Методами СЭМ и ДО подтверждено модифицирование поверхности матрицы НЧЗ. Наличие анионообменных

свойств у силикагеля, модифицированного 6,10-иононом и крупным полианионом, а также практически полное их отсутствие при двойном модифицировании этими полимерами или включении НЧЗ в структуру ПЭП установлено методом потенциометрического титрования (рис. 1).



**Рис. 1.** Микрофотографии (СЭМ) силикагеля, модифицированного 6,10-иононом, НЧЗ и СД и кривые титрования 1 – силикагеля, модифицированного 6,10-иононом и ЛСТ, 2 – силикагеля, модифицированного 6,10-иононом и СД, 3 – силикагеля, двукратно модифицированного 6,10-иононом и СД, 4 – силикагеля, модифицированного 6,10-иононом, НЧЗ и СД.

### Электрофоретическое исследование полиэлектролитных систем

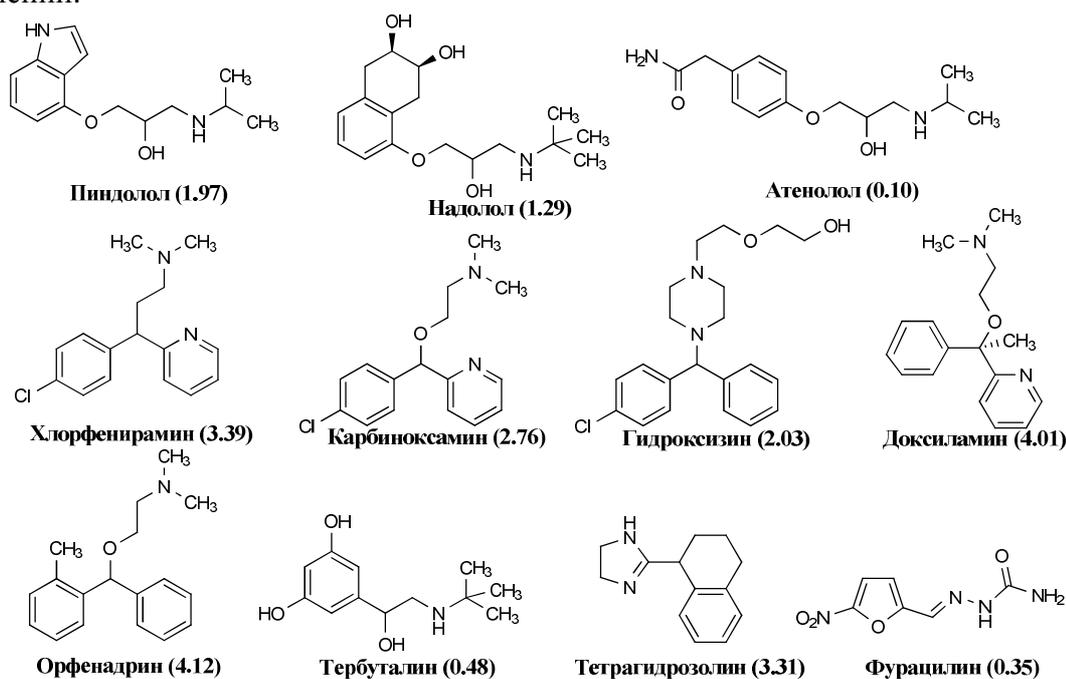
Предварительно влияние ПЭП на поверхности  $\text{SiO}_2$  на селективность разделения азотсодержащих соединений и эффективность всей системы исследовали в варианте КЭ. Кварцевый капилляр динамически послойно модифицировали поликатионом 6,10-иононом и полианионом (СД, СКПХ или ЛСТ соответственно). Получены капилляры, где между слоями 6,10-ионена и полианиона располагали слой НЧЗ, что могло повышать упорядоченность и стабильность покрытия.

Установлено, что модифицирование кварцевого капилляра 6,10-иононом приводит к смене заряда стенок капилляра с отрицательного на положительный и обращению ЭОП, а последующее нанесение слоя полианиона снова приводит к отрицательному заряду стенок капилляра. Таким образом, происходит модифицирование поверхности с образованием ПЭК “ионен-полианион”. Также подтверждено, что НЧЗ, стабилизированные цитратом натрия, несут отрицательный заряд, т.к. не влияют на величину и направление ЭОП, т.е. не сорбируются на стенках капилляра. Установлено, что нанесение только НЧЗ на стенки капилляра, модифицированного, 6,10-иононом, не даёт возможности получить стабильный и пригодный к работе капилляр (так же, как и нанесение одного лишь 6,10-ионена).

При использовании ЛСТ в качестве полианиона в составе ПЭП капилляра в течение нескольких дней ток сильно возрос – работать с данным капилляром не представлялось возможным более семи дней. Азотсодержащие соединения мигрировали практически в одно и то же время, их пики на электрофореграмме фиксировали перед пиком маркера ЭОП. Таким образом, в КЭ ЛСТ оказался неэффективным модификатором матрицы при разделении азотсодержащих соединений. Наиболее удачными для модифицирования с точки зрения стабильности и прецизионности электрофоретической подвижности маркера ЭОП оказались полианионы СКПХ и СД ( $\mu = 1.24 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ ,  $s_r = 0.08$ ;  $\mu = 2.00 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ ,  $s_r = 0.05$  соответственно), которые использовали для предварительных испытаний на примере разделения азотсодержащих фармпрепаратов (рис. 2).

Установлено, что при внесении в структуру полислоя НЧЗ электрофоретическая подвижность маркера ЭОП возрастает, а её прецизионность повышается. Например, в случае покрытия 6,10-ионен–НЧЗ–СД величина  $\mu_{\text{ЭОП}}$  возросла с  $2.00 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$  до  $2.16 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ , а её относительное стандартное отклонение  $s_r$  снизилось с 0.05 до

0.03. Однако это приводит к снижению селективности разделения азотсодержащих соединений.



**Рис. 2.** Структурные формулы изучаемых азотсодержащих соединений (в скобках указан параметр гидрофобности Ханша – logP).

При разделении смеси тетрагидрозолина, пиндолола, тербуталина, надолола и гидроксизина в двух капиллярах с полислойными покрытиями на основе ионена и СД селективности разделения составили 1.22, 1.09, 1.02, 1.09 при отсутствии НЧЗ и 1.12, 1.05, 1.01 и 1.05 в случае ПЭП покрытия с НЧЗ.

При сравнении полученных капилляров установлено, что большее количество соединений с лучшим разрешением, за меньшее время и наибольшей эффективностью капилляра удастся разделить в капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СД. В таком капилляре за 7 мин была разделена пятикомпонентная смесь.

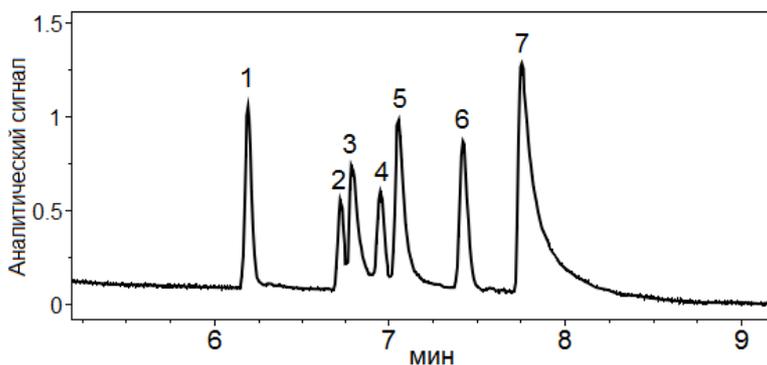
В капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СД, провели электрофоретическое определение в биологической жидкости тетрагидрозолина, карбиноксамина и фурацилина, которые назначаются при лечении аллергического ринита. В качестве фонового электролита (**ФЭ**) выступал 25 мМ цитратный буферный раствор (**ЦБ**) с рН 6.5 и прикладывали напряжение 15 кВ, детектирование осуществляли спектрофотометрически при  $\lambda = 235$  нм. Определение проводили методом добавок, оно занимает 6 мин (табл. 1). Правильность результатов подтверждали методом ВЭЖХ. В качестве НФ использовали сорбент Mightysil C-18, а подвижной фазы (**ПФ**) – смесь (50/50) ацетонитрил / 0.1 % раствор фосфорной кислоты.

**Таблица 1.** Определение тетрагидрозолина, карбиноксамина и фурацилина в моче человека методами КЭ и ВЭЖХ (n = 5, P = 0.95).

КЭ	Содержание, мкг/мл		C <sub>мин</sub> , мкг/мл	диапазон линейности	s <sub>r</sub>	Градуировочная зависимость	R <sup>2</sup>
КЭ	Тетрагидрозолин	5.3±0.8	1.0	2 – 140	0.07	y = (0.167±0.004)x	0.996
	Карбиноксамин	6.6±0.5	0.8	2 – 140	0.03	y = (0.256±0.008)x	0.997
	Фурацилин	0.9±0.2	0.6	2 – 140	0.10	y = (1.7 ±0.6)x + (12.5 ±0.4)	0.997
ВЭЖХ	Тетрагидрозолин	4.9±0.7	0.5	2 – 100	0.08	y = (20.6±0.9)x	0.999
	Карбиноксамин	6.2±0.4	0.5	2 – 100	0.05	y = (7.8±0.2)x	0.999
	Фурацилин	0.6±0.1	0.5	2 – 100	0.08	y = (28.5±0.6)x + (1.9±0.3)	0.999

Установлено, что двукратное нанесение на кварцевый капилляр 6,10-ионена и СД приводит к увеличению электрофоретической подвижности изучаемых веществ и

эффективности капилляра по сравнению с его аналогом, модифицированным этими же соединениями один раз. Смесь из 7 соединений удалось разделить за 8 мин с эффективностью до 225000 ТТ/м (рис. 3)



**Рис. 3.** Электрофореграмма смеси 1 – тетрагидрозолина, 2 – пиндолола, 3 – доксиламина, 4 – хлорфенирамина, 5 – орфенадрина, 6 – надолола и 7 – гидроксизина в капилляре, двукратно модифицированном 6,10-ионеном и СД. ФЭ: 25 мМ ЦБ (рН 6.5).  $U = 8$  кВ.  $\lambda = 235$  нм.

Проведено сравнение электрофоретических характеристик кварцевого и модифицированных капилляров, а также разделения в них фармпрепаратов. На немодифицированном кварцевом капилляре подвижность азотсодержащих соединений достаточно высока (до  $7.02 \times 10^{-4}$  см<sup>2</sup>/(В×с)), времена миграции составляют менее 4 мин и близки между собой, поэтому нам удалось разделить только тетрагидрозолин, пиндолол, надолол, тербуталин и гидроксизин (не все из них разделены до базовой линии). Кроме того, капилляр оказался крайне нестабильным в работе ( $\mu_{ЭОП} = 2.11 \times 10^{-4}$  см<sup>2</sup>/(В×с),  $s_f = 0.82$ ). Модифицированные капилляры имеют преимущества в стабильности работы и прецизионности результатов по сравнению с кварцевым капилляром: например, для капиллярных покрытий с СД  $s_f$  подвижности маркера ЭОП составило 0.05 без НЧЗ и 0.03 в случае включения их в ПЭП на поверхности капилляра.

Вероятно, на отрицательно заряженных стенках кварцевого капилляра происходит заметная адсорбция азотсодержащих соединений, которые в условиях работы несут положительный заряд. На поверхности, модифицированной крупным поликатионом и затем крупным полианионом, такая адсорбция менее возможна, что приводит к усилению аналитического сигнала при использовании капилляров с ПЭП, и позволяет снизить предел обнаружения азотсодержащих соединений.

В капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СД без НЧЗ, можно воспроизводимо разделять энантиомеры азотсодержащих лекарственных препаратов с хорошим разрешением пиков и за короткое время (до 3 мин). Например, получено разделение энантиомеров тетрагидрозолина с  $R_s$  1.2 и ателолола с  $R_s$  0.8 (содержание СД в ФЭ составило 0.1 %). Система с полислойным капилляром позволяет с более высоким разрешением разделить энантиомеры большего количества соединений. В ФЭ с содержанием СД 1.08 % были разделены энантиомеры доксиламина ( $R_s$  1.0), гидроксизина ( $R_s$  0.9) и тетрагидрозолина ( $R_s$  0.9).

Полученные данные по исследованию ПЭП на основе 6,10-ионена, СД, СКПХ, ЛСТ и НЧЗ позволили нам сделать вывод о перспективности их применения при создании новых модифицированных силикагелей для хроматографии.

### Хроматографическое исследование полиэлектролитных систем

На основании полученных данных методом КЭ для хроматографических исследований были выбраны полиэлектролитные системы с принципиально разными модификаторами – СД и ЛСТ. По методике послойного нанесения в работе получены следующие стационарные фазы для ВЭЖХ:

- Сорбент-1 – силикагель, модифицированный 6,10-ионеном;
- Сорбент-2 – силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и ЛСТ;
- Сорбент-3 – силикагель, модифицированный хитозаном и ЛСТ;
- Сорбент-4 – силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и СД;
- Сорбент-5 – силикагель, двукратно модифицированный 6,10-ионеном и СД;
- Сорбент-6 – силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, НЧЗ и СД.

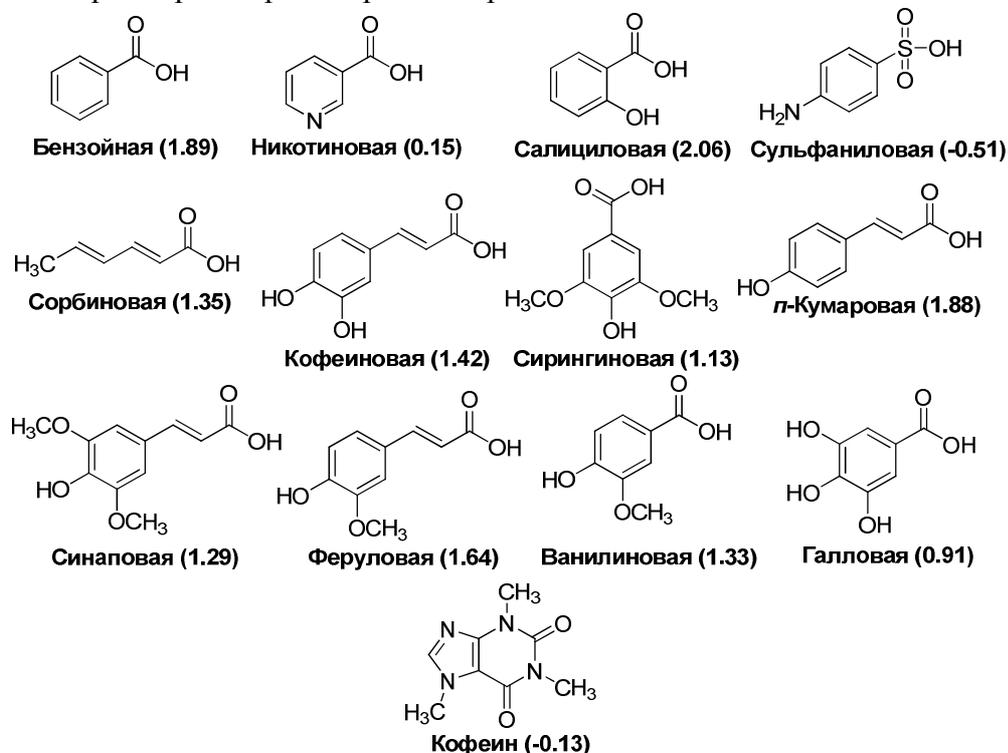
Для оценки способности наших сорбентов к ионному обмену, изучали удерживание на них неорганических анионов (хлорид, нитрат и сульфат) и катионов (натрий, калий, кальций). Для элюирования анионов использовали гидрофталатный буферный раствор (ГФБ) (рН 4.3) в диапазоне концентраций 1.5 – 9.0 мМ. Мы наблюдали стандартный порядок элюирования анионов. Для всех сорбентов удерживание анионов ослаблялось с ростом концентрации буферного раствора, на Сорбентах-1 и -2 они удерживались сильнее, чем на Сорбентах 4 – 6, и не удерживались на Сорбенте-3.

При построении зависимостей фактора удерживания неорганических ионов от концентрации ГФБ в логарифмических координатах установлено, что для всех сорбентов наблюдается отклонение величины тангенса угла наклона прямой от теоретических значений для однозарядных анионов (-1) хлорида и нитрата и двухзарядного сульфат-иона (-0.5). Следовательно, электростатические взаимодействия сорбат-сорбент не являются доминирующими в механизме удерживания на наших сорбентах.

Для элюирования катионов использовали раствор бензимидазола (рН 4.1) в таком же диапазоне концентраций. Катионы не удерживались на всех сорбентах и элюировались с мертвым временем. Таким образом, полученные сорбенты обладают лишь анионообменными свойствами. Вероятно, способность к анионному обмену связана с существованием остаточных положительно заряженных центров 6,10-ионена на поверхности сорбентов. Не исключено, что способность к катионному обмену могла бы проявиться при значительно более высоких рН, когда сульфогруппы СД диссоциированы в большей степени.

#### Хроматографическое поведение фенолкарбоновых кислот на полиэлектролитных сорбентах для ВЭЖХ, содержащих лигносульфонат натрия

Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и ЛСТ (Сорбент-2) – сорбент, впервые предложенный в нашей лаборатории, на нем изучено разделение ФКК (рис. 4). Для изучения хроматографического поведения кислот на нём в качестве ПФ использовали смесь ацетонитрил – раствор электролита с различным их соотношением.



**Рис. 4.** Структурные формулы изучаемых фенолкарбоновых кислот и кофеина (в скобках указан параметр гидрофобности Ханша – logP).

При изучении влияния содержания электролита в ПФ на удерживание ФКК и кофеина, в качестве электролитов ПФ выбрали перхлорат и сульфат натрия. Работали в

диапазоне концентраций 1.5 – 15 мМ для перхлората натрия и 1.5 – 5.5 мМ для сульфата натрия при содержании ацетонитрила в ПФ 10 %. Установлено, что с увеличением содержания электролитов в ПФ снижаются времена удерживания ФКК, повышается эффективность колонки. Ввиду большего заряда, сульфат-ион обладает большей элюирующей силой, поэтому времена удерживания кислот и селективность их разделения заметно снизились.

Зависимость  $\log k' - \log c(\text{электролита})$  для сорбиновой, ванилиновой и галловой кислот описывается прямолинейной зависимостью с хорошими коэффициентами корреляции. При элюировании перхлорат-ионом тангенс угла наклона зависимостей для кислот близок к 0.7 и существенно отличается от теоретического значения (-1), при элюировании сульфат-ионом он близок к теоретическому значению (-0.5) лишь для ванилиновой кислоты.

На колонке, заполненной Сорбентом-1, где на поверхность силикагеля нанесён только слой поликатиона 6,10-ионена, времена удерживания ФКК ниже, чем на Сорбенте-2. Меняется также порядок элюирования: большее удерживание сорбиновой и бензойной кислот и меньшее для галловой и никотиновой. Стоит отметить, что зависимость  $\log k' - \log c(\text{электролита})$  для ФКК на Сорбенте-1 не является линейной. Описанные отличия свидетельствуют об изменении вкладов ионообменных, адсорбционных и гидрофобных взаимодействий сорбат-сорбент в механизм удерживания ФКК при внесении слоя ЛСТ на поверхность силикагеля.

Удерживание исследованных ФКК на Сорбенте-2 ослабляется с ростом рН в диапазоне 4.2 – 6.8 (табл. 2), при этом увеличивается доля анионной формы кислот в растворе. Удерживание кофеина, который присутствует лишь в незаряженной форме, не изменяется.

**Таблица 2.** Влияние рН на удерживание кислот на колонке (150 мм×4.6 мм), заполненной Сорбентом-2. ПФ: ацетонитрил / 5.0 мМ NaClO<sub>4</sub>(10:90).

	Сорбиновая кислота	Бензойная кислота	Галловая кислота	Салициловая кислота
<b>рН</b>	<b>k'</b>			
<b>4.20</b>	15.71	15.38	17.25	50.32
<b>5.65</b>	6.46	8.76	14.90	20.90
<b>6.80</b>	6.04	8.12	13.18	19.96
	<b>α</b>			
<b>4.20</b>		1.02	1.10	2.92
<b>5.65</b>		1.36	1.70	1.40
<b>6.80</b>		1.34	1.62	1.51

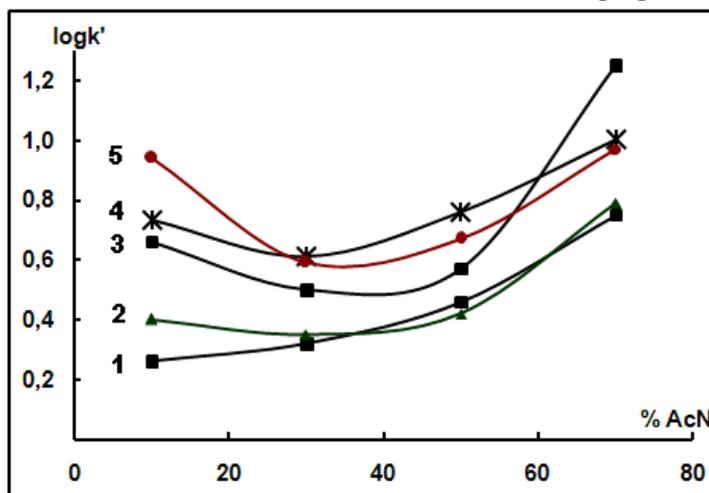
Для сравнения – влияние рН раствора электролита в ПФ на удерживания аналитов в случае Сорбента-1 неоднозначно: с ростом рН удерживание никотиновой, галловой и сорбиновой кислот усиливается, а бензойной и салициловой – ослабевает.

Таким образом, удерживание органических кислот на Сорбенте-2 нельзя описать только ионообменными взаимодействиями, хотя их вклад в механизм удерживания значителен.

Зависимость фактора удерживания кислот (за исключением сорбиновой кислоты) от содержания ацетонитрила для Сорбента-2 проходит через минимум в диапазоне 30 – 50% органического модификатора в ПФ (рис. 5), что характерно для гидрофильной хроматографии.

Для оценки вклада в механизм удерживания гидрофильных взаимодействий мы сопоставили факторы удерживания ФКК и их параметры гидрофобности Ханша (рис. 6). С ростом параметра гидрофобности гидрофильность соединения уменьшается, а, следовательно, в гидрофильной хроматографии уменьшаются факторы удерживания. Такая закономерность соблюдается лишь в отдельных случаях: ряды кислот галловая – сиригиновая – сорбиновая и кофеиновая – феруловая – бензойная. Таким образом, удерживание ФКК на Сорбенте-2 обусловлено рядом факторов: помимо ионообменных

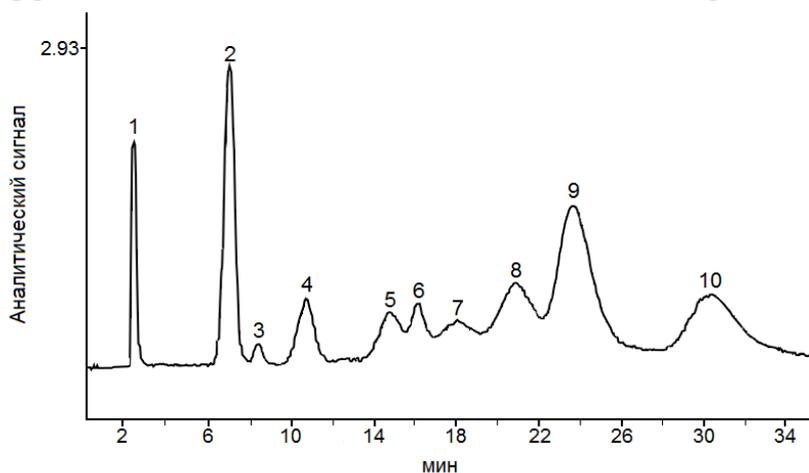
взаимодействий следует учитывать и адсорбционные (например, за счет образования водородных связей и диполь-дипольных взаимодействий), гидрофильные и гидрофобные.



**Рис. 5.** Влияние содержания ацетонитрила на удерживание ФКК на Сорбенте-2. 1 – сорбиновая, 2 – бензойная, 3 – галловая, 4 – феруловая, 5 – ванилиновая кислоты.

При замене поликатиона 6,10-ионена на хитозан (Сорбент-3) удерживание ФКК заметно ослабло, но порядок элюирования аналитов и характер влияния растворителя и pH не изменился. Эффективность колонки при использовании хитозана меньше, чем при использовании 6,10-ионена, что не позволяет разделять больше 4 – 5 компонентов

На Сорбенте-2 при элюировании смесью ацетонитрил / 5 мМ NaClO<sub>4</sub> (pH 6.80) (70:30) была разделена десятикомпонентная смесь с селективностью до 1.47 эффективностью колонки до 13000 ГТ/м за 33 мин (рис. 6).



**Рис. 6.** Разделение на Сорбенте-2 1 – кофеина и кислот: 2 – сорбиновой, 3 – бензойной, 4 – ванилиновой, 5 – галловой, 6 – салициловой, 7 – синаповой, 8 – феруловой, 9 – *n*-кумаровой, 10 – кофеиновой. ПФ: AcN / 5 мМ NaClO<sub>4</sub> (pH 6.80) (70:30). Концентрации соединений 50 мкг/мл.

Таким образом, ПЭП на основе 6,10-ионена и ЛСТ позволяет получить гидрофильную стационарную фазу для ВЭЖХ, селективную по отношению к ФКК. Сложное строение молекул ЛСТ, видимо, не позволяет получить однородное ПЭП на поверхности силикагеля и высокую эффективность колонки.

#### **Хроматографическое поведение фенолкарбоновых кислот на полиэлектролитных сорбентах для ВЭЖХ, содержащих сульфат декстрана**

Для изучения хроматографического поведения кислот на сорбентах с СД (Сорбенты 4 – 6) в качестве ПФ использовали смесь органический модификатор–буферный раствор. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при длинах волн 254 и 235 нм. Изучали влияние pH буферного раствора, его концентрации, концентрации раствора электролита, природы и содержания органического растворителя в ПФ на факторы удерживания ФКК.

*Силикагель, модифицированный 6,10-иононом и сульфатом декстрана (Сорбент-4)*

На основе предварительных исследований методом КЭ в качестве буферного раствора выбрали ЦБ и фосфатный буферный раствор (ФБ). Концентрацию буферного раствора варьировали в диапазоне 15 – 35 мМ при содержании органического растворителя метанола – 10%. Это позволило получить приемлемые величины факторов удерживания (1.01 – 3.11). Величину рН буферного раствора поддерживали на уровне 6.5, поскольку в таких условиях кислоты находятся в форме анионов так же, как и сульфогруппы СД. Значительного влияния концентрации ЦБ на факторы удерживания ФКК не наблюдали. Для дальнейшей работы выбрали концентрацию 15 мМ.

При выборе органического растворителя исследовали ацетонитрил, метанол, изопропанол и тетрагидрофуран (ТГФ) (табл. 3). В качестве ПФ использовали водно-органическую смесь состава: 15 мМ ЦБ (рН 6.5) / органический растворитель (95:5).

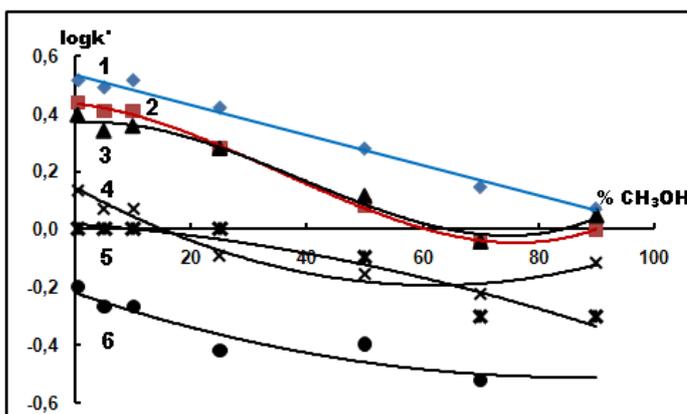
**Таблица 3.** Влияние природы органического растворителя в составе ПФ на удерживание, селективность разделения ФКК и эффективность колонки с Сорбентом-4.

Кислота	Органический растворитель											
	Ацетонитрил			Метанол			ТГФ			Изопропанол		
	к'	N/м	$\alpha$	к'	N/м	$\alpha$	к'	N/м	$\alpha$	к'	N/м	$\alpha$
Кофеиновая	0.82	3000	1.15	3.11	6000	1.07	0.93	2000	1.13	0.72	2000	1.17
Синаповая	0.71	3000	1.01	2.92	8000	1.16	0.82	2000	1.11	0.62	2000	1.20
Феруловая	0.70	1000	1.17	2.51	10000	1.14	0.74	2000	1.17	0.50	2000	1.00
<i>n</i> -Кумаровая	0.60	3000	2.50	2.20	10000	1.86	0.63	2000	2.03	0.50	3000	5.00
Галловая	0.24	1000	1.14	1.18	7000	1.17	0.31	2000	1.00	0.13	2000	1.00
Ванилиновая	0.21	1000		1.01	12000		0.30	2000		0.12	2000	

Удерживание кислот усиливается, а элюирующая способность растворителей снижается в ряду изопропанол – ацетонитрил – ТГФ – метанол. Это не коррелирует с элюотропными рядами снижения элюирующей силы растворителей как для ОФ ВЭЖХ (изопропанол – ТГФ – метанол – ацетонитрил) так и для НФ ВЭЖХ, что указывает на неоднозначную смешанную природу Сорбента-4.

При использовании метанола в составе ПФ для большинства кислот достигаются максимальные значения эффективности колонки с Сорбентом-4, а также появляется возможность разделения смесей ФКК. Он был выбран для дальнейшей работы.

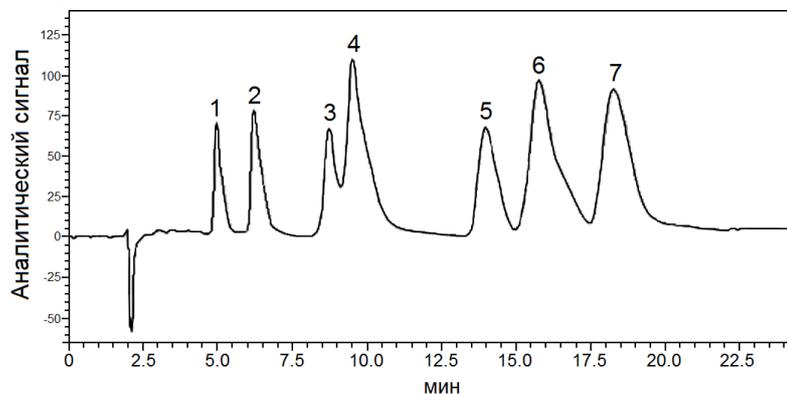
Содержание метанола в ПФ варьировали от 0.5 до 90 % (рис. 7). Максимальное удерживание для большинства кислот наблюдали при содержании метанола 0.5 %, минимальное – при 90 %. С ростом содержания метанола удерживание ослабляется, что характерно для ОФ ВЭЖХ. Однако для феруловой и *n*-кумаровой кислот наблюдается небольшой минимум при 70 % метанола в ПФ (напоминает зависимость, характерную для гидрофильной хроматографии). Максимальные значения эффективности колонки при удовлетворительной селективности разделения кислот получены при 10% метанола в ПФ.



**Рис. 7.** Влияние содержания метанола в ПФ на удерживание ФКК на Сорбенте-4. Кислоты: 1 – кофеиновая, 2 – феруловая, 3 – *n*-кумаровая, 4 – сирингиновая, 5 – салициловая, 6 – никотиновая. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/ CH<sub>3</sub>OH. F = 1 мл/мин.  $\lambda$  = 254 нм.

Величину pH буферного раствора варьировали в диапазоне 4.8 – 7.6. Факторы удерживания для большинства кислот с ростом pH буферного раствора уменьшаются. Наилучшую селективность по отношению к большинству ФКК наблюдали при pH 4.8 (до 1.52). Для дальнейшей работы был выбран ФБ с pH 4.8.

Лучшее разделение ФКК на Сорбенте-4 получили при элюировании ПФ 15 мМ ФБ (pH 4.8) / метанол (90:10), хроматограмма смеси семи кислот показана на рис. 8.



**Рис. 8.** Разделение кислот на Сорбенте-4 (15 мкг/мл): 1 – сорбиновая, 2 – никотиновая, 3 – ванилиновая, 4 – галловая; 5 – *n*-кумаровая, 6 – феруловая, 7 – кофеиновая. ПФ: 15 мМ ФБ (pH 4.8) / метанол (90:10). F = 0.5 мл/мин.  $\lambda = 254$  нм.

При оценке влияния концентрации перхлората натрия в ПФ на удерживание кислот в качестве ПФ использовали смесь метанол – водный раствор перхлората натрия (90:10). Концентрацию электролита варьировали в диапазоне 1.5 – 7 мМ при pH 4.6. На примере сорбиновой, ванилиновой и галловой кислот установлено, что с ростом концентрации электролита в ПФ удерживание кислот ослабляется. Видимо, ионные взаимодействия сорбат-сорбент вносят некоторый вклад в удерживание данных кислот на Сорбенте-4.

Вклад в механизм удерживания ФКК гидрофобных взаимодействий подтверждается тем, что удерживание многих кислот заметно ослабляется при увеличении содержания метанола в ПФ (рис. 7). Наконец гидрофильно-гидрофобную неоднозначную природу сорбента подтверждает сопоставление порядка элюирования ФКК с их параметрами гидрофобности. Например, фактор удерживания на Сорбенте-4 возрастает в ряду кислот салициловая < *n*-кумаровая < феруловая < кофеиновая. В этом же ряду уменьшается параметр гидрофобности Ханша и растёт гидрофильность соединений. В то же время удерживание усиливается в ряду никотиновая < галловая < сирингиновая < синаповая < кофеиновая, что коррелирует с ростом их гидрофобности.

Покрывание силикагеля ПЭП ионен–СД позволило получить более селективный по отношению к ФКК сорбент, чем в случае ПЭП ионен–ЛСТ, а также более эффективную хроматографическую колонку. Из колонки, заполненной силикагелем, модифицированным 6,10-ионеном и СД, соединения элюируются быстрее, а пики на хроматограммах разрешены лучше, поэтому исследования продолжили на силикагеле, двукратно модифицированном слоями 6,10-ионена и СД.

#### *Силикагель, двукратно модифицированный 6,10-ионеном и сульфатом декстрана (Сорбент-5)*

Установлено, что с ростом концентрации ЦБ усиливается удерживание ФКК на Сорбенте-5, а селективность их разделения практически не изменяется. Для дальнейшей работы была выбрана концентрация 15 мМ.

Оценку влияния природы растворителя на удерживание кислот проводили с использованием тех же растворителей, что и в случае Сорбента-4. В случае Сорбента-5 для всех растворителей, кроме метанола, удерживание ФКК сильнее, чем на Сорбенте-4 (табл. 4). Для дальнейших исследований в качестве органического модификатора ПФ выбрали ацетонитрил как компромисс между удовлетворительной селективностью разделения кислот и эффективностью колонки.

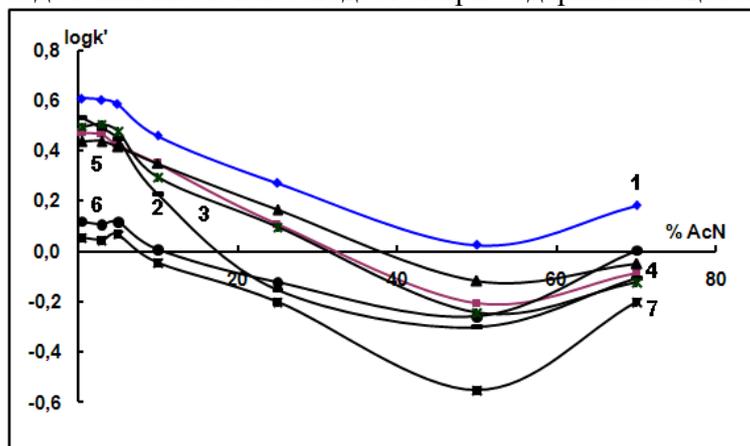
При изменении pH в диапазоне 4.8 – 7.6 фактор удерживания практически для всех соединений снижается с ростом pH, как и для Сорбента-4. Когда кислоты в большей степени диссоциированы, они слабее удерживаются на данном сорбенте. Это наиболее

выражено для кофеиновой, феруловой, *n*-кумаровой, синаповой, ванилиновой и салициловой кислот. Мы выбрали ФБ с рН 4.8 для дальнейшей работы.

**Таблица 4.** Влияние природы органического растворителя на удерживание, селективность разделения ФКК и эффективность колонки с Сорбентом-5. ПФ: растворитель / 15 мМ ЦБ (рН 6.5) (10:90).

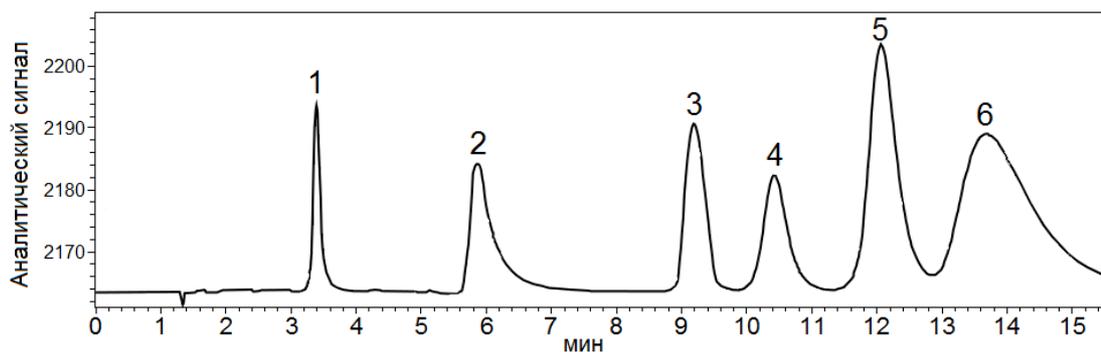
Кислота	Органический растворитель											
	Ацетонитрил			Метанол			ТГФ			Изопропанол		
	$k'$	N/м	$\alpha$	$k'$	N/м	$\alpha$	$k'$	N/м	$\alpha$	$k'$	N/м	$\alpha$
Кофеиновая	2.59	16000	1.25	2.83	11000	1.10	3.92	10000	1.40	1.79	12000	1.05
Синаповая	2.08	19000	1.09	2.58	9000	1.10	2.67	13000	1.02	1.70	13000	1.16
Феруловая	1.90	14000	1.11	2.35	11000	1.69	2.81	12000	1.03	1.47	12000	1.07
<i>n</i> -Кумаровая	1.71	20000	2.41	1.39	23000	1.20	2.75	15000	2.38	1.37	21000	1.19
Галловая	0.71	15000	1.18	1.16	11000	1.22	1.12	12000	1.23	1.15	11000	1.21
Ванилиновая	0.60	17000		0.95	15000		0.91	18000		0.95	15000	

Установлено, что зависимость логарифма фактора удерживания ФКК кислот от содержания ацетонитрила проходит через минимум (рис. 9). Наибольшая селективность разделения кислот наблюдается при содержании ацетонитрила в ПФ 5 %.



**Рис. 9.** Зависимость факторов удерживания ФКК от содержания ацетонитрила в ПФ на Сорбенте-5. Кислоты: 1 – кофеиновая, 2 – синаповая, 3 – салициловая, 4 – феруловая, 5 – *n*-кумаровая, 6 – галловая, 7 – ванилиновая. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5) / AcN.

Разделение ФКК на Сорбенте-5 проводили при элюировании ПФ 15 мМ ФБ (рН 4.8) / ацетонитрил (95:5). На Сорбенте-5 была разделена шестикомпонентная смесь за 15 мин с селективностью до 1.88 и эффективностью колонки до 26000 ТТ/м (рис. 10).



**Рис. 10.** Разделение кислот на Сорбенте-5 (15 мкг/мл): 1 – сорбиновая, 2 – ванилиновая, 3 – синаповая, 4 – *n*-кумаровая, 5 – кофеиновая, 6 – феруловая. ПФ: 5 % ацетонитрила / 15 мМ ФБ (рН 4.8).  $F = 1$  мл/мин.  $\lambda = 254$  нм.

Значимого влияния концентрации электролита перхлората натрия в ПФ на удерживание кислот не наблюдали. Вероятно, вклад ионного обмена во взаимодействия сорбат-сорбент на Сорбенте-5 отсутствует.

Неоднозначна взаимосвязь между порядком элюирования кислот и их гидрофобностью. В ряду кислот никотиновая – сорбиновая – бензойная – салициловая

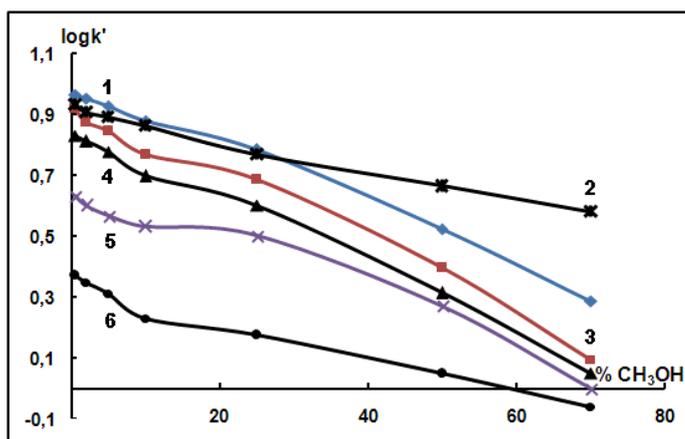
удерживание возрастает с ростом гидрофобности, что характерно для обращенно-фазового режима хроматографии. В то же время в ряду кислот салициловая – *n*-кумаровая – феруловая – кофеиновая удерживание возрастает с ростом гидрофильности (снижением параметра гидрофобности). Данная НФ, вероятно, относится к сорбентам смешанного типа, где удерживание кислот в большей степени определяется гидрофильными, гидрофобными и адсорбционными взаимодействиями сорбат-сорбент.

*Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и сульфатом декстрана (Сорбент-6)*

Заметного влияния концентрации ЦБ на удерживание кислот на Сорбенте-6 не наблюдали, в дальнейших исследованиях использовали 15 мМ ЦБ. С ростом pH буферного раствора удерживание кислот ослаблялось. Наиболее высокая эффективность колонки (до 18000 ТТ/м) и селективность разделения (до 1.66) получена при pH 4.8.

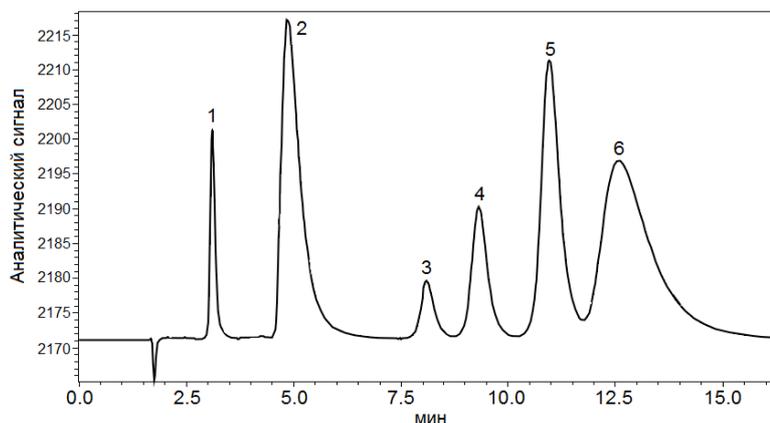
При изучении влияния природы органического растворителя на удерживание ФКК установлено, что удерживание кислот возрастает, а элюирующая способность растворителя снижается в ряду ацетонитрил – изопропанол – метанол. Лучшее разделение кислот, благодаря более высокой эффективности колонки, получили при использовании ацетонитрила как органического модификатора ПФ.

При увеличении содержания органического растворителя в ПФ, наблюдали уменьшение факторов удерживания соединений, т.е. зависимость, характерную для обращенно-фазового режима ВЭЖХ (рис. 11). При 10 % метанола в ПФ наблюдали хорошую селективность разделения ФКК при наибольшей эффективности колонки.



**Рис. 11.** Влияние содержания метанола в ПФ на удерживание кислот на Сорбенте-6. Кислоты: 1 – кофеиновая, 2 – *n*-кумаровая, 3 – салициловая, 4 – феруловая, 5 – синаповая, 6 – ванилиновая. ПФ: ЦБ (pH 4.8) / метанол.

По результатам проведенных исследований для разделения кислот на Сорбенте-6 выбрали ПФ 15 мМ ЦБ (pH 4.8) / ацетонитрил (90:10). Хроматограмма смеси шести ФКК с селективностью до 1.76 и эффективностью колонки до 21000 ТТ/м показана на рис. 12.



**Рис. 12.** Разделение кислот на Сорбенте-6 (15 мкг/мл): 1 – сорбиновая, 2 – галловая, 3 – синаповая, 4 – феруловая, 5 – *n*-кумаровая, 6 – кофеиновая. ПФ: 15 мМ ЦБ (pH 4.8) / ацетонитрил (90:10). F = 1 мл/мин. λ = 254 нм.

При оценке влияния концентрации электролита в ПФ на удерживание кислот не удалось выявить чёткой закономерности, к тому же влияние очень слабое. Если электростатические взаимодействия сорбат-сорбент вносят вклад в механизм удерживания ФКК, то очень незначительный.

В ряду кислот никотиновая – сорбиновая – бензойная – салициловая удерживание возрастает с ростом гидрофобности, для остальных кислот такая зависимость не очевидна. Следовательно, вклад гидрофобных взаимодействий сорбат-сорбент в удерживание кислот на Сорбенте-6 является существенным, но гидрофильные и адсорбционные взаимодействия сорбат-сорбент имеют место. Данная ПФ проявляет смешанную природу.

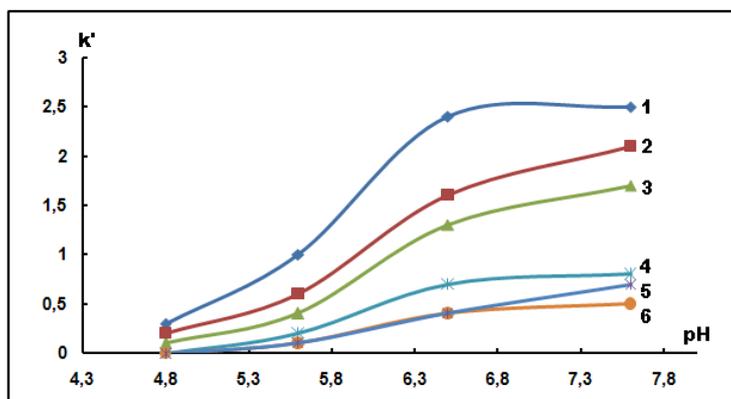
### Хроматографическое поведение фармакологически активных азотсодержащих соединений на полиэлектролитных сорбентах для ВЭЖХ, содержащих сульфат декстрана

Все изучаемые азотсодержащие препараты, кроме кофеина, содержат неароматический атом азота. В водных растворах при  $pH \leq 7.8$  они существуют преимущественно в протонированной форме. Однако добавка в ПФ органического растворителя снижает  $pK_a$  соединений, что увеличивает долю молекулярной формы.

#### Силикагель, модифицированный 6,10-иононом и сульфатом декстрана (Сорбент-4)

При оценке влияния концентрации ЦБ на удерживание препаратов на Сорбенте-4 значимого влияния не наблюдали. Концентрацию буферного раствора 15 мМ выбрали для дальнейшей работы.

Влияние pH на удерживание препаратов изучали в интервале 4.8 – 7.6. Наблюдали увеличение факторов удерживания сорбатов с ростом pH буферного раствора (рис. 13).

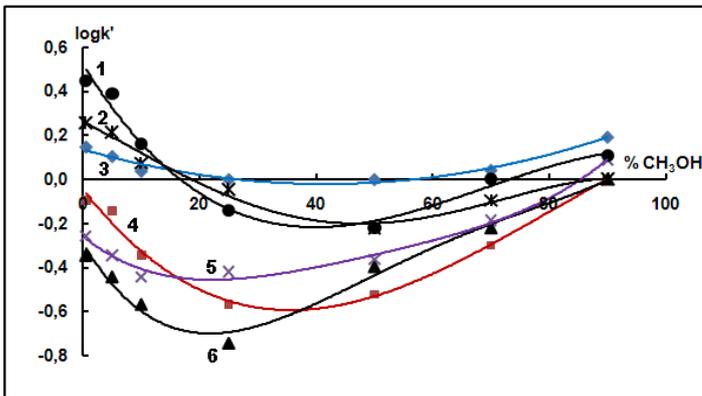


**Рис. 13.** Влияние pH буферного раствора в ПФ на удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-4. Вещества: 1 – гидроксизин, 2 – орфенадрин, 3 – пиндолол, 4 – тетрагидрозолин, 5 – тербуталин, 6 – атенолол. ПФ: 15 мМ буферный раствор/метанол (95:5).  $F = 1$  мл/мин.  $\lambda = 235, 270$  нм.

Удерживание азотсодержащих соединений ослаблялось, а элюирующая способность растворителей возрастала в ряду ацетонитрил – ТГФ – метанол – изопропанол. Поскольку селективность разделения соединений и эффективность колонки при использовании метанола наибольшие, его выбрали в качестве органического модификатора ПФ при разделении препаратов на Сорбенте-4.

При оценке влияния содержания органического растворителя на удерживание веществ концентрацию метанола варьировали в интервале 0.5 – 90 об.% (рис. 14). Вид зависимости  $\log k' - \% \text{CH}_3\text{OH}$  характерен для гидрофильной хроматографии. Лучшие коэффициенты селективности (до 1.75) были получены при содержании метанола 5%.

Разделение препаратов на Сорбенте-4 проводили при элюировании ПФ 15 мМ ЦБ (pH 6.5) / метанол (95:5). При высокой селективности сорбента по отношению к этому классу соединений низкая эффективность колонки не позволила разделить даже пятикомпонентную смесь.



**Рис. 14.** Влияние содержания метанола в ПФ на удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-4. Вещества: 1 – доксиламин, 2 – орфенадрин; 3 – пиндолол; 4 – тетрагидрозолин; 5 – тербуталин; 6 – атенолол. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5) / метанол (95:5).

На примере наиболее удерживаемых гидроксизина, орфенадрина, пиндолола и тетрагидрозолина установлено, что удерживание азотсодержащих соединений ослабляется с ростом концентрации электролита в ПФ. Вероятно, вклад электростатических взаимодействий сорбат-сорбент в механизм удерживания фармпрепаратов небольшой.

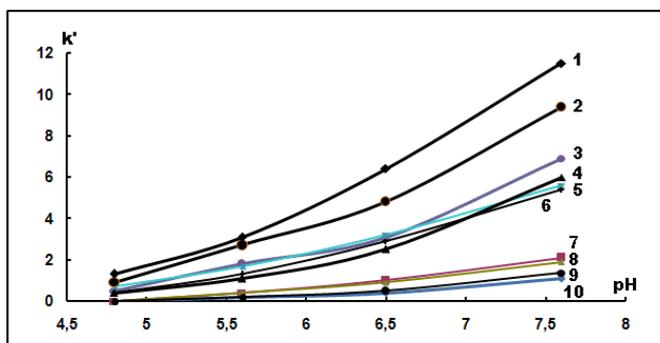
По аналогии с ФКК рассмотрели связь между параметром гидрофобности и удерживанием азотсодержащих соединений. В большинстве случаев с ростом гидрофобности соединения удерживаются слабее. Это подтверждает высокий вклад гидрофильных взаимодействий в механизм удерживания полярных соединений на Сорбенте-4. Таким образом, при очевидно сложной природе Сорбента-4 удерживание полярных соединений на нём описывается преимущественно закономерностями гидрофильной хроматографии.

*Силикагель, двукратно модифицированный 6,10-иономом и сульфатом декстрана (Сорбент-5)*

Факторы удерживания большинства соединений на Сорбенте-5 снижаются при увеличении концентрации буферного раствора, лучшая селективность разделения получена при его концентрации 15 мМ. Факторы удерживания азотсодержащих соединений с ростом рН возрастают (рис. 15). Наибольшая селективность разделения (до 1.72) и эффективность колонки (до 70000 ТТ/м) были получены при рН 6.5.

Удерживание надолола, атенолола, тербуталина, орфенадрина и пиндолола возрастает, а элюирующая сила растворителей снижается в ряду ТГФ – изопропанол – метанол – ацетонитрил, что почти соответствует ряду увеличения полярности этих растворителей. Это говорит о существенном вкладе адсорбционных взаимодействий сорбат-сорбент в удерживание изученных соединений.

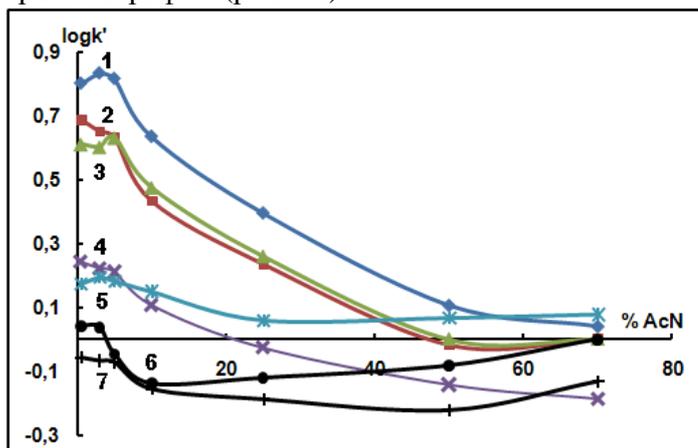
Для разумного времени хроматографического разделения с учётом компромисса между хорошей селективностью разделения и эффективностью колонки для дальнейшей работы выбрали ацетонитрил.



**Рис. 15.** Влияние рН буферного раствора в ПФ на удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-5. Вещества: 1 – хлорфенирамин, 2 – карбиноксамин, 3 – доксиламин, 4 – гидроксизин, 5 – орфенадрин, 6 – пиндолол, 7 – тетрагидрозолин, 8 – тербуталин, 9 – атенолол, 10 – надолол. ПФ: 15 мМ буферный раствор /ацетонитрил (90:10).

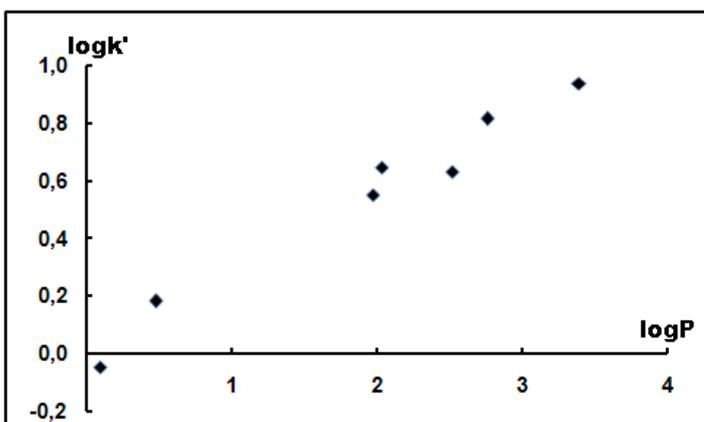
Факторы удерживания азотсодержащих фармпрепаратов, за исключением атенолола и доксиламина, уменьшаются с ростом содержания ацетонитрила от 10 до 70%, что характерно для ОФ ВЭЖХ. Для доксиламина и атенолола такая зависимость

описывается кривой с небольшим минимумом, характерной для гидрофильной хроматографии (рис. 16).



**Рис. 16.** Влияние содержания ацетонитрила в ПФ на удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-5. Вещества: 1 – карбиноксамин, 2 – доксиламин, 3 – орфенадрин, 4 – тетрагидрозолин, 5 – тербуталин, 6 – ателолол, 7 – надолол. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5) / ацетонитрил.

Для разделения азотсодержащих соединений на Сорбенте-5 мы рекомендуем ПФ 15 мМ ЦБ (рН 6.5) / ацетонитрил (90:10). Смесь надолола, ателолола, доксиламина, орфенадрина и пиндолола была разделена с хорошим разрешением пиков за 10 мин, эффективность колонки достигала 19000 ТТ/м.



**Рис. 17.** Зависимость факторов удерживания азотсодержащих соединений на Сорбенте-5 от их параметров гидрофобности.

О весомом вкладе гидрофобных взаимодействий сорбат-сорбент в механизм удерживания на Сорбенте-5 свидетельствует то, что препараты удерживаются сильнее с ростом их гидрофобности (рис. 17). Сорбент-5 можно отнести к сорбентам смешанного типа: в удерживание на нём полярных соединений вносят вклад как гидрофильные так и гидрофобные взаимодействия.

*Силикагель, модифицированный ,β10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и сульфатом декстрана (Сорбент-6)*

Рассмотрим его отличия от Сорбента-4 и Сорбента-5, т.е. влияние слоя НЧЗ на хроматографические параметры модифицированного силикагеля. Удерживание азотсодержащих соединений усилилось по сравнению с Сорбентом-4 и ослабилось по сравнению с полислойным Сорбентом-5. Эффективность колонки в присутствии НЧЗ в модифицирующем слое увеличилась, причем, отличие этого параметра от колонки, заполненной Сорбентом-4, существенно, а Сорбентом-5 – незначительно.

Установлено, что удерживание азотсодержащих соединений ослабляется при повышении концентрации ЦБ с 15 до 25 мМ, при этом снижается и селективность разделения большинства веществ, поэтому выбрали 15 мМ буферный раствор.

С ростом рН буферного раствора в ПФ удерживание азотсодержащих препаратов на Сорбенте-6 возрастает, как и для всех НФ с СД. Наибольшую эффективность колонки (до 43000 ТТ/м) и селективность разделения (до 1.77) наблюдали при рН 6.5.

Удерживание изученных веществ ослабляется, а элюирующая сила растворителей растёт в ряду метанол – изопропанол – ацетонитрил. Факторы удерживания всех изученных азотсодержащих соединений снижаются при увеличении содержания

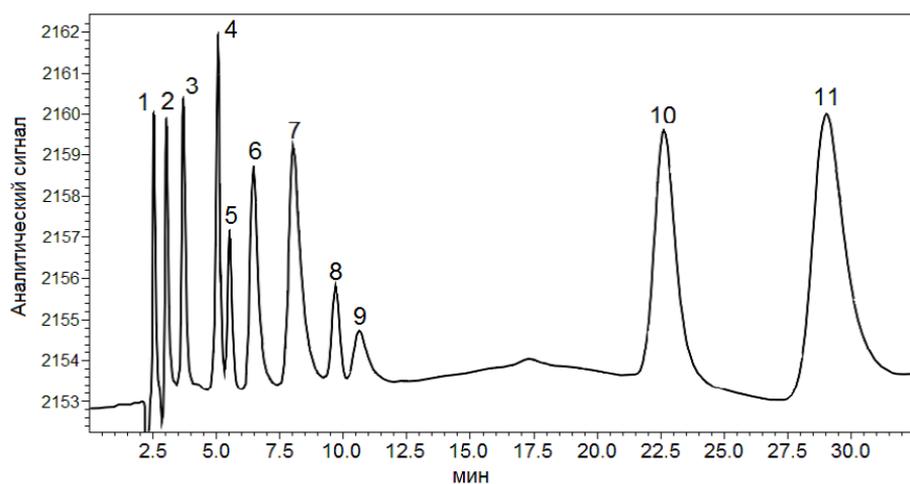
органического растворителя в ПФ. Полученные закономерности соответствует режиму ОФ ВЭЖХ. Содержание органического модификатора 5 % выбрали для разделения соединений данного класса как компромисс между хорошей селективностью разделения (до 1.54) и высокой эффективностью колонки (до 32000 ТТ/м).

Для разделения азотсодержащих соединений на Сорбенте-6 рекомендуем ПФ 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/ацетонитрил (95:5), была разделена восьмикомпонентная смесь.

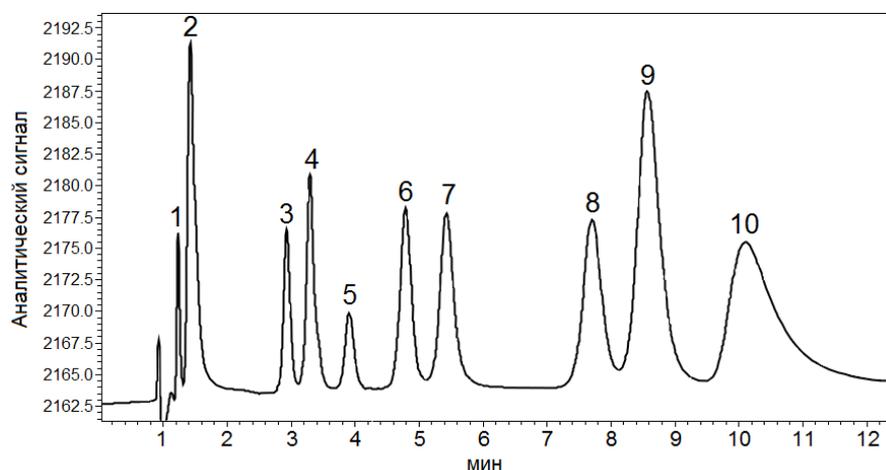
Концентрация  $\text{NaClO}_4$  в ПФ значимого влияния на удерживание большинства веществ не оказывает, что может свидетельствовать об отсутствии электростатических взаимодействий сорбат-сорбент на Сорбенте-6. Удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-6 в большинстве случаев возрастает с увеличением их параметра гидрофобности. Таким образом, Сорбент-6 принадлежит к классу смешанного типа, где гидрофобные взаимодействия преобладают над гидрофильными.

Можно сделать вывод, что внесение в структуру ПЭП НЧЗ имеет плюсы и минусы. Уменьшается время разделения соединений и получена хорошая эффективность колонки. Но в ряде случаев уменьшается селективность разделения и разрешение пиков по сравнению с Сорбентом-4 и Сорбентом-5.

Для разделения полярных органических соединений мы рекомендуем Сорбент-5 и Сорбент-6. Помимо экспрессности и хорошей селективности разделения важным их достоинством является возможность одновременного разделения ФКК и азотсодержащих соединений в смеси, как показано на рис. 18.

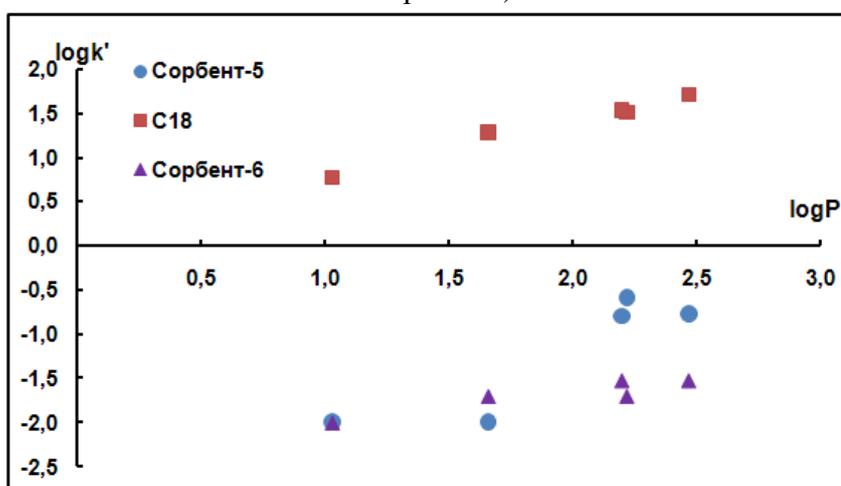


**Рис. 18а.** Разделение ФКК и азотсодержащих соединений (0.32 – 15 мкг/мл) на Сорбенте-5 (150×4.6 мм): 1 – надолол, 2 – тетрагидрозолин, 3 – атенолол, 4 – сорбиновая кислота, 5 – бензойная кислота, 6 – карбиноксамин, 7 – хлорфенирамин, 8 – ванилиновая кислота, 9 – галловая кислота, 10 – синаповая кислота, 11 – кофеиновая кислота. ПФ: 15 мМ ФБ (рН 5.6) / ацетонитрил (95:5). F = 0.7 мл/мин.  $\lambda = 235$  нм.



**Рис. 18б.** Разделение смеси ФКК и азотсодержащих соединений (0.7 – 25.6 мкг/мл) на Сорбенте-6 (100×4.6 мм): 1 – тетрагидрозолин, 2 – атенолол, 3 – сорбиновая кислота, 4 – бензойная кислота, 5 – хлорфенирамин, 6 – ванилиновая кислота, 7 – сиригиновая кислота, 8 – *n*-кумаровая кислота, 9 – феруловая кислота, 10 – кофеиновая кислота. ПФ: 15 мМ ФБ (рН 4.8) / ацетонитрил (95:5). F = 1 мл/мин.  $\lambda = 254$  нм.

Было интересно сравнить гидрофобность этих сорбентов с коммерческим обращенно-фазовым сорбентом Gemini C18, который используется для разделения как неполярных, так и полярных веществ. Для этого использовали описанный в литературе тест на гидрофобность на основе смеси бензилового спирта, бензола, ацетофенона, метилбензоата и диметилтерефталата (их параметры гидрофобности составляют 1.03, 2.22, 1.66, 2.20 и 2.47 соответственно). Удерживание этих компонентов на наших НФ было значительно слабее, чем на гидрофобном C18. Для всех трёх сорбентов наблюдалось снижение факторов удерживания веществ с ростом содержания ацетонитрила в ПФ, что характерно для ОФ ВЭЖХ. На Сорбенте-5 три наиболее гидрофобных вещества удерживаются сильнее, чем на Сорбенте-6 (рис. 19). Важно, что порядок элюирования соединений на наших НФ отличен от такового для сорбента C18: бензол на Сорбенте-5 удерживается дольше, чем диметилтерефталат, а ацетофенон – так же, как бензиловый спирт. На Сорбенте-6 диметилтерефталат и метилбензоат элюируются в одно и то же время, порядок элюирования веществ на нём ближе к C18. Таким образом, ещё раз подтверждена смешанная гидрофильно-гидрофобная природа Сорбентов-5 и -6 (так называемые “mixed-mode” сорбенты).



**Рис. 19.** Зависимость фактора удерживания бензилового спирта, ацетофенона, бензола, метилбензоата и диметилтерефталата от их параметров гидрофобности на Сорбенте-5, Сорбенте-6 и Gemini C18. ПФ: AcN/H<sub>2</sub>O (15:85) для Сорбента-5 и Gemini C18; (5:95) – для Сорбента-6. F = 1.0 мл/мин. λ = 254 нм.

### Применение полученных сорбентов для определения исследованных веществ в реальных объектах

В процессе исследования были предложены следующие методики по определению некоторых изученных соединений в различных реальных объектах.

*Определение ванилиновой, галловой и бензойной кислот в красном вине “Изабелла” на силикагеле, модифицированном 6,10-иононом и лигносульфонатом натрия*

Кислоты определяли методом внешнего стандарта и методом добавок (табл. 5), их извлекали из вина экстракцией этилацетатом. Условия хроматографического определения: ПФ – ацетонитрил / 7 мМ NaClO<sub>4</sub> (рН 6.80) (70 : 30), НФ – силикагель, модифицированный 6,10-иононом и ЛСТ. Спектрофотометрическое детектирование при λ = 220 нм, F = 1.0 мл/мин.

**Таблица 5.** Определение содержания бензойной, ванилиновой и галловой кислот в красном вине “Изабелла” методом ВЭЖХ (n = 5, P = 0.95).

Кислота	Метод внешнего стандарта		Метод добавок	
	с, мкг/мл	s <sub>r</sub>	с, мкг/мл	s <sub>r</sub>
Бензойная кислота	7±1	0.04	7±1	0.04
Ванилиновая кислота	30±5	0.04	32±3	0.03
Галловая кислота	20±4	0.05	22±4	0.04

*Определение сорбиновой, галловой, п-кумаровой и кофеиновой кислот в цитрусовом мёде на силикагеле, модифицированном 6,10-иононом и сульфатом декстрана*

Содержание сорбиновой, галловой, п-кумаровой и кофеиновой кислот определяли методом внешнего стандарта (табл. 6) в водной вытяжке из меда. Условия: ПФ – 15 мМ ЦБ (рН 4.80) / метанол (90:10), НФ – силикагель, модифицированный 6,10-иононом и СД. Спектрофотометрическое детектирование при  $\lambda = 254$  нм, F = 0.5 мл/мин. Описанным способом проводили определение кислот в 5 образцах мёда. Правильность определения подтверждали методом добавок.

**Таблица 6.** Определение сорбиновой, галловой и п-кумаровой кислот в цитрусовом меде методом ВЭЖХ (n = 5, P = 0.95).

Кислота	Метод внешнего стандарта		Метод добавок		C <sub>min</sub> , мкг/мл
	с, мкг/мл	s <sub>r</sub>	с, мкг/мл	s <sub>r</sub>	
Сорбиновая	5.1±0.5	0.10	5.8±0.8	0.10	0.08
Галловая	0.30±0.05	0.04	0.24±0.03	0.04	0.08
п-Кумаровая	0.4±0.1	0.30	0.4±0.1	0.30	0.1
Кофеиновая	0.70±0.04	0.03	0.71±0.09	0.04	0.1

*Определение кофеина, парацетамола, хлорфенирамина и доксиламина в сыворотке крови человека на силикагеле, двукратно модифицированном 6,10-иононом и СД, методом ВЭЖХ-МС*

Ещё одним важным достоинством полиэлектролитных сорбентов, предложенных в данной работе, является возможность их сочетания с чувствительным масс-спектрометрическим детектированием. Это показано для Сорбента-5 на примере сложного объекта – сыворотки человеческой крови.

Азотсодержащие соединения определяли в сыворотке крови методом внутреннего стандарта (табл. 7). Для этого строили градуировочную зависимость отношения площадей пиков фармпрепарата и внутреннего стандарта от концентрации фармпрепарата. Градуировочные растворы готовили в сыворотке крове (после пробоподготовки), не содержащей определяемые соединения.

Условия хроматографического определения: ПФ – ацетонитрил / 15 мМ ацетатный буферный раствор (рН 5.55) (10:90), НФ – силикагель, двукратно модифицированный 6,10-иононом и СД. F = 1 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме MRM. Предварительно подобрали следующие MRM-переходы: кофеин – 195.1/138.1 (CE = 36 В, DP = 100 В), парацетамол – 152.1/110.0 (CE = 30 В, DP = 100 В), хлорфенирамин – 275.1/167.0 (CE = 40 В, DP = 100 В), доксиламин – 271.1/167.1 (CE = 50 В, DP = 80 В), фенацетин (внутренний стандарт) – 180.1/110.0 (CE = 30 В, DP = 100 В). Время регистрации каждого MRM-перехода – 50 мс. Данную процедуру повторяли на 5 образцах сыворотки крови.

**Таблица 7.** Определение кофеина, парацетамола, доксиламина и хлорфенирамина в сыворотке крови человека методом внутреннего стандарта ВЭЖХ-МС (n = 5, P = 0.95).

Фармпрепарат	с, нг/мл	s <sub>r</sub>	с <sub>ц</sub> , нг/мл	C <sub>min</sub> , нг/мл
Кофеин	164.5±3.0	0.006	1.5	0.5
Парацетамол	18.5±0.8	0.028	1.5	0.5
Доксиламин	10.4±0.4	0.027	0.9	0.3
Хлорфенирамин	36.4±0.4	0.007	0.3	0.1

## ВЫВОДЫ

1. Предложены новые полислоиные покрытия: 6,10-ионен – N-(3-сульфо, 3-карбоксо)-пропионилхитозан (СКПХ), 6,10-ионен – наночастицы золота (НЧЗ) – СКПХ, 6,10-ионен – сульфат декстрана (СД), 6,10-ионен – НЧЗ – СД, 6,10-ионен – лигносульфонат натрия (ЛСТ) для кварцевых капилляров. Установлено, что модифицированные капилляры (кроме системы с ЛСТ) обладают большей стабильностью ( $s_f$  до 0.03, время стабильной работы – до 6 недель), селективностью по отношению к фармакологически активным азотсодержащим соединениям ( $\alpha$  до 1.26), более высокой чувствительностью их определения по сравнению с обычным кварцевым капилляром.
2. Показана возможность энантиоразделения атенолола ( $R_s$  0.8), тетрагидрозолина ( $R_s$  1.2), орфенадрин ( $R_s$  0.7), доксиламина ( $R_s$  0.8) и хлорфенирамина ( $R_s$  0.5) в капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СД.
3. Установлено, что двойное модифицирование приводит к увеличению электрофоретической подвижности азотсодержащих соединений, а также эффективности капилляра по сравнению с его аналогом, модифицированным один раз. Двукратно модифицированный капилляр обеспечивает лучшее разделение смеси азотсодержащих соединений и разделение энантиомеров некоторых из них (доксиламина, гидроксизина и тетрагидрозолина).
4. Установлено, что при включении в структуру полислоя НЧЗ электрофоретическая подвижность соединений возрастает (до 40 %), а её прецизионность повышается (для покрытий с СД  $s_f$  0.03 вместо 0.05).
5. Разработана методика одновременного определения тетрагидрозолина, карбиноксамина и фурацилина в моче человека методом КЭ в кварцевом капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СД, с пределом обнаружения 0.6 – 1.0 мкг/мл.
6. Синтезированы 6 новых сорбентов для ВЭЖХ по методике послойного нанесения: силикагель, модифицированный 6,10-ионеном (Сорбент-1), силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и ЛСТ (Сорбент-2), силикагель, модифицированный хитозаном и ЛСТ (Сорбент-3), силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и СД (Сорбент-4), силикагель, двукратно модифицированный 6,10-ионеном и СД (Сорбент-5), силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, НЧЗ и СД (Сорбент-6).
7. Модифицирование поверхности силикагеля подтверждено рядом физико-химических методов анализа. Установлены слабые анионообменные свойства у Сорбента-2 и Сорбента-3. Показано, что полученные сорбенты стабильны при непрерывной работе в течение 4.5 – 6 месяцев.
8. Сравнение селективности разделения ФКК и азотсодержащих соединений, эффективностей колонок, заполненных новыми сорбентами, разрешения пиков на хроматограммах показало, что лучшее разделение исследуемых соединений получено на сорбентах, где поликатионом был 6,10-ионен, а полианионом – СД.
9. Установлены закономерности удерживания ФКК и азотсодержащих соединений на новых стационарных фазах. Все сорбенты принадлежат к сорбентам смешанного типа. В механизме удерживания полярных соединений на Сорбентах-2 и -4 преобладают гидрофильные, адсорбционные и электростатические взаимодействия сорбат-сорбент. В случае Сорбента-5 их вклад снижается. У Сорбента-6 доминирующим является обращено-фазовый механизм удерживания соединений.
10. Предложены условия для совместного разделения органических полярных кислот и оснований на Сорбенте-5 и Сорбенте-6. На примере Сорбента-5 показана возможность применения предложенных сорбентов для определения фармпрепаратов методом ВЭЖХ-МС.
11. Разработаны методики определения ФКК и азотсодержащих соединений в реальных объектах (вине, цитрусовом меде, сыворотке крови) с использованием полученных сорбентов методами ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС.

**Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:**

1. Михалюк А.Н., Шаповалова Е.Н., Дьячков И.А., Апанасенко Н.В., Прохорова А.Ф., Аксёнов А.С., Боголицын К.Г., Шпигун О.А. Хроматографические свойства силикагеля, модифицированного 6,10-ионеном и лигносульфонатом натрия // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 5. С.497–504.
2. Михалюк А.Н., Шаповалова Е.Н., Мажуга А.Г., Шпигун О.А., Рудаковская П.Г. Электрофоретическое разделение азотсодержащих препаратов на кварцевых капиллярах, модифицированных наночастицами золота, стабилизированных цитратом натрия, 6,10-ионеном и сульфополисахаридами // Вест. Моск. Унив. 2013. Т. 68. № 5. С. 252–256.
3. Ioutsi<sup>1</sup>, A., Shapovalova, E., Prokhorova, A., Shpigun, O. Layer-by-layer assembly of polysaccharides and 6,10-ionene for separation of nitrogen-containing pharmaceuticals and their enantio-recognition by capillary electrophoresis // J. of Chem. 2015 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/836076>
4. Михалюк А.Н., Прохорова А.Ф. Разделение карбоновых кислот на силикагеле, модифицированном лигносульфонатом натрия // Тезисы XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов-2011”. Москва, 11–15 апреля. 2011. Электронный носитель.
5. Михалюк А.Н. Разделение фенольных соединений на силикагеле, модифицированном лигносульфонатом натрия // Сборник тезисов V Всероссийской конференции студентов и аспирантов “Химия в современном мире”. Санкт-Петербург, 18–11 апреля 2011. С. 103.
6. Михалюк А.Н., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А. Получение и исследование свойств кварцевых капилляров, модифицированных 6,10-ионеном и сульфатом декстрана // Материалы 2-й Всероссийской конференции “Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез”, Краснодар, 27–31 мая 2013. С. 61.
7. Mikhalyuk A.N., Prokhorova A.F., Shapovalova E.N., Shpigun O.A. Layer-by-layer assembly of polyelectrolytes and gold nanoparticles for capillary electrophoresis // Materials of 9<sup>th</sup> Balaton Symposium on high-performance separation methods, Siófok, Hungary, September 4–6, 2013. P. 87.
8. Ioutsi A., Shapovalova E., Makeev D., Shpigun O. Layer-by-layer assembly of 6,10-ionene, dextran sulfate and gold nanoparticles for HPLC // Materials of 30<sup>th</sup> International symposium on chromatography, Salzburg, Austria, September 14–18, 2014. USB Mass Storage Device.

Автор выражает благодарность д.х.н., проф. Шпигуну Олегу Алексеевичу за консультации по тематике работы; к.х.н. Владимиру Аяри и Погосовой Мариам за помощь в исследовании поверхности сорбентов методами диффузного отражения и электронной микроскопии; Эндокринологическому научному центру министерства здравоохранения Российской Федерации за возможность использования его оборудования для ВЭЖХ-МС.

---

<sup>1</sup> Автор сменила фамилию Михалюк на Иоутси в 2013 г.