

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

**ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

На правах рукописи



**Иоутси Анна Николаевна**

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

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
к.х.н., доцент Шаповалова Е.Н.

Москва - 2015

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
Глава 1. Полиэлектролиты .....	12
1.1. Общая информация о полиэлектролитах .....	12
1.2. Оценка макромолекулярных свойств полиэлектролитов .....	14
1.3. Оценка электрохимических свойств полиэлектролитов.....	14
1.4. Образование полиэлектролитных комплексов .....	16
1.5. Образование полиэлектролитных комплексов по методике послойного нанесения.....	20
Глава 2. Сорбенты на основе разных полиэлектролитов .....	23
2.1. Сорбенты, модифицированные синтетическими полиэлектролитами.....	24
2.1.1. Сорбенты, модифицированные ионенами.....	26
2.2. Использование полисахаридов в сепарационных методах .....	33
2.3. Использование наночастиц золота в капиллярном электрофорезе и высокоэффективной жидкостной хроматографии .....	43
2.3.1. Общие сведения о наночастицах золота.....	43
2.3.2. Создание материалов с наночастицами золота.....	44
2.3.3. Применение наночастиц золота в капиллярном электрофорезе .....	45
2.3.4. Применение наночастиц золота в капиллярной электрохроматографии .....	46
2.3.5. Применение наночастиц золота в газовой хроматографии .....	48
2.3.6. Применение наночастиц золота в высокоэффективной жидкостной хроматографии .....	48
Глава 3. Разделение и определение азотсодержащих соединений сепарационными методами .....	57
Глава 4.Разделение и определение фенолкарбоновых кислот сепарационными методами .....	65
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	80
Глава 5. Исходные вещества, аппаратура, методики эксперимента, техники эксперимента....	80
5.1. Исходные вещества .....	80

5.2. Аппаратура .....	81
5.3. Методики эксперимента.....	83
5.4. Техника эксперимента.....	88
5.5. Физико-химическое исследование полученных сорбентов .....	90
Глава 6. Электрофоретическое исследование полиэлектролитных систем .....	99
6.1. Влияние модифицирования поверхности капилляра на электроосмотический поток....	99
6.2. Разделение веществ в кварцевом капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и полианионами .....	101
6.3. Модифицирование кварцевого капилляра 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и крупными полианионами .....	108
6.4. Определение азотсодержащих фармпрепаратов в биологической жидкости в капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и сульфатом декстрана.....	111
6.5. Влияние количества модифицирующих слоёв на электрофоретические характеристики полиэлектролитной системы .....	113
6.6. Сравнение разделения азотсодержащих соединений в немодифицированном кварцевом капилляре и капиллярах, модифицированных 6,10-ионеном и анионными полисахаридами .....	114
Глава 7. Хроматографическое исследование полиэлектролитных систем.....	117
7.1. Исследование ионообменных свойств стационарных фаз .....	118
7.2. Хроматографическое поведение фенолкарбоновых кислот на полиэлектролитных сорбентах для ВЭЖХ, содержащих лигносульфонат натрия.....	120
7.3. Определение фенолкарбоновых кислот в реальных объектах на силикагеле, модифицированном 6,10-ионеном и лигносульфонатом натрия .....	128
7.4. Хроматографическое поведение фенолкарбоновых кислот на полиэлектролитных сорбентах для ВЭЖХ, содержащих сульфат декстрана .....	133
7.4.1. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и сульфатом декстрана (Сорбент-4) .....	133
7.4.2. Силикагель, двукратно модифицированный 6,10-ионеном и сульфатом декстрана (Сорбент-5) .....	138
7.4.3. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и сульфатом декстрана (Сорбент-6).....	142

7.5. Определение фенолкарбоновых кислот в цитрусовом мёде на силикагеле, модифицированном 6,10-ионеном и СД.....	145
7.6. Хроматографическое поведение азотсодержащих соединений на полиэлектролитных сорбентах для ВЭЖХ, содержащих сульфат декстрана .....	148
7.6.1. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и сульфатом декстрана (Сорбент-4) .....	148
7.6.2. Силикагель, двукратно модифицированный 6,10-ионеном и СД (Сорбент-5).....	153
7.6.3. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и сульфатом декстрана (Сорбент-6).....	157
7.7. Разделение смеси кислот и оснований .....	161
7.8. Хроматографическое определение азотсодержащих соединений на силикагеле, двукратно модифицированном 6,10-ионеном и сульфатом декстрана .....	163
Глава 8. Обсуждение закономерностей удерживания полярных соединений на полученных полиэлектролитных сорбентах .....	164
8.1. Анализ полученных данных .....	164
8.1.1. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и лигносульфонатом натрия .....	164
8.1.2. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и сульфатом декстрана.....	166
8.1.3. Силикагель, двукратно модифицированный 6,10-ионеном и сульфатом декстрана .....	169
8.1.4. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и сульфатом декстрана .....	171
8.2. Тестирование Сорбента-5 и Сорбента-6 на остаточные силанольные группы и гидрофобность .....	173
ВЫВОДЫ.....	175
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	177

## Список сокращений, используемых в работе

ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
НЧЗ	Наночастицы золота
ПАВ	Поверхностно активное вещество
ПЭК	Полиэлектролитный комплекс
СЭМ	Сканирующая электронная микроскопия
ДО	Диффузное отражение
ЯМР	Спектроскопия ядерного магнитного резонанса
НФВЭЖХ	Нормально-фазовая ВЭЖХ
ОФ ВЭЖХ	Обращенно-фазовая ВЭЖХ
НФ ВЭЖХ	Нормально-фазовая ВЭЖХ
ГХ-МС	Газовая жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием
ЖХ-МС	Жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием
УВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография сверхвысоких давлений
КЭ	Капиллярный электрофорез
КЭХ	Капиллярная электрокинетическая хроматография
МЭКХ	Мицеллярная электрокинетическая хроматография
ИХ	Ионная хроматография
МПТМС	3-Меркаптопропилтриэтоксисилан
ГХ	Газовая хроматография
ПФ	Подвижная фаза
НФ	Неподвижная фаза
ФБ	Фосфатный буферный раствор
ЦБ	Цитратный буферный раствор
АБР	Ацетатный буферный раствор
ГФБ	Гидрофталаатный буферный раствор
ФЭ	Фоновый электролит
ДСН	Додecilсульфат натрия
ПАМА	Поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилат
ПАК	Полиакриловая кислота
ДДБС	Додecilбензосульфокислота
СД	Сульфат декстрана
ЦД	Циклодекстрин
СКПХ	N-(3-сульфо, 3-карбоксо)-пропионилхитозан
БСА	Бычий сывороточный альбумин
ПДМА	Хлорид полидиаллилметиламмония
ПЭО	Полиэтиленоксид
ЭОП	Электроосмотический поток
МПК	3-Меркаптопропионовая кислота
ТМС	Триметилсилилирование
ПДАДМА	Поли(диаллилдиметил)хлорид аммония
ЭХЛ	Электрохемолюминисцентный детектор
ДМД	Диодноматричный детектор

ФД  
ФКК

Флуоресцентный детектор  
Фенолкарбоновые кислоты

## ВВЕДЕНИЕ

**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 полибренов–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 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-иононом и СД (десятки–сотни нг/л).

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

На примере силикагеля, двукратно модифицированного 6,10-иононом 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 энантиомеров 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.

# ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## Глава 1. Полиэлектролиты

### 1.1. Общая информация о полиэлектролитах

Полиэлектролиты представляют собой полимеры, в макромолекулах которых содержатся ионогенные группы.

Свойства полиэлектролитов определяются сочетанием свойств высокомолекулярного вещества и электролита. Важно, что сочетание таких признаков не приводит к суммированию электролитных и полимерных свойств. Это принципиально новое качественное состояние, обладающее рядом специфических особенностей.

При растворении в полярном диссоциирующем растворителе макромолекула полиэлектролита диссоциирует с образованием полииона и низкомолекулярных противоионов.

Различают поликислоты, полиоснования и полиамфолиты. Сильные полиэлектролиты в водных растворах полностью ионизованы независимо от значения pH. Сильные поликислоты содержат сульфо-, сульфатные или фосфатные группы, например поливинилсульфокислота  $[-\text{CH}_2\text{CH}(\text{SO}_3\text{H})-]_n$ , сильные полиоснования – четвертичные аммониевые группы, например ионены:

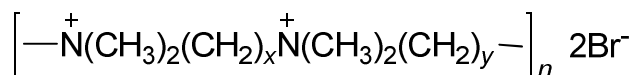


Рис. 1. Структурная формула ионенов.

Заряд слабых поликислот и полиоснований определяется величинами констант диссоциации ионогенных групп и существенно зависит от pH раствора. Типичные слабые поликислоты содержат карбоксильную группу, например полиакриловая кислота  $[-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})-]_n$ , слабые полиоснования – первичные, вторичные, третичные аминогруппы, способные протонироваться в водных средах, например, поливиниламин  $[-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)-]_n$ , поливинилпиридины. Полиамфолиты содержат как кислотные, так и основные группы. Суммарный заряд полиамфолитов при изменении pH раствора может менять знак. Значение pH, при котором он равен нулю, называется изоэлектрической точкой pI. Например, белки и нуклеиновые кислоты являются полиамфолитами.

Полиэлектролиты могут быть как линейными, так и пространственно сшитыми. Из-за наличия кулоновских взаимодействий поведение водных растворов линейных полиэлектролитов существенно отличается от поведения как неионогенных полимеров, так и

низкомолекулярных электролитов. Благодаря электростатическому отталкиванию между одноименно заряженными ионогенными группами макромолекула полиэлектролита стремится развернуться и приобрести более асимметричную форму по сравнению с формой статистического клубка, характерной для незаряженных цепей. Поэтому в растворах полиионы имеют значительно большие размеры и асимметрию, чем макромолекулы той же химической природы, но лишенные заряда. Эта особенность полиэлектролитов обнаруживается при вискозиметрических, седиментационных и диффузионных исследованиях, при изучении явлений переноса в растворах полиэлектролитов в электрических полях (например, электрофорез).

Размеры полииона в водных растворах сильно зависят от линейной плотности заряда (величины заряда полиэлектролита, приходящейся на единицу его контурной длины). Так, при диссоциации всех карбоксильных групп высокомолярной полиакриловой кислоты объем, занимаемый таким полиионом в разбавленном бессолевом водном растворе, увеличивается более чем на два порядка по сравнению с объемом макромолекулы полиакриловой кислоты, в которой все карбоксильные группы находятся в протонированной форме –  $\text{COOH}$ .

Разворачивание цепи полиэлектролита проявляется в прогрессирующем возрастании приведенной вязкости бессолевого водного раствора полиэлектролита при уменьшении его концентрации (полиэлектролитный эффект). Для растворов неионогенных макромолекул характерно линейное уменьшение приведенной вязкости при разбавлении. Объясняется этот эффект тем, что при разбавлении растворов полиэлектролитов увеличивается объем, в котором распределяются противоионы, экранирующие кулоновское отталкивание между фиксированными зарядами полииона. Поэтому возрастает их отталкивание и происходит прогрессирующее разворачивание полииона.

Кроме того, на конформацию полиэлектролита влияет наличие в растворе низкомолярных электролитов, например простых (1,1-валентных) солей. Введение их в раствор приводит к экранированию зарядов полииона и уменьшению электростатического отталкивания между ними, а, следовательно, и степени разворачивания полииона, зависящей от концентрации низкомолекулярного электролита. При значительных концентрациях солей (порядка 1 М) вклад кулоновских взаимодействий в разворачивание цепей исчезает. В таких случаях их размеры совпадают с размерами неионогенных цепей той же химической природы. Дальнейшее введение низкомолярных электролитов в раствор полиэлектролита может привести к выделению полиэлектролита в отдельную, чаще всего жидкую фазу (высаливание).

Что касается полиамфолитов, в изоэлектрической точке они имеют компактную конформацию, стабилизированную кулоновским притяжением между противоположно заряженными группами. Поэтому экранирование электростатических взаимодействий при введении в раствор низкомолекулярных солей сопровождается разворачиванием макромолекул.

С учётом вышеуказанной двойственности полиэлектролитов (молекул больших размеров, обладающих зарядом) их следует охарактеризовывать с двух сторон: с позиции макромолекулы и с точки зрения молекулы, несущей заряд [1].

## **1.2. Оценка макромолекулярных свойств полиэлектролитов**

Наиболее значимыми макромолекулярными параметрами полиэлектролитов являются молекулярная масса, распределение молярной массы, радиус инерции, термодинамические величины для раствора полиэлектролита, параметры структуры молекулы и т.д. Стоит отметить, что методы исследования этих величин совпадают с таковыми для неионогенных полимеров, однако в случае полиэлектролитов требуется учёт электростатической составляющей их природы.

Эксклюзионная хроматография, фракционирование в потоке при наличии поля, электрофорез – наиболее распространённые методы исследования для получения макромолекулярных параметров полиэлектролитов (в частности молярной массы).

Методы рассеивания света, в частности статического и динамического светорассеивания, дают информацию о массе и размере частиц, рассеивающих свет, а также об их полидисперсности. Метод динамического рассеивания света наиболее широко применяется для определения коэффициента диффузии, коррелирующего с броуновским движением частиц в растворе.

Ультрацентрифугирование позволяет определять молярные массы полимеров в широком диапазоне ( $300 \cdot 10^8$  г/моль). Вискозиметрия в отличие от него является относительным аналитическим методом и требует калибровки. Благодаря более простому исполнению и аппаратному оформлению она широко используется в химической технологии и инженерии.

## **1.3. Оценка электрохимических свойств полиэлектролитов**

Известно, что наиболее уникальные свойства полиэлектролитов связаны с наличием заряда в их макромолекулярной цепи. Как уже упоминалось выше, в связи с этим они классифицируются на основания, кислоты и полиамфолиты. В то же время соединения такого типа подразделяют на сильные и слабые полиэлектролиты. С точки зрения функциональных

групп, различие заключается в расположении: в основной цепи и боковых. С точки зрения плотности заряда, различают полиэлектролиты высокой и низкой плотности заряда.

Взаимодействие полииона с противоионом, включающее конденсацию последнего, является наиболее характерным свойством полиэлектролитов и описывается многочисленными теоретическими моделями. Наиболее интересной из них является теория Маннинга. Согласно этой теории простых связей экспериментально полученная конденсация противоионов на высоко заряженные цепи полиэлектролитов может быть описана качественно. Противоионы располагаются вокруг цепи полиэлектролита таким образом, что эффективная плотность её заряда больше не повышается после того, как она превышает некоторое критическое значение. Потенциометрия—один из важнейших аналитических методов, с помощью которых можно качественно и количественно оценить электрохимическое поведение заряженных макромолекул. Для регистрации конденсации противоионов успешно применяют ионселективные электроды, спектроскопические методы, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (**ЯМР**) и УФ/видимой области.

Для исследования электрохимического поведения полиэлектролитов в растворе, измеряя рН раствора, можно определить их степень функционализации (количество функциональных групп), константы кислотности. Кроме того, можно идентифицировать конформационные изменения в молекулах полиэлектролита, связанные с изменением рН.

Довольно часто при работе с полиэлектролитами потенциометрию используют для определения только степени функционализации. Для этого, например, полианионы в кислотной форме титруют щёлочью. И наоборот – поликатионы титруют кислотой. Полиамфолиты следует титровать обоими титрантами в соответствующих диапазонах рН. Однако в случае полиэлектролитов точку эквивалентности идентифицировать очень сложно, в отличие от низкомолекулярных соединений. Чтобы это исправить, в раствор полиэлектролита добавляют раствор низкомолекулярной соли высокой концентрации, например, NaCl (0.1 – 1.0 М).

Коэффициент активности противоиона зависит от плотности цепи полиэлектролита, жёсткости макромолекулы. Стоит отметить, что коэффициенты активности для одновалентных противоионов выше, чем для двухвалентных. Экспериментально подтверждено, что из-за этого степень взаимодействия с полиэлектролитом у последних выше.

Потенциометрия позволяет определять много физико-химических параметров полиэлектролитов. Это довольно дешёвый и часто используемый метод. Однако результаты, полученные при его использовании, часто отклоняются от теорий, в том числе от теории Маннинга. Это приводит к предположению о том, что взаимодействие полииона с

противоионом описывается какими-то более сложными взаимодействиями. Дисноерс [2] предложил более сложный механизм такого взаимодействия, учитывающий эффект гидратации при взаимодействии двухрастворов (так называемая модель взаимодействий со структурной гидратацией, в зарубежной литературе – structural hydration interaction (SHI) model). Согласно этой теории, поскольку большинство полиэлектролитов имеет гидрфобные фрагменты, в их водном растворе сосуществуют два типа гидратации – гидрофильная и гидрофобная. На данный момент сочетание теорий Маннинга и Дисноерса помогает точнее понять механизм специфического связывания противоионов.

Для более ясного видения и понимания микроскопической гидратированной структуры полиэлектролита в растворе и качественной оценки расположения противоионов относительно полииона необходимо использовать спектроскопические методы исследования, например, метод ЯМР-спектроскопии. Широко используется метод УФ/видимой спектроскопии для исследования свойств полиэлектролитов, содержащих хромофорные группы. Кроме того, метод позволяет изучать взаимодействия полиэлектролитов с хромофорами.

#### **1.4. Образование полиэлектролитных комплексов**

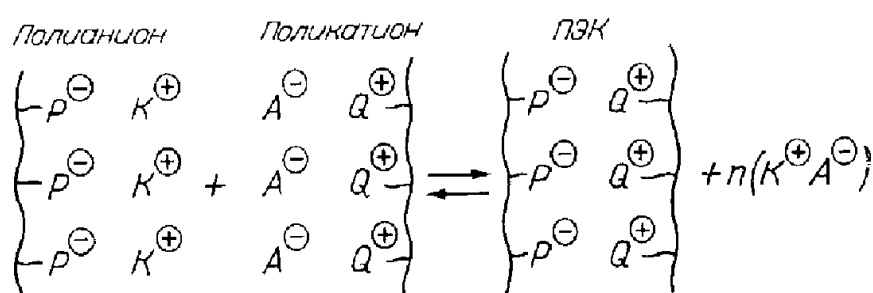
Уникальным свойством полиэлектролитов является образование комплекса с более крупными заряженными молекулами, то есть с поверхностно активным веществом (ПАВ) или противоположно заряженным полиэлектролитом.

Большинство публикаций за последние 30 лет рассматривают реакции полиэлектролитов с противоположно заряженными молекулами ионогенных ПАВ и ассоциацию неионогенных полимеров с заряженными мицеллами ПАВ. Здесь доминируют электростатические взаимодействия, а гидрофобные играют меньшую роль. Реакция между ионогенным ПАВ и противоположно заряженным полиэлектролитом – это процесс разряжения. Он более благоприятен, чем реакция с нейтральным полимером. По сравнению с незаряженным полимером образование комплекса полиэлектролит – ПАВ концептуально более понятно и изучено, благодаря хорошо идентифицируемым участкам для образования связей на полиэлектролитах. Очевидно, что свойства самих полиэлектролитов играют большую роль в механизме протекания реакции комплексообразования с ПАВ. Это в первую очередь химическое строение, линейная плотность заряда, локализация зарядов и гибкость цепи полимеров. Линейная плотность заряда полиэлектролита коррелирует с расстоянием между соседними зарядами вдоль полимерной цепи.



Что касается образования так называемых полиэлектролитных комплексов (ПЭК) между двумя противоположно заряженными полиэлектролитами, можно предложить следующее описание этого процесса на основе литературных данных.

ПЭК образуются в результате реакций, протекающих в водных средах между противоположно заряженными полиэлектролитами. Составляющие ПЭК полиэлектролиты могут иметь синтетическое происхождение, а также могут быть и природными полимерами, например гепарин, хитозан, сульфат декстрана [3–5]. Представления о структуре ПЭК базируются на результатах изучения интерполиэлектролитных реакций, которые приводят к образованию ПЭК. Схематично в общем виде они могут быть иллюстрированы следующим образом (рис. 2):



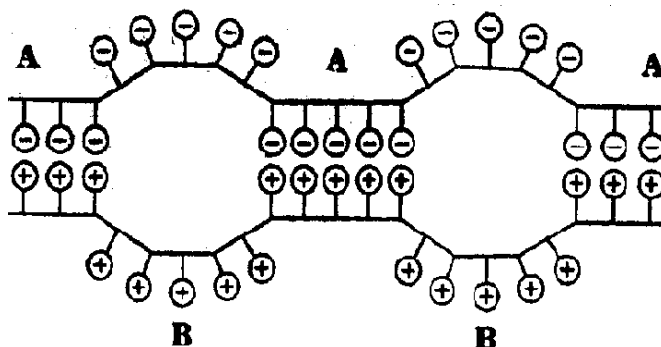
**Рис. 2.** Схема интерполиэлектролитной реакции, приводящей к образованию ПЭК.

Интерполиэлектролитные реакции полностью обратимы и равновесие реакции можно смещать в ту или иную сторону путем изменения активности ионов  $K^+$  и  $A^-$  в среде, в которой проводят процесс. Как правило, если концентрация низкомолекулярных солей в реакционной среде не превышает 0.5 М, равновесие интерполиэлектролитной реакции в водных средах практически смещено в сторону образования ПЭК. В достаточно концентрированных растворах солей полиэлектролитный комплекс диссоциирует на составляющие его полиэлектролиты. Также возможна диссоциация ПЭК в присутствии органических растворителей [6]. На структуру образующихся комплексов влияют сила и расположение ионогенных групп, плотность заряда и жесткость полимерной цепи. Также вносят вклад характеристики раствора, в котором протекает реакция: диэлектрическая постоянная растворителя, ионная сила, температура, рН [7, 8]. Влияние низкомолекулярных солей различно в зависимости от размеров гидратированного иона и его валентности [9].

Если один из полиэлектролитов является слабой полимерной кислотой или слабым полимерным основанием, то в результате интерполиэлектролитной реакции в раствор выделяются соответственно  $H^+$  и  $OH^-$ -ионы. Такие ПЭК устойчивы в ограниченном интервале

pH – большинство изученных ПЭК такого типа сохраняют устойчивость при  $pH > 2.0$  и  $pH < 11.0$  [10].

Образующиеся интерполиэлектролитные комплексы стабилизируются за счет кооперативной системы солевых связей и устойчивы в водных средах в широком интервале pH. Структура таких комплексов представлена на рис. 3.



**Рис. 3.** Структура интерполиэлектролитного комплекса.

В комплексах существует два типа участков, каждый из которых несет определенную ценность. Гидрофобные упорядоченные участки, образованные противоположно заряженными звеньями обоих полиэлектролитов, связанные друг с другом солевыми связями (А), ограничивают способность комплексов к набуханию и обуславливают их нерастворимость в воде за счет того, что заряженные группы в значительной степени экранированы от взаимодействия с водной средой гидрофобными хребтами макромолекул. Эти участки чередуются в свою очередь с дефектами и петлями, образованными последовательностями разобщенных звеньев полиэлектролитов (В). Причиной, обуславливающей образование дефектов и петель, является наличие в окружающей среде низкомолекулярных электролитов, конкурирующих за образование интерполимерных солевых связей. При этом возрастание концентрации простых солей в окружающей среде, естественно, сопровождается увеличением доли звеньев, включенных в петли. Благодаря наличию гидрофильных звеньев в дефектных участках интерполиэлектролитные комплексы хорошо набухают в воде. Такая структура интерполиэлектролитного комплекса возникает в результате стерической некомплементарности взаимодействующих макромолекул [11]. Соотношение между количеством звеньев, включенных в участки обоих типов, можно варьировать путем изменения как состояния окружающей среды, например концентрации солей, так и состава ПЭК, т.е. относительного количества звеньев полиэлектролитов, включенных в ПЭК.

Как было упомянуто выше, ПЭК могут быть образованы как синтетическими, так и природными полиэлектролитами, например полисахаридами, белками, нуклеиновыми кислотами. Особое внимание уделяется в последнее время исследованию полимеров природного происхождения. Связано это в первую очередь с такими их свойствами, как биоразрушаемость, низкая токсичность и другими. Рассмотрим некоторые конкретные примеры изучения образования ПЭК с участием природных полиэлектролитов.

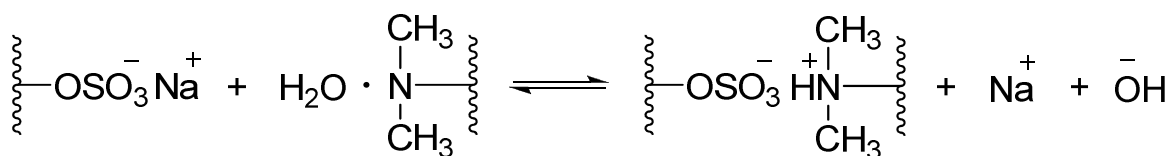
В работе [12] были изучены закономерности взаимодействия хитозана с анионным ПАВ додецилсульфатом натрия (ДСН) в ацетатном буферном растворе (рН 3.6;  $I = 0.05$  М) и в растворе HCl. Установлено, что, начиная с некоторого значения мольного соотношения  $Z$  ( $Z = c_{\text{пав}}^c / c_{\text{п}}^c$ , где  $c_{\text{пав}}^c$  и  $c_{\text{п}}^c$  мольные концентрации ПАВ и полиэлектролита в смеси соответственно), комплексообразование в системе ДСН – хитозан сопровождается снижением ее вязкости, что указывает на конформационные превращения, в частности на компактизацию цепей полиэлектролита вследствие снижения их заряда и появления гидрофобных взаимодействий присоединенных алкильных радикалов ПАВ. Это в первую очередь свидетельствует об образовании в системе нерастворимого ПЭК. Особо отмечено, что заметное снижение вязкости наблюдается уже при  $Z = 10^{-2}$  (когда в среднем одна молекула ПАВ приходится на сто элементарных звеньев хитозана). Также факт комплексообразования был подтвержден результатами ИК-спектроскопии осадков, выделенных из смесей растворов хитозана и ДСН. Для изучения состава полученных комплексов был использован метод потенциометрического титрования смесей в разбавленной соляной кислоте при рН 2.5. Согласно полученным данным, в смесях с  $Z \leq 0.1$  практически весь введенный ПАВ входит в состав комплексов, при увеличении  $Z$  степень связывания ПАВ в комплекс уменьшается.

Большой интерес в последнее время представляет изучение интерполиэлектролитных реакций с участием сульфопроизводного хитозана, который является хорошо растворимым в воде полисахаридом. Сульфат хитозана представляет собой полиамфолит, цепи которого наряду с аминогруппами содержат сульфатные группы, причем количество групп  $-\text{OSO}_3^-$  в его цепях заметно превышает количество аминогрупп. Знак заряда цепи сульфата хитозана определяют ионизированные группы  $-\text{OSO}_3^-$ , включенные в избыточном по отношению к аминогруппам количестве, таким образом, в водных растворах полиионы сульфата хитозана несут отрицательный заряд.

В работе [13] была исследована интерполиэлектролитная реакция сульфата хитозана с полимерными аминами – поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилатом (ПАМА) и 2,5-ионенбромидом. Изучали реакционные смеси различного состава  $z'$ , где  $z'$  определяли как

отношение количества сульфатных групп сульфата хитозана к количеству аминогрупп полиамина.

Реакцию сульфата хитозана с ПАМА – слабым полимерным основанием, исследовали в щелочных средах. Смешение полиэлектролитов сопровождается образованием ПЭК по реакции, описываемой схемой (рис. 4):



**Рис. 4.** Схема полиэлектролитной реакции сульфата хитозана с ПАМА.

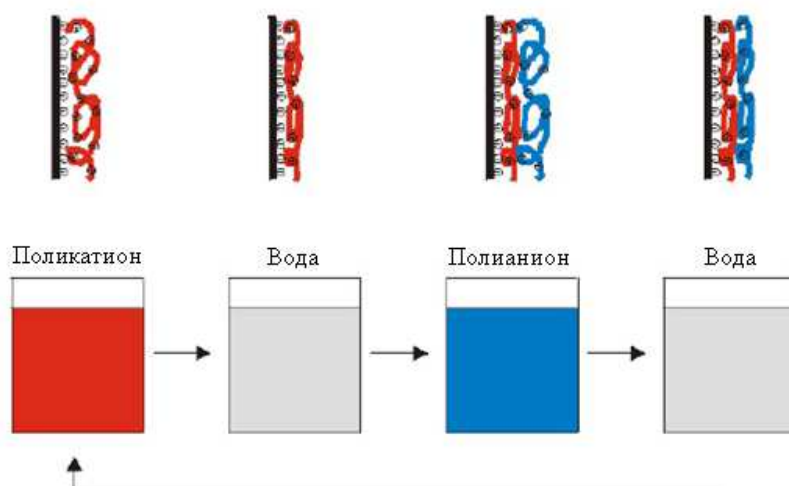
Реакция между сульфатом хитозана и ПАМА кооперативна, протекает в узком интервале рН и проходит на большую глубину. Исследования показали, что при эквимольном соотношении компонентов только часть цепей ПАМА включается в ПЭК, а часть остаются свободными. Наличие свободного полиамина в растворе подтверждает качественная реакция с полиакриловой кислотой (ПАК), сопровождающаяся образованием нерастворимого полиэлектролитного комплекса ПАМА – ПАК. Полностью ПАМА входит в ПЭК только если реакционная смесь содержит в 1.8 раз больше сульфата хитозана по сравнению с ПАМА.

Подобные результаты были получены и при изучении реакции сульфата хитозана с 2,5-ионенбромидом. Показано, что максимальный выход ПЭК достигается при составе реакционной смеси  $z' \sim 2$ . Это значит, что примерно только половина групп  $-\text{OSO}_3^-$  сульфата хитозана образует солевые связи с четвертичными аммонийными группами 2,5-ионенбромида, остальные включены в цвиттер-ионные пары с аминогруппами соседнего глюкозидного цикла и не вступают в интерполиэлектролитную реакцию. По этой причине для завершения реакции требуется почти двукратный избыток сульфата хитозана по отношению к 2,5-ионенбромиду. Однако следует отметить, что при изменении условий проведения реакции сульфата хитозана с 2,5-ионенбромидом все группы  $-\text{OSO}_3^-$  могут быть включены в ПЭК. Это происходит, если реакцию проводить в щелочных средах, т.е. в условиях, в которых аминогруппы сульфата хитозана теряют протон и не могут образовывать внутримолекулярные цвиттер-ионные пары.

### **1.5. Образование полиэлектролитных комплексов по методике послойного нанесения**

Метод был впервые предложен Илером в 1966 году, а затем заново открыт Дечером в 1991 году [14]. Он представляет собой процесс поочередного осаждения плотных монослоев заряженных молекул на противоположно заряженные поверхности. Основная сила,

обуславливающая адсорбцию – электростатическая. Однако водородные связи и гидрофобные взаимодействия также могут вносить свой вклад. Исходную матрицу последовательно окунают в растворы полиэлектролитов. Между окунанием в растворы полиэлектролитов образцы промываются водой, чтобы свободные полиионы не взаимодействовали с ионами следующего раствора (рис. 5).



**Рис. 5.** Схема методики послойного нанесения [11].

Метод последовательного осаждения полиэлектролитов на заряженные субстраты – это активно развивающийся в последние двадцать лет метод создания новых материалов.

Основные его достоинства:

- Простота исполнения. Исходный субстрат погружают в раствор противоположно заряженного полиэлектролита на короткое время. После этого следует промывка водой для удаления избытка реагента. Были даже предложены методики последовательного осаждения спреем или применением центрифугирования для ускорения процесса. Не требуется дорогого и сложного оборудования (например, вакуум или нагрев).
- Широкий круг веществ для образования полислоёв, который включает в себя не только полиэлектролиты, но и другие заряженные вещества такие как: маленькие молекулы органических соединений, органические/неорганические частицы, белки, ДНК, вирусы, ферменты.
- Разнообразие поверхностей, на которые можно наносить слои. Это может быть любой заряженный материал: кремний, золото, палладий, пластик, стекло, кварц, сталь, наночастицы, клетки крови, коллоидные частицы. Есть даже случаи применения незаряженного политетрафторэтилена [15].

- Разнообразие формы поверхности, на которую можно наносить слои (частицы любой формы можно окунуть в раствор).
- Высокая стабильность полученных материалов вследствие сильных электростатических взаимодействий между соединениями (например, полиэлектролитами), образующих самоорганизованные полислои. Полислои устойчивы к действию растворителей, температуры, рН и т.д.
- Возможность контроля толщины слоя. В основном величина получаемых таким образом слоёв составляет 0.2 – 10 нм [11].

Ранние фундаментальные исследования многослойных агрегатов на плоских субстратах показали практичность и гибкость подхода, а в последнее десятилетие было проведено дальнейшее изучение внутренней структуры и состава полислоистых пленок, в т.ч. динамических и статических взаимодействий между компонентами пленок, растворителем и растворенным веществом.

В то время как основной объем работы был проделан в области экспериментальных исследований, были предприняты некоторые попытки создать теоретическое описание для полислоистых покрытий, хотя в этой области необходимо проделать еще много работы, чтобы утвердить практически применимую модель [16].

Были выделены три механизма, управляющие ростом и организацией полислоев: адсорбция полиэлектролитов (управляемая электростатическим балансом), диффузия в предыдущий слой (фактор размывания) и поверхностное комплексообразование. В зависимости от того, способны ли полиэлектролиты образовывать структурированные комплексы или нет, полученные пленки могут иметь различные уровни внутренней организации [17, 18].

Главное условие для осаждения полислоистых покрытий — наличие заряженных единиц с достаточной плотностью заряда и молекулярным весом. Очевидно, что в то время как маленькие молекулы притягиваются и садятся на заряженную поверхность, они не обеспечивают стабильный слой для адсорбции других молекул; иными словами, предпочтительным для образования стабильного покрытия является молекулярный вес больше 10 кДа.

Важно также понять, что происходит с противоионами во время осаждения и как нейтрализуется заряд внутри структуры. Можно выделить два случая: внутренняя компенсация, когда положительный заряд балансирует с отрицательным зарядом другого полимера, и внешняя компенсация, когда большинство зарядов полимерной цепи гасится противоионами из

раствора, который использовали для осаждения. То, какой случай компенсации реализуется, напрямую сказывается на свойствах и возможных применениях полученных полислоев. Так, слои, содержащие ионы соли, тоньше, менее проницаемы, а отдельные полимерные цепи более подвижны, т.е. вся структура менее стабильна. С помощью изотопных меток было показано, что при обычном полислоидном нанесении ионы не входят в структуру пленки, их можно внести специальной послеосадительной модификацией внутреннего заряда, например, используя электрохимически активные полислои [19].

Толщина полимерного слоя зависит от выбора субстрата и химической природы полимера, но она всегда ограничена насыщением адсорбционного слоя полимера и не превосходит размеров полимерной частицы в объеме раствора, если адсорбция производится из разбавленного раствора [20, 21].

Для первых четырех – пяти слоев наблюдается линейное увеличение толщины полислоя от количества слоев, а дзета-потенциал симметрично колеблется около нулевого значения, показывая, что система получается в стационарном режиме. Зависимость толщины полислоя от числа слоев не всегда линейна, аналогичная зависимость от количества блоков из двух слоев выполняется более строго. Есть категория полислоев, которые “наращиваются” экспоненциально. Толщина слоя сильно зависит от количества соли. Кроме того, толщина слоя увеличивается с увеличением заряда субстрата [11].

В полислоидных покрытиях условие электронейтральности достигается внутренней и внешней компенсацией заряда. В случае комплексообразования полимеров с точным стехиометрическим соотношением 1:1 могут образовываться некомпенсированные области из-за неспособности заряженных единиц переорганизовываться и точно закрывать избыточный заряд поверхности. В этом случае нейтральность достигается благодаря противоионам, связанным с некомпенсированным зарядом полимера. Однако при промывании противоионы могут смываться, тогда должна происходить перестройка структуры, чтобы сохранить нейтральность, или же возможна “ненейтральная” ситуация.

Важно также рассмотреть стабильность полислоидных покрытий. Существует два способа растворения ПЭК: один из них более известен – это добавление избытка подходящей соли; другой путь менее распространен – соли требуется немного (некое пороговое значение, ниже которого скорость растворения практически равна нулю) и дополнительное количество полиэлектролита (это может быть как поликатион, так и полианион) [22].

## **Глава 2. Сорбенты на основе разных полиэлектролитов**

Полиэлектролиты широко распространены в природе – это белки, пектины и полипептиды, полисахариды, различные растительные смолы и т.д. Некоторые из них играют важную роль в биохимических процессах, протекающих в живых организмах. Наряду с природными полиэлектролитами, существуют также и синтетические, применение которых непрерывно расширяется. Они используются как структурообразователи растворов и флокулянты, пленочные материалы и волокна, поверхностно-активные вещества, иониты, красители, проводники и сверхпроводники. Синтетические полиэлектролиты, свойства которых определяются заранее заданной структурой, являются удобными моделями для понимания строения и свойств природных полиэлектролитов [23].

Полиэлектролиты – синтетические и природного происхождения – уже несколько десятилетий находят широкое применение в аналитических методах разделения (хроматография и капиллярный электрофорез). На их основе создают материалы, которые необходимы на производстве, например, в медицине, фармацевтической промышленности.

## **2.1. Сорбенты, модифицированные синтетическими полиэлектролитами**

Огромный перечень сорбентов и капиллярных колонок для различных вариантов хроматографии представлен в обзорах [24–28]. В качестве активно применяющихся силикагелей, модифицированных синтетическими соединениями, выступают циано-, диол-, amino-силикагели. Так же есть неподвижные фазы (**НФ**), представляющие собой силикагели, модифицированные полиэтиленгликолем, пентафторфенилом, меркаптоэтанолом. Вводят также триазольные группы, различные аминогруппы. Существует также большой класс силикагелевых (и не только) НФ для ВЭЖХ, где модификаторами основной матрицы выступают крупные синтетические полимеры. Например, полигидроксиметилакрилаты, акриламиды, полистиреновые сульфокислоты, 3-(метакриламидопропил)триалкоксисилан т.д.

В работе [29] в качестве модификатора поверхности использовали поли(2-гидроксиэтил-метакрилат). Полученную НФ применяли для разделения некоторых фенолов и аминов в режиме КЭХ. Колонка для КЭХ, где в качестве модификатора использовали 3-[2-(2-аминоэтиламино)этиламино]пропил-триметоксисилан, была успешно применена для разделения четырёх основных белков – трипсин, рибонуклеаза А, лисозим и цитохром С. Разделение осуществили за 13 мин с эффективностью колонки 87000 – 110000 ТТ/м. На данной колонке были также разделены 7 ароматических кислот с эффективностью 186000 – 245000 ТТ/м за 15 мин [30]. 6 ароматических кислот за 15 мин разделено на колонке с модификатором 3-(фениламино)пропил]триметоксисиланом [31]. Пять ароматических аминов было разделено



на НФ для КЭХ, представляющей собой кварцевую капиллярную колонку, модифицированную блок-сополимером, полученным из стирена и ангидридом малеиновой кислоты. Разделение было достигнуто за 25 мин [32].

6 пептидов разделили за 12 мин на силикагеле, модифицированном 2-метакрилоксиэтилфосфорохлорином. Отмечена более высокая стабильность сорбента по сравнению с пептидным анализом на исходном силикагеле. Более того после модифицирования повысилась воспроизводимость времён удерживания аналитов [33].

Существуют также случаи использования различных методов иммобилизации синтетических полимеров, в том числе полиэлектролитов, на поверхность силикагеля с целью создания НФ для обращённо-фазовой хроматографии. Помимо более привычных иммобилизаций ковалентным связыванием или адсорбционно есть и менее редко встречающиеся способы: иммобилизация с помощью микроволнового и гамма-излучения [34–36], термическая иммобилизация [37]. Полученные сорбенты демонстрируют высокую устойчивость, в том числе в сильно щелочных средах. В работе [36] за 5 мин разделяют 4 фармацевтических препарата – парацетамол, ибупрофен, лоразепам и альпразолам. Эффективность колонки, заполненной цирконизированным силикагелем, модифицированным полиметилтетрадецилсилоксаном, достигала 68000 ТТ/м.

Монолитные колонки рассматривают как альтернативу заполненным колонкам для капиллярной жидкостной хроматографии. При изготовлении монолитных колонок активно применяют синтетические полимеры. Монолиты на основании полимеров стали привлекать еще больший интерес в связи с разнообразием реагентов и доступных методик для их получения. Однако полимерные монолитные материалы содержат маленький процент мезопор в структуре и, как следствие, имеют маленькую площадь поверхности.

В работе [38] проводили модифицирование силикагелевой матрицы гидрофильным полимерным материалом для разделения полярных фенольных соединений. Полимерный материал получали путем радикальной сополимеризации стеарилметакрилата и поли(этиленгликоль)метилового эфира метакрилата.

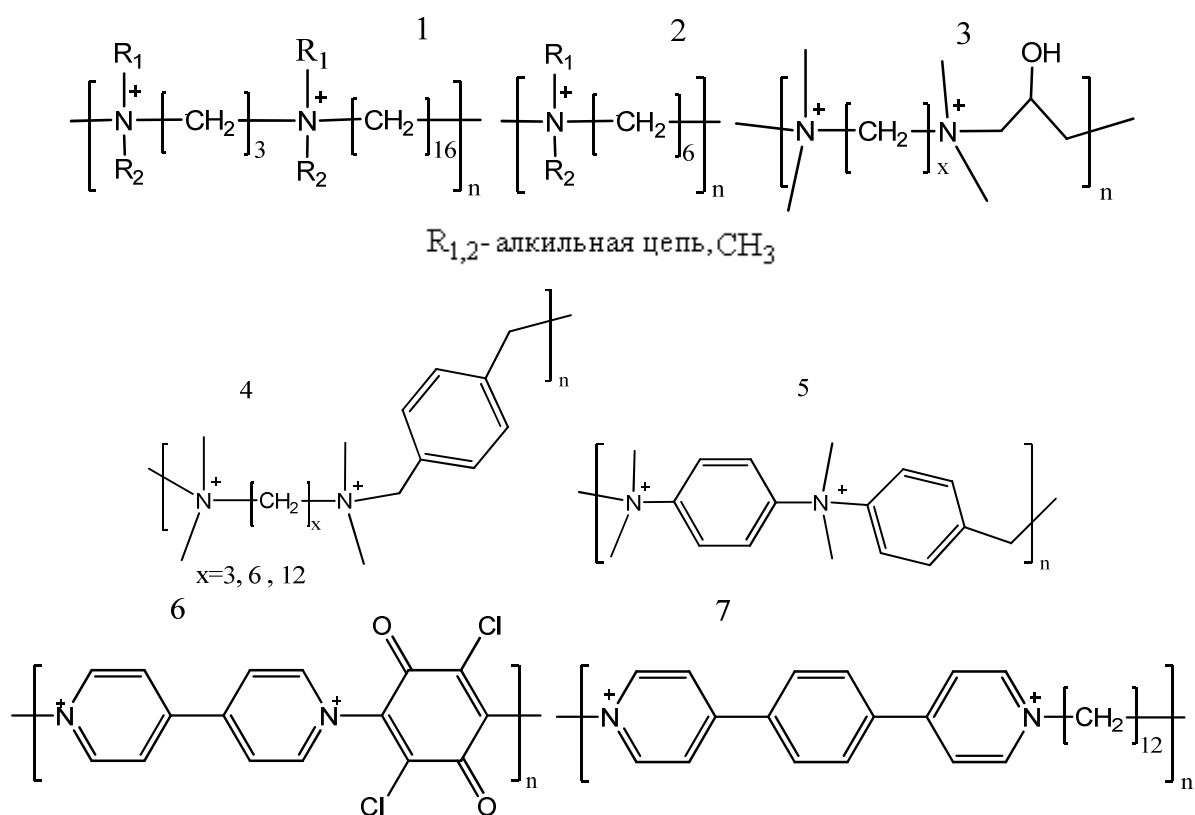
Для оценки вклада гидрофильного фрагмента в составе НФ в разделение сравнивали поведение фенолов на двух колонках: силикагель, модифицированный гидрофобным стеарилметакрилатом и синтезированный монолит. Введение полиэтиленгликольных групп привело к увеличению факторов удерживания для полярных соединений. Лучшая селективность разделения фенолов была достигнута на полученной монолитной стационарной фазе. Предполагают, что наличие гидрофильного фрагмента в составе НФ приводит к

возникновению диполь-дипольных взаимодействий между полярными функциональными группами аналитов и НФ, в результате чего увеличивается время удерживания исследуемых полярных соединений.

Монолитные колонки применяют в разных режимах хроматографии – обращённо-фазовой (**ОФ ВЭЖХ**), ионной, хиральной, гидрофильной, “хроматографии смешенного типа” (mixed-mode). Отсюда и разнообразие областей применения. Разделение фармпрепаратов, их изомеров, пептидов, неорганических анионов [39, 40], пищевая промышленность [41] – это лишь основные из полного перечня применения таких сорбентов. Однако синтез зачастую непрост и отличается долгой длительностью. Кроме того, в основном монолитные колонки уступают по эффективности колонкам, заполненным сорбентом (особенно при высоких скоростях потока).

### 2.1.1. Сорбенты, модифицированные ионенами

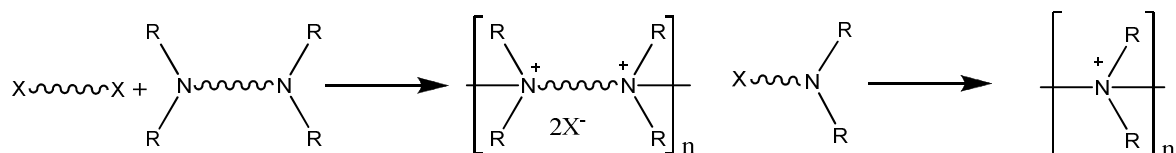
Среди синтетических полимеров в качестве модификаторов силикагелей и прочих матриц большое внимание стали привлекать четвертичные аммониевые соли – ионены. Они входят в группу полибренов. Это полимеры, содержащие четвертичный атом азота в главной цепи, расположенный напротив бокового заместителя (рис. 6).



**Рис. 6.** Примеры различных типов ионенов. 1 – 3 – алифатические ионены, 4, 5 – ароматические и жесткоцепные ионены, 6, 7 – ионены с жесткоцепными блочными фрагментами.

Существует огромное количество синтезированных ионенов. Условно их можно разделить на следующие группы: алифатические, жесткоцепные, ароматические и ионены более сложного строения, имеющие в своей структуре жесткоцепные блоки. В литературе уже описано много существующих методов их получения и продолжают появляться новые.

Наиболее распространёнными являются следующие схемы. Реакция между бис-третичным амином и дигаллогенидом, самоконденсация аминоалкильных галогенидов и реакция бис-третичных аминов (или вторичных аминов, чаще всего – диметиламина) с эпихлоргидрином в присутствии соляной кислоты. Первая из них представлена на рис. 7.



**Рис. 7.** Одна из основных схем получения ионенов.

Свойства ионенов, как и всех полимеров, сильно зависят от их молекулярной массы, низкомолекулярного противоиона (чаще всего это бромид-ион). Стоит отметить, что алифатические ионены с небольшими метильными фрагментами хорошо растворимы в воде. В водных растворах они проявляют типичные свойства полиэлектролитов.

Методом спектроскопии плазмонного резонанса установлено, что такие ионены способны образовывать ПЭК (“симплексы”) с противоположно заряженными крупными молекулами. Кроме того такого рода слои достаточно хорошо упорядочены. Напротив, более гидрофобные ионены принимают конформацию глобулы, могут вести себя как мицеллы [42].

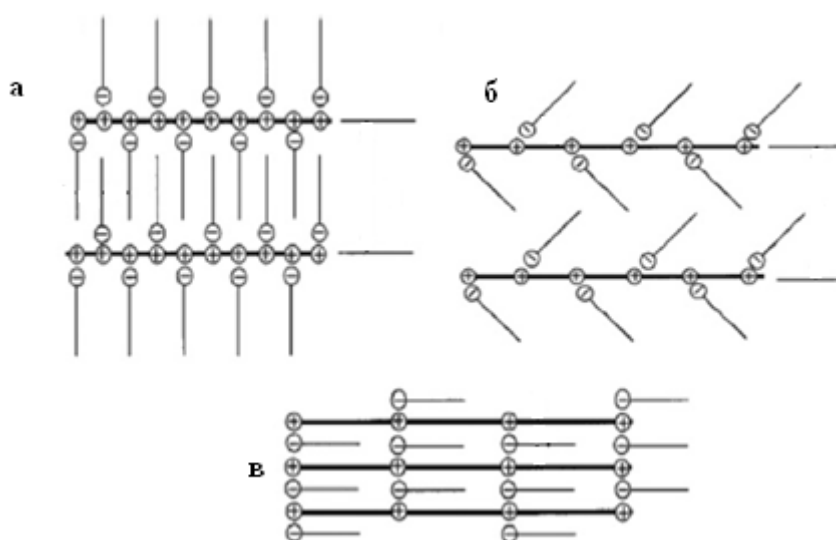
Как известно, распределение плотности заряда вдоль цепи – это параметр, который определяет многие свойства полиэлектролитов. Возрастающий интерес к ионам начинался с того, что они привлекли внимание к себе равномерной плотностью заряда по всей макромолекулярной цепи. Как указано выше, в случае алифатических полимеров с ростом длины метиленовой цепи заместителя азота ионен начинает вести себя скорее как ПАВ, нежели полиэлектролит [43].

За счёт вышеописанных свойств ионены нашли большое применение в аналитической химии, в частности в сепарационных методах. Существуют работы по иммобилизации ионена на противоположно заряженные поверхности с целью создания стационарных фаз для ВЭЖХ. Например, ароматический ионен **4** наносили на полистиреновую матрицу. Аналогичные работы проделывали и с алифатическим ионеном **1** (рис. 6).

В литературе имеются данные по первому использованию ионена в качестве модификатора бентонитовой глины для создания нанокомпозитного материала [44]. Такое

модифицирование улучшает смачивание полученного материала. Автор использует высокомолекулярный ионен вместо низкомолекулярной четвертичной соли азота, объясняя это следующим образом. Для высокомолекулярных ионенов отмечают большую термоустойчивость (материалы прочны при более высоких температурах) и стойкость к окислению воздухом.

Существуют примеры образования высокоорганизованных, стехиометрических комплексов 3,3-, 6,4-, 6,6-, 6,12- и 12,12-ионенов с сульфобетаином (цвитеррионное соединение). В данном случае задействованы электростатические свойства этих соединений. На рис. 8 представлены схемы полученных комплексов. Они довольно отличаются между собой в зависимости от электронной плотности цепи ионена [45].

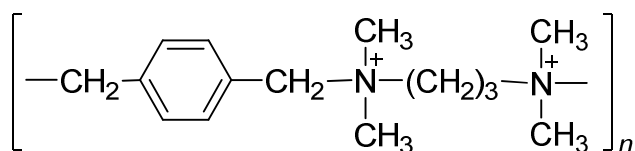


**Рис. 8.** Схема пространственного расположения сульфобетаина и ионена при образовании комплекса в зависимости от плотности шаря ионена. а) 3,3-ионен, б) 6,4- и 6,6-ионен, в) 6,12- и 12,12-ионен [45].

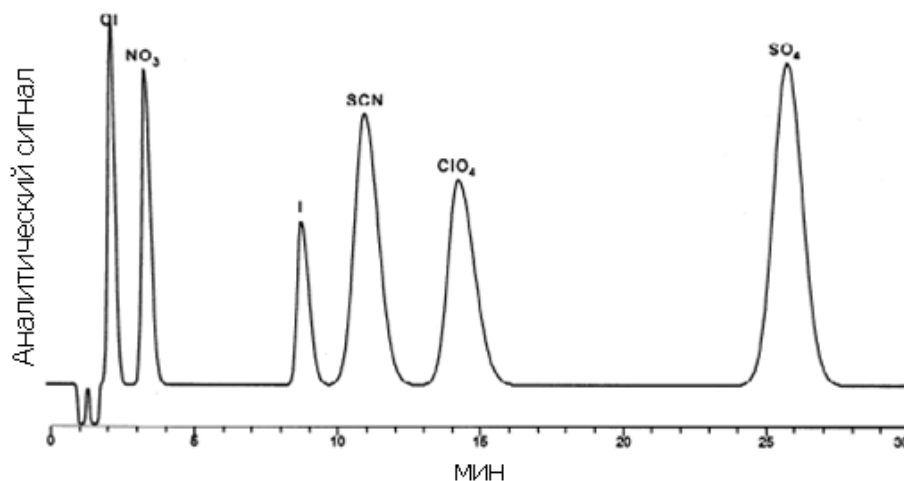
Способность ионенов к образованию ПЭК – один из факторов, определивших их использование в сепарационных методах. Сорбенты для хроматографии, модифицированные ионеном, обладают интересными хроматографическими свойствами, поскольку им присущ смешанный механизм разделения. Более того, их можно последовательно модифицировать различными полиэлектролитами. Это позволяет легко и достаточно просто изменять свойства сорбента. Становится возможным одновременное разделение нейтральных, основных и кислотных соединений на одном сорбенте. Можно привести несколько работ по таким системам в ионной хроматографии (ИХ) и КЭ. Исключительно мало сорбентов для ВЭЖХ, содержащих ионены, описано в литературе. Практически нет работ по сорбентам для ВЭЖХ на основе ПЭК ионенов с каким-либо полимером.

Большое количество матриц для получения полиэлектролитных сорбентов с алифатическими ионенами использовали в работе [46]. Различные силикагели модифицировали промежуточными агентами (додецилбензосульфокислота (ДДБС), динонилнафтолдисульфокислота, краситель Конго красный), после чего наносили 2,4-, 3,4-, 2,8-, 3,8-, 3,6-, 4,6-, 6,8- или 6,10-ионен. Из многочисленных сорбентов наиболее перспективными авторы сочли сорбенты на основе матриц Silasorb C18 – ДДБС и Silasorb-S без покрытия промежуточным агентом. На данных матрицах было достаточное количество прочно закреплённых  $SO_3$ -групп, необходимых для дальнейшего закрепления на поверхности ионенов с образованием ПЭК. Однако в процессе исследований были выбраны сорбенты на основе матрицы Silasorb-S, как более устойчивой и обладающей более высокой ионообменной ёмкостью (0.08 мМ/г против 0.06 мМ/г). В работе исследовали хроматографическое поведение неогранических ионов на сорбентах, модифицированных вышеуказанными алифатическими ионенами. Авторы классифицируют сорбенты на три группы по признаку длины углеродных фрагментов ионена (больше или меньше 5). С ростом длины углеродных фрагментов в ионене у сорбента повышается селективность по отношению к гидрофобным ионам (например,  $SCN^-$ ) и снижается по отношению к гидрофильным. Т.е. если для сорбентов с 3,6- и 4,4-ионенами более выражено разделение неорганических анионов за счёт электростатических взаимодействий, то в случае 6,8- и 6,10-ионенов наблюдается более значительных вклад гидрофобных взаимодействий. Стоит отметить, что чем короче звенья ионенов, тем большего времени требует разделение ионов.

Позднее эта же научная группа исследовала и ароматические ионены для создания ионообменных материалов. Такие НФ сравнивали с ионообменниками на основе алифатических ионенов в работе так же на примере неорганических анионов [47]. Установлена некоторая связь селективности ионообменника и структуры входящего в его состав полимера. Схожими с этой точки зрения оказываются жесткоцепные ароматические ионены и алифатические короткоцепочные ионены с высокой плотностью заряда. Оценка селективности также была произведена на примере ароматических кислот. В таком случае сорбенты с ароматическими ионенами проявляют большую селективность по сравнению с алифатическими. Это связано с возможностью  $\pi$ - $\pi$  – взаимодействий таких сорбентов с аналитами. Ниже приведена формула 3-X-ионена (рис. 9) и типичная хроматограмма неорганических анионов на анионообменнике на основе материала Silasorb-S и 3-X-ионена (рис. 10).



**Рис. 9.** 3-Х-ионен в обозначениях работы [47].



**Рис. 10.** Разделение неорганических анионов на ионообменнике Silasorb-S, модифицированном 3-Х-ионеном. Колонка: 50×3 мм. Подвижная фаза (ПФ): 0.3 мМ раствор гидрофталата калия (рН 6.9). Детектирование косвенное при  $\lambda = 256$  нм. F = 1.0 мл/мин [47].

Материалы на основе таких анионообменников для ИХ, КЭ и КЭХ [48]. Описаны стационарные фазы на основе ароматических и 2,4-, 2,10-, 2,5-, 3,6- и 4,6-ионенов. В качестве промежуточного модификатора поверхности (полимерной матрицы) выступала ДДБС. Для них наблюдали высокую стабильность в работе. Ещё раз подчёркивается сильная связь свойств сорбентов и структуры используемого ионена. В случае иммобилизации ионенов небольшого размера (вышеуказанные) полученные НФ обладали ионообменными свойствами.

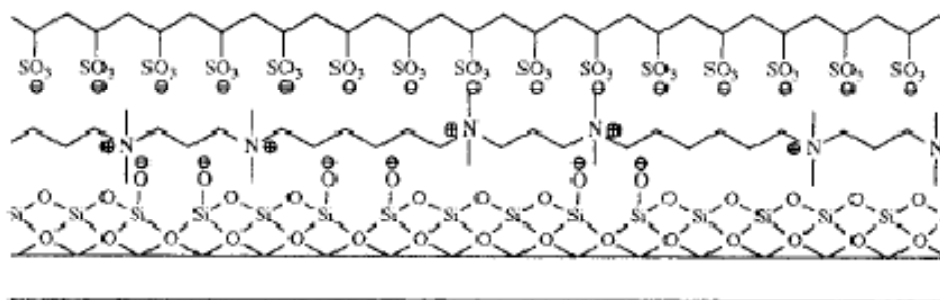
Позднее было изучено нанесение ароматических и алифатических ионенов на полимерные матрицы на основе полистиренбензола и дивинилбензола с дальнейшим аминированием или сульфированием [50, 51]. При изучении поверхности матриц авторы приходят к выводу, что отрицательные ионы не удерживаются на таких фазах с ионеном, если структура частиц матрицы хорошо покрывается ионеном. В таком варианте весь положительный заряд ионена нейтрализуется. Если же частицы матрицы имеют более сложную трёхмерную структуру (например, плёночные латексные сита), то ионены не могут полностью покрыть их поверхность, в результате чего часть их положительного заряда на поверхности остаётся.

Одной из немногих работ по созданию сорбентов для адсорбционной ВЭЖХ на основе ионенов была статья [52]. Авторы получили два гидрофобных сорбента: 3,16- и 3,22-ионены наносили на предварительно аминированный силикагель. Это более крупные и гидрофобные алифатические ионены по сравнению с описанными выше. Закрепление модификаторов происходило за счёт образования ковалентных связей азот-углерод. Авторы провели ряд тестов для оценки гидрофильно-гидрофобных свойств сорбентов, количества остаточных силанольных группы и отмечают высокую гидрофобность сорбентов. Преимущественно их рекомендуют использовать в ОФ ВЭЖХ. Однако их хроматографическое поведение оказывается весьма интересным и в других режимах хроматографии.

Описан сорбент для КЭХ на основе сульфированного силикагеля и 2,10-ионена [53]. Коммерчески доступный сорбент Exsil-100 SCX динамически модифицировали 2,10-ионеном. Впервые такой сорбент авторы называют полиэлектролитным, подчёркивая образование ПЭК 2,10-ионена и сульфогрупп силикагеля в капиллярной колонке.

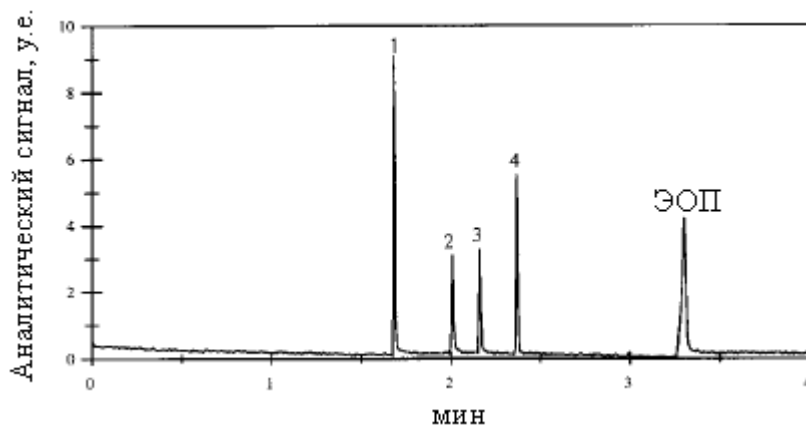
Анионообменные свойства полученной НФ оценивают на примере шести карбоновых кислот в режиме КЭ и КЭХ. Последний вариант оказывается более удачным по селективности. Капиллярная колонка, заполненная таким сорбентом, обладает высокой эффективностью (до 12000 ТТ/м). В подобранных условиях предел обнаружения кислот составил 2 – 5 мкг/мл. Как о недостатке подобной системы, авторы упоминают о необходимости наличия не менее 0.1 % по массе ионена в подвижной фазе (ПФ) и фоновом электролите (ФЭ) для достаточной воспроизводимости времён удерживания кислот.

В работе [54] обсуждаются разные виды динамических покрытий в КЭ, в том числе полибрены. Описаны капилляры, на стенках которых нанесён бислоем какого-либо синтетического полимера (например, поливинилсульфонат) и полибрена (рис. 11).



**Рис. 11.** Схема полиэлектролитного покрытия полибренном и поливинилсульфонатом стенок кварцевого капилляра в КЭ [55].

Полученные покрытия стабильны в широком диапазоне рН (2 – 10). Основную причину этого авторы видят в наличии слоя синтетического полимера. В приведённых примерах полибрен непременно присутствует в ФЭ. Пример разделения основных соединений в полученной системе приведён на рис. 12.



**Рис. 12.** Электрофореграмма 1 – имидазола, 2 – N-бензилметиламина, 3 – фенолпропаноламина, 4 – тербуталина. Капилляр: 55/46.8 см×50 мкм. ФЭ: 25 мМ NaCl в 5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 2.00).  $U = +25$  кВ,  $\lambda = 214$  нм [55].

Полиэлектролитные плёнки сульфата декстрана и полибрена применительно к КЭ и мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) впервые описаны в работе [56]. В работе подчёркивается преимущество такого полиэлектролитного покрытия по сравнению с ковалентным нанесением модификатора на стенки капилляра. Более того, авторы рекомендуют не менее двух слоев модификатора для создания стабильного капиллярного покрытия. Капилляр исследуют на примере разделения изомеров крезола (МЭКХ) и аминокислот (КЭ). Отмечено многократное увеличение воспроизводимости времён миграции у такого капилляра по сравнению с немодифицированным кварцевым капилляром. Также наблюдалось 1.5 – 3-кратное повышение воспроизводимости времён миграции после нанесения второго слоя сульфата декстрана на модифицированный полибренном капилляр.

К аналогичным выводам приходят авторы работы [57], получившие капилляр, модифицированный полибренном и сульфатом декстрана, в динамических условиях. Работа была посвящена исследованию стабильности покрытия и сравнению с результатами, полученными в обычном кварцевом капилляре. Стоит отметить, что и здесь требовалось наличие модификатора в ФЭ (0.01 %). Отмечается повышение стабильности электроосмотического потока (ЭОП), воспроизводимости времён миграции модельных



соединений (протеины и лекарственные препараты). Однако не приводятся удовлетворительных хроматограмм по разделению всех 6 изучаемых соединений.

Данные по описанным капиллярам для КЭ и стационарным фазам для хроматографии обобщены в табл. 1.

## 2.2. Использование полисахаридов в сепарационных методах

Распространённые представители полисахаридов в сепарационных методах – гепарин, декстран, декстрин, хитозан, целлюлоза и большое множество их производных. Полисахариды обладают хиральностью, и поэтому используются в качестве хиральных селекторов в различных методах разделения, особенно в КЭ.

Впервые энантиораспознавательная способность природных ионных полисахаридов была исследована в 1994 г. для гепарина [58]. В зависимости от источника повторяющимся звеном гепарина может быть ди-, тетра- или гексасахарид, состоящий первоначально из остатков L-идуроновой или D-глюкуроновой кислот и D-глюкозаминных остатков, соединённых через  $\alpha(1\rightarrow4)$  связи. Его молекулярная масса лежит в диапазоне 10000 – 30000 Да. Вследствие такого типа связей гепаринобладает спиральной структурой рис. 13.

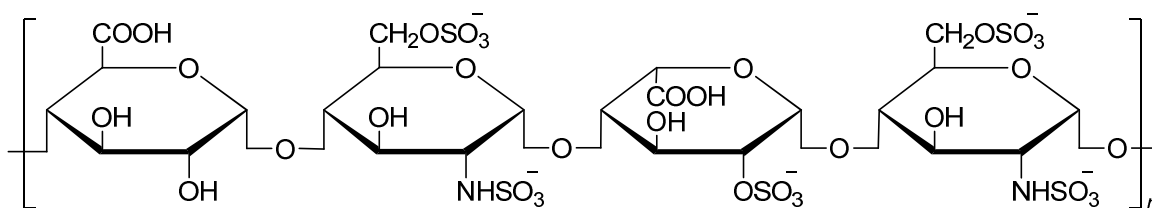


Рис. 13. Структурная формула гепарина.

Применение гепарина в КЭ позволяет разделять энантиомеры антималярийных (хлорокин, примакин, мефлокин), антигистаминных (хлорфенирамин, доксиламин, диметинден) лекарственных препаратов, блокаторов кальциевых каналов (дилтиазем, клентиазем) и других веществ. Энантиомеры всех разделенных соединений содержат не менее двух атомов азота, причем один из них в ароматическом кольце, однако наличие азота в кольце и в алкильной цепи еще не является достаточным условием для энантиоразделения при использовании гепарина. Энантиоселективность гепарина по отношению к конкретному соединению определяется, как и для других хиральных селекторов, действием нескольких факторов: гидрофобностью соединения, размером молекулы, доступностью хирального центра.

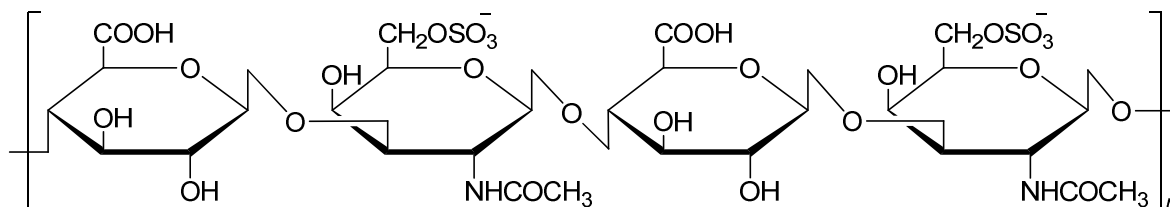
**Таблица 1.** Стационарные фазы для хроматографии и капилляры для КЭ, содержащие ионены.

Метод	Матрица	Модификаторы	Разделяемые соединения	Условия	Эффективность колонки (капилляра), ТТ/м	Ссылки
КЭ	Кварцевый капилляр	Полибрен, поливинилсульфонат	Имидазол, N-бензилметиламин, фенилпропаноламин, тербуталин	25 мМ NaCl в 5 мМ КН <sub>2</sub> РO <sub>4</sub> (рН 2.00); U = +25 кВ, λ = 214 нм		[55]
	Кварцевый капилляр	Полибрен, СД	Белки, аминокислоты	Фосфатный буферный раствор (ФБ) (рН 2.4; рН 7.4; I = 0.05); U = +9 кВ	520000	[56]
	Кварцевый капилляр	Полибрен, СД	Сывороточный альбумин человека, его комплекс с ибупрофеном	67 мМ буферный раствор, U = +9.5 кВ, λ = 200 нм		[57]
	Кварцевый капилляр	2,4-ионен, 3,6-ионен, 2,10-ионен	Неорганические анионы	5 мМ Н <sub>2</sub> СrO <sub>4</sub> + 1 мМ ионена (доведено до рН 7.7 буферным раствором ТРИС); U = -15 кВ	120000	[47]
	Кварцевый капилляр	3,6-ионен	Комплексы металлов с 4-(2-пиридилазо)резорцинолом	5 мМ К <sub>2</sub> СrO <sub>4</sub> + 0.05% 3,6-ионена (рН 8.9); U = -28 кВ; λ=254 нм,	400000	[50]
МЭКХ	Кварцевый капилляр	Полибрен, СД	Изомеры крезола	ФБ (рН 2.8; I=0.05), 100 мМ ДСН		[57]
КЭХ	Exsil-100 SCX	2,10-ионен	<i>n</i> -гидроксibenзойная, салициловая, бензойная, <i>o</i> -бромбензойная, <i>n</i> -аминосалициловая, <i>n</i> -аминобензойная кислоты	0.1 % раствор 2,10-ионена в 1 мМ дигидрофосфате калия (рН 6.4) / AcN (90:10). U = -20 кВ; λ = 254 нм	120000	[54]
ВЭЖХ	Аминопропил-силикагель	3,16-ионен/3,22-ионен	Изомеры фенил-фенола	Метанол/вода (65:35), λ = 254 нм		[52]

<b>ИОХ</b>	Silasorb-S	2,4-, 3,4-, 2,8-, 3,8-, 3,6-, 4,6-, 6,8-, 6,10-ионены	Неорганические анионы	0.3 мМ гидрофталата калия (рН 6.8); детектирование косвенное при $\lambda = 254$ нм	15000	[46]
	Silasorb-S	(2НР-8-ионен с гидроксильными группами, 3- Х-, 6-Х ионены, ароматические (Ph-Х-ионены), виологен*	Неорганические анионы	0.3 мМ гидрофталата калия (рН 6.9); детектирование косвенное при $\lambda = 256$ нм		[47]
	Silasorb-S	ДДБС, ионены: 2,4-, 3,6-, 4,6-, 6,8-, 3,Х-, DP,Х-ионены*	Неорганические анионы	2 мМ бензоат аммония (рН 5.45)	1000000	[48]

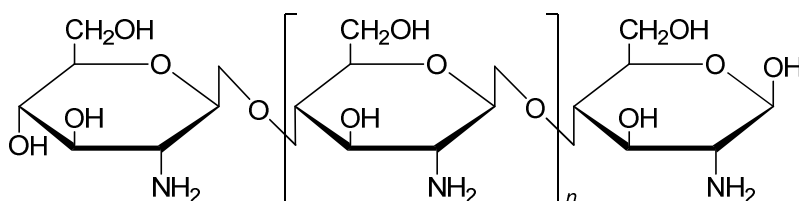
\*Структурные формулы вместе с обозначениями приведены в статье

Другая группа активно используемых полисахаридов в КЭ – сульфаты хондроитина. Среди сульфатов хондроитина (А, В, С) наиболее универсальным хиральным селектором является сульфат хондроитина С (рис. 14). Сульфаты хондроитина (20000 – 50000 Да) состоят из остатков *N*-ацетилгалактозамина и *D*-глюкуроновой кислоты, попеременно связанных  $\beta$  (1→4) и  $\beta$  (1→3) связями, на дисахаридный остаток приходится одна сульфогруппа.



**Рис. 14.** Структурная формула сульфата хондроитина С.

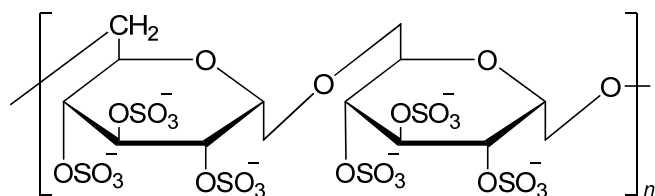
Хитозан – полиаминосахарид, то есть вещество, молекула которого содержит в себе большое количество аминогрупп. Он является хорошим катионом, так как аминогруппы могут связывать ионы водорода, тем самым приобретая излишний положительный заряд.



**Рис. 15.** Структурная формула хитозана.

Полисахариды – популярные сейчас модификаторы для получения полярных НФ для хроматографии (в том числе хиральных) [59–63]. Есть немало случаев применения катионных полисахаридов и их производных в качестве компонента для создания ионообменников [64–66], модификаторов кварцевых капилляров или добавок в ФЭ в КЭ [67–69] и различных матриц в хроматографии [70, 71]. Анионные полисахариды сейчас более активно используются в КЭ для разделения полярных молекул и их энантиомеров [57, 72–79].

Сульфат декстрана (СД) состоит из остатков *D*-глюкозы, соединенных  $\alpha$ (1→6) связями, содержащих три сульфогруппы на один моносахаридный остаток (рис. 16). Таким образом, особенностью СД является отсутствие гидроксильных групп в его структуре по сравнению с гепарином.



**Рис. 16.** Структура сульфата декстрана.

Российские ученые химического факультета МГУ изучали возможность применения высокомолекулярного СД в качестве хирального селектора в КЭ. СД обеспечивает успешное разделение азотсодержащих соединений и их энантиомеров. Кроме того, было установлено, что факторы, определяющие энантиораспознавание СД, характерны для любых полисахаридных хиральных селекторов. Также подтверждено, что высокомолекулярный СД является лучшим хиральным селектором, нежели низкомолекулярный при энантиораспознавании антигистаминных препаратов [78–80].

Что касается хроматографии, СД также хорошо себя зарекомендовал в качестве лиганда для иммуносорбентов в плазмафореze (диализ) [81, 82]. Ещё одним примером подобных сорбентов может служить силикагель, модифицированный сульфированным циклофруктаном [83]. В работе [84] описан силикагель, модифицированный 6-циклофруктаном. На данном сорбенте разделены смеси нуклеиновых кислот, нуклеозидов,  $\beta$ -блокаторов, салициловой кислоты и ее производных при элюировании ПФ следующего состава: AcN/20мМ NH<sub>4</sub>Ac (рН 4.00 ) (80:20).

Циклодекстрины (ЦД) – это циклические олигосахариды, состоящие из  $\alpha$ -D-глюкозы, соединенной через  $\alpha$ -1,4-связи. Впервые Армстронг использовал химически связанный  $\beta$ -ЦД, как стационарную фазу для гидрофильной хроматографии и с тех пор подобные сорбенты активно используют в хроматографии.

В работе [85] свойства НФ для гидрофильной хроматографии на основе природного  $\beta$ -ЦД изучены на примере разделения таких полярных соединений, как нуклеозиды и фенольные кислоты. Показано, что сорбент обладает хорошей селективностью и стабильностью. В течение 6 месяцев не наблюдалось изменений в значениях времен удерживания и эффективности колонки. На полученной НФ разделена смесь из 9 нуклеозидов за 14 минут.

Одна из областей применения иммобилизации полисахаридов—создание полиэлектролитных хроматографических сорбентов. Такеути с сотрудниками [86–90] синтезировали НФ для ионной хроматографии с помощью динамического модифицирования аминированного силикагеля анионными полисахаридами (сульфат хондроитина, гепарин, СД).

Хорошо известно, что анионные полисахариды обладают способностью образовывать ПЭК с положительно заряженными полиэлектролитами. Это даёт возможности модифицировать поверхности, используя простую методику последовательного послойного нанесения полиэлектролитов-модификаторов. Модифицирование происходит в основном за счёт электростатических и специфических взаимодействий между полиэлектролитами. Характерной чертой таких сорбентов является их сильная устойчивость. Стоит подчеркнуть, что образование любыми полиэлектролитами ПЭК придаёт им новые свойства, которые у самих по себе полиэлектролитов отсутствуют. [60, 91]. При всей своей привлекательности такие системы с участием анионных полисахаридов мало изучены в хроматографии. Свод данных по описанным в этой главе сорбентам приведён в табл. 2.

**Таблица 2.** Стационарные фазы для сепарационных методов, содержащие природные полисахариды и их производные.

Метод	Матрица	Модификаторы	Разделяемые соединения	Условия	Эффективность колонки (капилляра), ТТ/м	Воспроизводимость времён миграции/ удерживания/ электрофоретической подвижности, %	Ссылки
КЭ	Кварцевый капилляр	Хитозан (динамическое покрытие и добавка в ФЭ)	Неорганические анионы	25 мкг/мл хитозана в 10 мМ Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (рН 4.00); U = -20 кВ, λ = 215 нм	178000		[67]
	Кварцевый капилляр	Хитозан (динамическое покрытие и добавка в ФЭ)	Карбоновые кислоты; оптические изомеры 2-фенилпропановой кислоты	22 мМ ацетатный буферный раствор (АБР) (рН 5.4); 0.1% хитозана	122900		[68]
	Кварцевый капилляр	СД, полибрен	Лекарственные препараты	67 мМ буферный раствор, U = +9.5 кВ, λ = 200 нм		0.61 (μ)	[57]
	Кварцевый капилляр	Коломниевая кислота, полибрен	Лекарственные препараты, их энантиомеры	20 мМ ФБ (рН 4.0), 9% кислоты; U = 8 кВ; λ = 259 нм		1.1 (t <sub>m</sub> )	[74]
	Микрочип (полидиметил-силоксан)	СД	Исследовали влияние модифицирования на ЭОП	1) 3% СД в 20 мМ ФБ (рН 3.0 - 10.0) 2) 3% СПВ в 10 мМ ФБ (рН 3.0 - 10.0)		1)7.4 (μ) 2)6.6 (μ)	[76]
	Кварцевый капилляр	СКПХ (добавка в ФЭ)	Энантиомеры лекарственных препаратов	10 мМ АБР (рН 5.3), 2 % СКПХ, U = 12 кВ, λ = 214 нм			[77]
	Кварцевый капилляр	СД (добавка в ФЭ)	Энантиомеры лекарственных препаратов	10 мМ ФБ, 2% СД, рН 6.8. U= 20 кВ			[78]

	Кварцевый капилляр	Наночастицы целлюлозы, модифицированные октадецилсиланом (добавка в ФЭ)	Белки	0.3 мг/мл целлюлозы в 25 мМ ФБ (рН 8.0); U = -15 кВ, $\lambda = 210$ нм	227000		[69]
	Кварцевый капилляр	Сульфированный $\beta$ -ЦД (S- $\beta$ -ЦД) (добавка в ФЭ)	Энантиомеры лекарственных препаратов	40 мМ ФБ (рН 2.5), 1.5 % S- $\beta$ -ЦД; U = -20кВ			[80]
КЭХ	Матрица, полученная из золь-гель смеси триметоксисилана, полиэтиленгликоля в 0.01 М уксусной кислоте при 300 °С	$\beta$ -ЦД, $\gamma$ -ЦД	Производные ДНК, изомеры крезолы	50 мМ МЕС–Трис буферный раствор (рН 7.0)/метанол (70:30); U=-18 кВ	50000		[70]
	Матрица, полученная из золь-гель смеси триметоксисилана, полиэтиленгликоля в 0.01 М уксусной кислоте при 300 °С	<i>трис</i> (3,5-диметил-фенилкарбонат) целлюлозы	Нейтральные и основные соединения	2 мМ ФБ (разные рН)/(40:60; 64:40). 2мМ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> в ацетонитриле /10мМ диэтилацетат (рН 9.60) (40:60)	230000		[70]
ИОХ	TSKgel IC-Anion-SW	Сульфат хондроитина С	Неорганические анионы	10 мМ Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , $\lambda = 220$ нм		0.7-1.2	[86]
	TSKgel IC- Anion-SW	1) Сульфат хондроитина С 2) Сульфат хондроитина А	Неорганические анионы	0.05 мМ винной кислоты, $\lambda = 210$ нм		0.2-0.5	[88]
	TSKgel IC- Anion-SW	СД	1) Неорганические анионы 2) Комплексы катионов металлов	1) 1.5 мМ раствор хлорида трис(2,2'-бипиридил) рутения 2) 6 мМ раствор CuSO <sub>4</sub> ; $\lambda = 210$ нм		1.9-2.7	[89]



	TSKgel IC- Anion-SW	Гепарин	Неорганические анионы	20 мМ раствор BaCl <sub>2</sub> , 0.1 % гепарина, λ = 210 нм			[90]
	1) TSKgel IC- Anion-SW 2) QAE-3SW	Гепарин	Энантиомеры аминокислот	1) 30 мМ АБР (рН 5.5) / ацетонитрил (80:20); λ = 214 нм; 2) 10 мМ фосфат калия (рН 5.0) / ацетонитрил (90:10); λ = 214 нм			[87]
<b>ВЭЖХ (ОФ)</b>	CHIRALCEL OD-R	<i>трис</i> (3,5-диметилфенилкарбонат) целлюлозы	Оптические изомеры апоморфина	0.05M NaClO <sub>4</sub> *HClO <sub>4</sub> (рН 2.0)/ацетонитрил (65:35), λ = 273 нм		0.3-6.9	[59]
	CHIRALCEL OJ-R	<i>трис</i> (4-метилбензоат) целлюлозы	Оптические изомеры прометазина	0.5M NaClO <sub>4</sub> (рН 2.0) /ацетонитрил (63:37), λ = 249 нм	19300	3-8	[59]
	3-аминопропилсиликагель	<i>трис</i> (4-метилфенилкарбонат) целлюлозы / <i>трис</i> (3,5-диметилфенилкарбонат) целлюлозы (1:1, в мольном соотношении)	Оптические изомеры лекарственных препаратов	<i>n</i> -гексан/этанол (70:30)	20000		[62]
	Силикагель	Производные амилозы и целлюлозы	Энантиомеры лекарственных препаратов				[71]
<b>ВЭЖХ (НФ, ОФ)</b>	Silasorb S 300	СКПХ	Лекарственные препараты и их энантиомеры	0.1 % раствор триэтиламинацетата в метаноле	16400		[63]
<b>Гидрофильная хроматография</b>	Fruhc-N CF6 Larihc CF6-P	Циклофруктан-6 изопропилкарбамат циклофруктана-6	Белки	АСN/20 мМ АБР (рН 4.00) (88:12)			[84]

	силикагель (после модифицирования-SCF6)	Сульфированный циклофруктан 6	1) Бета-блокаторы, 2) Аминокислоты, 3) Витамины	1) ACN/20мМ АБР (рН 4.0), (70:30), $\lambda = 254$ нм; 2) ACN/20 мМ АБР (рН 4.0), (90:10), $\lambda = 254$ нм; 3) ACN/20мМ АБР (рН 5.7) (90:10), $\lambda = 254$ нм			[83]
	Силикагель	$\beta$ - ЦД	Аминокислоты	А - 10 мМ ацетат аммония в смеси ACN/вода (95:5); Б – 10 мМ водный раствор ацетата аммония. Градиент: 0 – 8 мин 10% → 16% Б, 8 – 15мин 16% → 40% Б			[85]

## 2.3. Использование наночастиц золота в капиллярном электрофорезе и высокоэффективной жидкостной хроматографии

### 2.3.1. Общие сведения о наночастицах золота

Наночастицами называют частицы размером до 100 нм. В последние годы активно изучают и применяют в разных областях науки наночастицы различных редко-земельных и благородных металлов, таких как золото, серебро, платина и т.д. [92–97]. Наночастицы золота (НЧЗ) являются наиболее популярными из них [98]. Пристальное внимание к НЧЗ объясняется особенностями их электронной структуры. Валентные электроны золота покидают свои атомы и образуют зону проводимости. Они и определяют необычные свойства наночастиц [99, 100]. Особое внимание уделяется изучению формирования самоорганизованных слоёв различных соединений на поверхности НЧЗ, которое происходит путем самосборки [101, 102]. Это один из определяющих факторов для применения НЧЗ в сепарационных методах.

Основными задачами при синтезе наночастиц сейчас являются:

- получение НЧЗ с различными размерами, формой и узким распределением по размерам (свойства наночастиц сильно зависят от их размера)
- поиск новых стабилизаторов частиц

Путём варьирования природы стабилизатора и его количества можно регулировать размер и дисперсность образующихся наночастиц и даже их устойчивость во времени.

В качестве стабилизаторов используют избыток восстановителя, а также специально вводимые вещества, например, ионогенные ПАВ (ДСН или хлорид лаурилтриметиламмония), ионные жидкости [103], синтетические и природные полимеры – полиэтиленамин [104], полиэтиленгликоль [105], поливинилпирролидон, хитозан [106], ЦД, протеины [107] и т.д.

Сейчас существует бесчисленное множество методов получения НЧЗ, их список постоянно расширяется. Химическое восстановление  $\text{HAuCl}_4$  в растворе – наиболее популярный и удобный метод получения НЧЗ (в водных растворах и в органических растворителях) [99]. Из основных химических методов получения НЧЗ в растворе отметим следующие:

1. Метод Туркевича, который заключается в восстановлении  $\text{HAuCl}_4$  цитрат-ионами в водном растворе.
2. Двухфазный микроэмульсионный метод Бруста-Шиффрина для синтеза частиц маленького размера (~2 нм).
3. Метод получения наночастиц золота в обращенных мицеллах.

### 2.3.2. Создание материалов с наночастицами золота

НЧЗ активно используют не только в свободном виде, но и в составе разнообразных наноматериалов, полученных их закреплением на носителе. Такие материалы сохраняют все уникальные химические и физические свойства наночастиц в сочетании с достоинствами самой матрицы. Использовать микроструктуры с иммобилизованными наночастицами удобнее, чем использовать наночастицы в свободном состоянии. При закреплении на носителе наночастицы теряют свою подвижность, что способствует их дополнительной стабилизации.

Особое внимание привлекает создание новых стационарных фаз для различных вариантов жидкостной хроматографии [108].

Это обусловлено следующими факторами:

- возможность получения адсорбентов с более развитой поверхностью. Чем меньше размер наночастиц, тем выше в большинстве случаев адсорбционная площадь поверхности полученных материалов;
- возможность получения НФ с более однородной поверхностью особенно там, где используются наночастицы однородные по размеру; возможность изменения пористой структуры сорбента, чтобы уменьшить вклад сопротивления массопереносу в эффективность колонки;
- повышение и (или) изменение селективности, благодаря уникальным и разнообразным адсорбционным свойствам наночастиц;
- возможность смены лигандов, стабилизирующих наночастицы, которая позволяет легко модифицировать поверхность для получения новых (заданных) адсорбционных свойств;
- возможность улучшения / изменения в механических свойствах или химической устойчивости сорбентов.

При получении новых сорбентов наночастицы, которые синтезированы предварительно, могут быть иммобилизованы двумя путями: с помощью химической пришивки либо в результате электростатических или более слабых физических взаимодействий. Кроме того, некоторые типы наночастиц (т.е. металла и оксидов металлов) могут быть синтезированы непосредственно на поверхности.

Химическое модифицирование может быть выполнено с помощью силанизации поверхности, внедрения бифункциональных соединений и путем золь-гель процесса [108–110]. Силанизация поверхности сорбентов является общим подходом для иммобилизации наночастиц на материалы на основе диоксида кремния, где силанольные группы поверхности носителя

подвергают взаимодействию с алкоксисиланом, содержащим определенную полярную группу (тиол, amino, и т.д.). Аналогичным образом бифункциональные соединения могут быть использованы для введения наночастиц, выступая в качестве связующего звена между различными наночастицами и поверхностью носителя [111, 112]. Иммобилизация наночастиц с помощью золь-гель процессов, как правило, включает обработку носителя кислотами или щелочами для активации полярных групп на поверхности, поликонденсацию гидролизованных продуктов алкоксисиланов с уже активированными группами матрицы и последующее закрепление наночастиц на полученную поверхность. Этот метод используется преимущественно для введения на поверхность наночастиц металлов.

Электростатические взаимодействия широко используются для иммобилизации заряженных наночастиц на подложке с противоположным зарядом. Так иммобилизуют либо стабилизированные различными лигандами наночастицы металлов либо латексные наночастицы. Можно использовать Ван-Дер-Вальсовы или гидрофобные взаимодействия, но они слабее, чем электростатические, поэтому используются реже [113–115]. Менее редки в использовании следующие методы иммобилизации: химическое окисление (непосредственно на матрице), гидротермическое выращивание; жидкофазное, электрохимическое или безэлектродное размещение или потенциостатическая анодизация [109, 116].

Совокупность таких уникальных свойств силикагеля как жесткость матрицы, химическая инертность, большая удельная поверхность, возможность варьирования в широких пределах структурных характеристик и легкость функционализации позволяет широко использовать его в качестве стационарной фазы в ВЭЖХ. С точки зрения получения новых сорбционных материалов перспективным является модифицирование поверхности силикагеля НЧЗ, стабилизированными различными органическими соединениями. Сейчас можно привести примеры таких материалов практически для всех видов хроматографии и КЭ [99, 117, 118]. Поэтому рассмотрим применение НЧЗ в этих методах.

### **2.3.3. Применение наночастиц золота в капиллярном электрофорезе**

НЧЗ получили широкое применение в качестве модификаторов кварцевых капилляров в КЭ. Впервые в таком варианте их использовали в 2001 году в виде стабилизированных цитратом частиц, позже – для модифицирования стенок кварцевого капилляра со стабилизатором хлоридом полидиаллилметиламмония (ПДМА). После модифицирования капилляров прецизионность времён миграции сильно возрастает. Отмечено, что таким образом удастся добиться высокой эффективности капилляра и повысить чувствительность определения

самых разных аналитов. В некоторых случаях наблюдали и повышение селективности [119–121].

НЧЗ, адсорбированные на полимерах, активно используют в медицине для разделения методом КЭ фрагментов ДНК, протеинов, нейротрансмиттеров [99, 122].

Исследовано влияние НЧЗ, стабилизированных цитратом или меркаптопропионатом, на скорость электроосмотического потока (ЭОП) и селективность разделения структурных изомеров ароматических кислот, оснований и ароматических аминов соответственно [123]. В обоих случаях наблюдали повышение прецизионности результатов и эффективности капилляров.

В кварцевом капилляре были разделены аминокислоты с разрешением до 4.7. Также удалось разделить энантиомеры для некоторых из них. В ФЭ добавляли НЧЗ, химически модифицированные тиолированным  $\beta$ -ЦД [124]. Эффективность капилляра достигала 240000 ТТ/м.

Случай применения НЧЗ, стабилизированных ферментами, для иммобилизации на внутреннюю поверхность капилляра описан в работе [125].

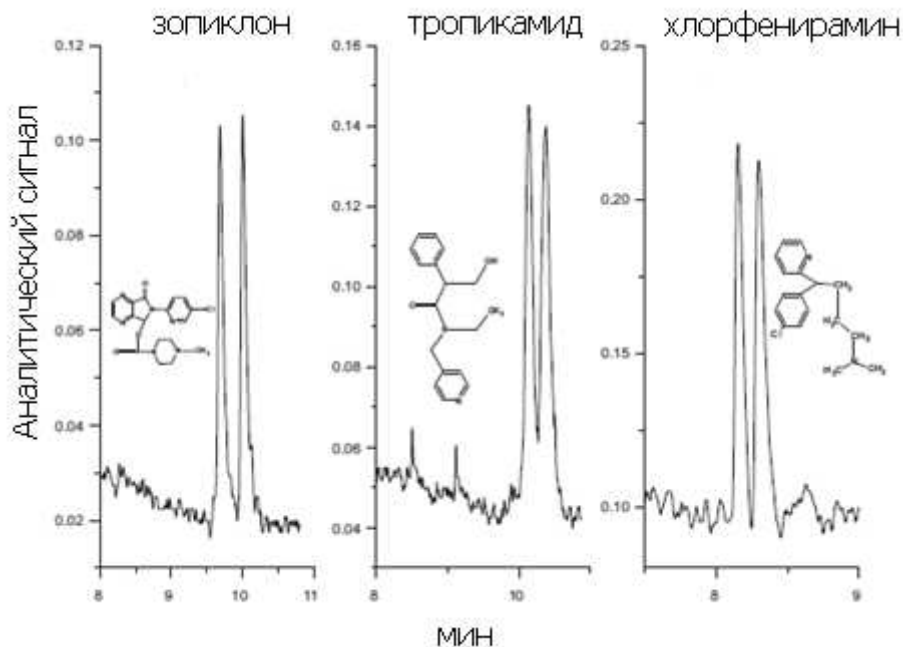
Изготовление микрочипов для КЭ путём синтеза НЧЗ прямо на поверхности чипа представлено в работе [126]. НЧЗ, стабилизированные цитратом натрия, используемые в [126], были применены в другом варианте микрочипа для разделения гормонов [127]. Авторы также приходят к выводу об увеличении разрешения пиков и повышении чувствительности определения аналитов на модифицированном НЧЗ микрочипе по сравнению с исходным микрочипом.

#### **2.3.4. Применение наночастиц золота в капиллярной электрохроматографии**

Что касается КЭХ, здесь работ по созданию псевдостационарных фаз ещё больше, чем в варианте капиллярного зонного электрофореза. НЧЗ сейчас широко применяются в этом режиме хроматографии. Из всех наночастиц они наиболее популярны в связи с доступностью, устойчивостью и хорошей совместимостью с биомолекулами для образования полислоёв на поверхности какого-либо материала [128]. Зачастую поверхности модифицируют исходя из хорошей склонности к образованию ковалентных связей между золотом и серой [129], золотом и азотом [130], подбирая соответствующие лиганды.

НЧЗ, модифицированные  $\beta$ -ЦД, в работе [131] использовали в качестве стационарной фазы для КЭХ. В случае нанесения частиц на капилляр стабильность системы, и ЭОП в частности, повышается по сравнению с их добавкой в ФЭ.

Для энантиоразделения зопиклона, тропикамида и хлорфенирамина использовали капиллярную колонку для КЭХ, модифицированную НЧЗ, функционализированными ЦД. При нанесении одного такого слоя наночастиц на кварцевую поверхность удалось разделить энантиомеры каждого из лекарственных препаратов за 8 – 10 мин (рис. 17).



**Рис. 17.** Разделение энантиомеров фармпрепаратов на капиллярной колонке, модифицированной НЧЗ, стабилизированными  $\beta$ -ЦД. ФЭ: 12.5 мМ ФБ (рН 3.0) [131].

В работе [132] получена монолитная колонка для КЭХ, представляющая собой силикагель модифицированный НЧЗ и октадекантиолом (Silica-GNPs-C18). Такие НЧЗ интересны для модифицирования поверхностей силикагелей из-за способности поддерживать самоорганизованные полислои с органическими молекулами, содержащими SH-группы, путем образования ковалентных связей между серой и золотом.

В качестве модельных соединений использовали фенолы различного строения. Хорошее разделение фенолов достигнуто за 12 минут при использовании ПФ состава: 25 мМ ФБ (рН 7.0)/CH<sub>3</sub>ОН (85:15).

Авторы [133] изучили влияние НЧЗ, модифицированных полиэтиленоксидом (ПЭО), на разделение кислотных и основных протеинов методом КЭХ. ПЭО добавляют к НЧЗ для предотвращения агломерации и агрегации частиц, он стабилизирует НЧЗ благодаря наличию гидрофобных фрагментов. При этом остаются доступными его гидрофильные фрагменты, за счет которых и осуществляется взаимодействие с аналитами. К примеру, эффективность

капилляра, модифицированного только НЧЗ, составляла 450000 ТТ для лизоцима, в то время как эффективность капилляра, модифицированного НЧЗ – ПЭО составила более 1000000 ТТ.

Перейдём к областям хроматографии, где НЧЗ применены и изучены в меньшей степени.

### **2.3.5. Применение наночастиц золота в газовой хроматографии**

В газовой хроматографии (ГХ) применение НЧЗ впервые было описано в 2003 году. Кремниевая колонка была покрыта монослоем НЧЗ, модифицированных додекантиолом. ГХ можно рассматривать как дополнительный метод для изучения новых синтезированных НЧЗ: можно оценить адсорбционные способности частиц и их удерживание в колонке [134]. Эффективность колонки при разделении 8 анализируемых соединений (алканов, спиртов, кетонов и ароматических соединений) на колонке с НЧЗ оказалась сопоставима с коммерческой колонкой АТ–1 (эффективности 6200 ТТ/м и 5700 ТТ/м для синтезируемой и коммерческой колонок соответственно).

Однако недостатком таких НФ является необходимость их использования в интервале температур 30 – 150°C, что связано с разрушением НЧЗ с додекантиолом при более высоких температурах.

Позднее при модифицировании кварцевых колонок такими же частицами разных по диаметру капилляров (50 – 100 мкм) изучали влияние степени покрытия капилляра наночастицами на хроматографические свойства получаемых колонок [135, 136].

Для создания полярных стационарных фаз НЧЗ пробовали модифицировать 4-хлорбензотиолом и 4-(трифторметил)бензотиолом вместо додекантиола. При этом степень покрытия составила почти 100%, и капиллярные колонки получались достаточно селективными по отношению к определяемым полярным соединениям.

Позже в 2008 году появился простой метод получения высокоэффективных колонок для капиллярной ГХ на основе НЧЗ с октадециламином (4.5 нм) [137]. Колонки такого типа используют в ГХ для разделения низкомолекулярных спиртов, ароматических соединений и т.д. Селективность разделения некоторых пар соединений была выше в капилляре, модифицированном НЧЗ, по сравнению с неполярной полисилоксановой колонкой DB–1 при его эффективности в диапазоне от 400 до 2500 ТТ/м.

### **2.3.6. Применение наночастиц золота в высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Если работ по модифицированию капиллярных колонок для КЭХ достаточно много, то количество литературы по колонкам для жидкостной хроматографии по-прежнему ограничено.



Одной из ранних работ в этом направлении было исследование Ортиза с сотрудниками, которые ковалентно закрепляли (1-меркаптоундецил)диэтиленгликоль на НФ, модифицированную НЧЗ [138]. Эта идея была развита позднее в более детальном исследовании различий в селективности между стационарными фазами похожего типа и октодецилсилановыми НФ [139]. Авторы использовали коммерчески доступную колонку с НЧЗ, стабилизированными полистироном (5 мкм). После модифицирования *n*-октадекантиолом, тиофенолом или 2-фенилэтантиолом полученными “монослойными” сорбентами заполнили кварцевые капилляры (внутренний диаметр – 150 мкм). На этих колонках изучали удерживание различных ароматических соединений. В качестве ПФ использовали смесь метанол–вода или метанол–ацетонитрил, после чего результаты сравнивали с коммерческой НФ Develosil ODS–5 (5 мкм). Поучена лучшая селективность разделения для колонок с тиоловыми НЧЗ для антрацена, фенантрена и молекул меньшего размера по сравнению с коммерческой колонкой. Однако асимметрия пиков была больше, что можно связать с взаимодействием аналитов и внутренней поверхностью колонки.

Аналогичным образом авторы статьи [140] получали монослои бычьего сывороточного альбумина (БСА) на силикагеле, модифицированном НЧЗ. Поверхность силикагеля изначально функционализировали при помощи 3-меркаптопропилтриметоксисилана (МПТМС), затем модифицировали посредством НЧЗ и иммобилизировали БСА через 3-меркаптопропионовую кислоту (МПК), образующую амидные связи с молекулами БСА. Полученную НФ использовали для разделения оптических изомеров дансил-норвалина при элюировании смесью 30 мМ ФБ (рН 7.4) и метанола в соотношении 95:5.

Не так давно в Китае использовали частицы золота размером 4 – 15 мкм для модифицирования пористого силикагеля с размером частиц около 1 мкм [141]. Силикагель предварительно аминировали, а потом *n*-октадекантиоловые частицы золота наносили на полученный силикагель посредством замещения лигандов в них. Эффективность колонки с полученным сорбентом и его селективность по отношению к некоторым ароматическим соединениям оценивали в режимах ОФ ВЭЖХ и КЭХ. Наибольшая эффективность в режиме ОФ ВЭЖХ была отмечена для бензола (до 61000 ТГ/м). Хотя система не очень адаптирована для высоких давлений и скоростей потока, авторы высказывали предположение, что добиться большей эффективности возможно.

Позднее эти же исследователи модифицировали микросферы золота октадецилтиолом и полученным материалом заполнили капиллярную колонку (внутренний диаметр 100 мкм) для ОФ ВЭЖХ [142]. На этот раз колонка отличалась высокой химической (140 ч работы при рН

12) и механической стабильностью (выдерживала давление до 52 МПА). Данное исследование подтвердило хорошую селективность сорбента по отношению к ароматическим углеводородам, как уже утверждалось в работе [139]. Также было продемонстрировано, что сами по себе частицы золота не удерживают подобных соединений. Удерживание ароматических углеводородов наблюдается только после модифицирования частиц золота слоем С18.

В работе [143] описан интересный подход получения монолитной капиллярной колонки для ВЭЖХ. Авторы стремились повысить степень заполнения пор поверхности полимерного монолита. Сама полимерная матрица была получена сшиванием глицидилметакрилата и этилендиметакрилата. Сначала монолит модифицировали цистеином, а потом – трис(2-карбоксиэтил)фосфином. Наконец в полученную систему вводили НЧЗ. В работе применяли НЧЗ разного размера в диапазоне 5 – 40 нм. Во всех случаях наблюдали неагрегированные гомогенные монослои НЧЗ на поверхности монолита. Интересно, что максимальное закрепление золота было получено для частиц размером 40 мкм (более 60 %). Поверхность стационарных фаз функционализировали 1-октантиолом или 1-октадекантиолом. Полученные сорбенты использовали для разделения белков в режиме ОФ ВЭЖХ (капиллярной). Наилучшего разделения удавалось достичь в случае частиц золота размером 15, 20 и 30 нм, поскольку эти частицы покрывали поверхность полимера максимально.

Редкие случаи попыток создать монолиты из золотых, а не кремниевых частиц упомянуты в обзоре [144]. Несколько работ посвящены исследованию сорбентов с НЧЗ для гидрофильной хроматографии [145–147]. Описан случай создания гидрофильного материала для извлечения полигликопептидов из биологических образцов на основе оксида графена, модифицированного полиэтиленимином, L-цистеином и НЧЗ [148]. Данные по сорбентам для основных сепарационных методов с применением НЧЗ обобщены в табл. 3.

На химическом факультете МГУ ведутся исследования по получению новых НФ, модифицированных НЧЗ, интересные результаты были получены в кандидатской диссертации Поляковой Я.А. [149]. Синтезированы силикагели, модифицированные НЧЗ, стабилизированными цитрат-ионами, цистеином и хитозаном. На новых сорбентах получены хорошие результаты при разделении аминопиридинов, нитроанилинов, ряда триазольных пестицидов, и производных гидразина, метилгидразина и несимметричного метилгидразина с 2,3-нафталиндикарбоксальдегидом [150–153]. Продемонстрирована возможность использования сорбентов и для разделения энантиомеров некоторых  $\beta$ -блокаторов. Синтезированы также сорбенты с НЧЗ, стабилизированных L-цистеином, на основе силикагеля, функционализированного  $\text{NH}_2$ - и SH-группами. Они являются полярными и позволяют

разделять высокополярные соединения, например, витамины. На синтезированном сорбенте  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Au-L-цистеин}$  можно проводить разделение смесей витаминов С, В3, В12, В5 в изократическом режиме элюирования за 8 мин и смеси витаминов В1, В2, В6, В10 за 12 мин.

Была проведена иммобилизация БСА и макроциклического антибиотика ванкомицина на силикагель, предварительно функционализированный МПТМС и цитратными НЧЗ. На полученных сорбентах проведено энантиоразделение ряда  $\beta$ -блокаторов: атенолола, надолола, пиндолола, метопролола, окспренолола, альпренолола. Результаты исследования сорбентов, модифицированных НЧЗ, полученные в лаборатории хроматографии на кафедре аналитической химии, суммированы в табл. 4. Представленные данные свидетельствуют о перспективности такого класса НФ для ВЭЖХ.

**Таблица 3.** Стационарные фазы для сепарационных методов, содержащие наночастицы золота.

Метод	Матрица	Модификаторы	Разделяемые соединения	Условия	Эффективность колонки (капилляра), ТТ/м	Воспроизводимость времён миграции/ удерживания/ фактора удерживания/электрофоретической подвижности, %	Ссылки
КЭ	Кварцевый капилляр	1) поли(диаллилдиметил) хлорид аммония (ПДАДМА)/НЧЗ, стабилизированные цитратом натрия 2) НЧЗ, стабилизированные 3- меркаптопропионатом (динамическое покрытие + добавка в ФЭ)	Структурные изомеры фенола и толуола	0.014 нМ НЧЗ в 0.02 АБР (рН 5); U = 10 кВ, $\lambda=254$ нм	1) – 2) 18600	1) 1–1.5( $t_m$ ) 2) 0.5( $t_m$ )	[119]
	Кварцевый капилляр	НЧЗ, стабилизированные цитратом натрия (добавка в ФЭ)	Токсины ракообразных	10.0 мМ боратный буферный раствор/1.0 мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> / 1.0% поливинилпирролидон (рН5.0), U = 15 кВ	460000	2.8–6.5( $t_m$ )	[120]
	Кварцевый капилляр	НЧЗ, стабилизированные цитратом натрия (добавка в ФЭ)	Рокситромицин	10 ФБ (рН 8.00): трис(2,2'- бипиридилхлорид) рутения (II) / НЧЗ (0.7); U = 14 кВ.		1.12 ( $t_m$ )	[121]
	Кварцевый капилляр	Поливинилпирролидон/ смесь ПЭО и НЧЗ, стабилизированных цитратом натрия	Фрагменты ДНК	0.2% ПЭО (0.36 НЧЗ). ПЭО (0.36 НЧЗ) готовили из смеси 25.0 мМ глицина, 0.01 мМ НЧЗ и 0.5 мг/мл бромида этидия.	318000	3.17–5.37 ( $t_m$ )	[122]

	Микрочип из полидиметил-силоксана	Полиэтиленимин/НЧЗ, стабилизированные цитратом натрия (динамическое покрытие)	Гормоны	30 мМ ФБ (рН 7.0); U = +0.8 кВ	161000	2.5	[127]
	Микрочип из сополимера БСА и полидиметил-силоксана (ПДМС)	ПДМС–НЧЗ (синтез непосредственно на чипе)	Белки	20 мМ боратный буферный раствор (рН 9.2); U = 1 кВ		3.83	[126]
КЭХ	Кварцевый капилляр	НЧЗ, модифицированные β-ЦД (добавка в ФЭ)	Аминокислоты и их энантиомеры	1.0/1.4 мг/мл НЧЗ в 50 мМ боратном буферном растворе (рН 8.0 для нейтральных аминокислот и рН 9.0 для отрицательно заряженных); U = 15 кВ; λ = 360 нм	240000		[124]
	Кварцевый капилляр	(ПДАДМА)/НЧЗ, модифицированные β-ЦД (динамическое модифицирование)	Энантиомеры лекарственных препаратов	12.5 мМ ФБ (рН 3.0); U = 15кВ; λ = 214 нм	140000	4.8(μЭоп)	[131]
	Монолитная силикагелевая колонка	НЧЗ, стабилизированные октадекантиолом (покрытие)	Фенолы	25 мМ ФБ (рН 7.0)/CH <sub>3</sub> ОН (85:15); U = 20 кВ, λ=230 нм	128000	0.7 (t <sub>m</sub> )	[132]
	Кварцевый капилляр	НЧЗ, стабилизированные ПЭО (динамическое модифицирование)	Белки	0.05% ПЭО в 25мМ ФБ; U = -8 кВ; λ=220 нм (косвенное детектирование)	1000000	0.6 (t <sub>m</sub> )	[132]

<b>ИХ</b>	Монолитная колонка на основе сополимера полиглицидил-метакрилата и этилендиметакрилата	L-Цистеин/НЧЗ, стабилизированные цитратом натрия (синтез в колонке/промывка колонки раствором таких частиц)	Белки	А – 0.02 М ФБ (рН 7.9); Б – 1 М хлорида натрия в фазе А. Градиент: 0–60 % Б до А за 3.5 мин; $\lambda=210$ нм.			[145]
<b>ОФ ВЭЖХ</b>	Кварцевая капиллярная колонка	НЧЗ, стабилизированные полистироном, модифицированные n-октодекантиолом	Неполярные ароматические соединения	Ацетонитрил/вода (50:50), $\lambda=254$ нм			[139]
	Капиллярная колонка	Мекрkapто-триметоксисилан/НЧЗ, стабилизированные цитратом натрия/БСА	Энантиомеры дансил-норвалина	30 мМ ФБ (рН 7.4)/ MeOH (95:5)		1.32 ( $t_R$ )	[140]
	Аминированный силикагель (капиллярная колонка)	НЧЗ, стабилизированные октадекантиолом	Неполярные ароматические соединения	MeOH/H <sub>2</sub> O (70:30); $\lambda=254$ нм	61200	2.70-6.81 ( $k'$ )	[141]
	Силикагель	НЧЗ, стабилизированные октадекантиолом	Неполярные ароматические соединения	AcN/вода (45:55). $\lambda=254$ нм	62000	3.62-4.10	[142]
	Монолит на основе глицидил-метакрилата и этиленди-метакрилата	Цистамин/ трис(2-карбоксиитил)фосфин /НЧЗ коллоидный раствор/n-октадекантиол	Белки	А – 0.1 % водный р-р трифторуксусной кислоты, В – 0.1 % трифторуксусной кислоты в ацетонитриле, градиент от 20 до 70 % Б до А за 20 мин, F = 1.0 мкл/мин, $\lambda= 210$ нм			[143]
<b>НФ ВЭЖХ</b>	Силикагель	НЧЗ, стабилизированные L-цистеином	Аминопиридины	Гексан/изопропанол (90 : 10), $\lambda = 230$ нм			[151]

<b>Гидрофильная хроматография</b>	Монолит из сополимера глицидилметакрилата и этилендиметакрилата	Цистеин / гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина/ азобисизобутиронитрил/ НЧЗ (золото помещали в поры монолита)	Пептиды и нуклеотиды	А – 10 мМ ФБ (рН 2.8), Б – 10 мМ ФБ (рН 2.8)/ацетонитрил, (5:95). Градиент: 100 – 60% Б в А за 10 мин, $\lambda=214$ нм	19000		[146]
	Монолит на основе сополимера 4-метилстирена, винилбензилхлорида, дивинилбензола	Цистеин/ гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина /НЧЗ/полиэтиленимин/ НЧЗ (в порах монолита)	Белки	А – 10 мМ ФБ (рН 2.8), Б – 10 мМ ФБ (рН 2.8)/ацетонитрил, (5:95). Градиент: 100 – 60% Б в А за 10 мин, $\lambda=210$ нм	51000		[147]

**Таблица 4.** Стационарные фазы для ВЭЖХ, содержащие наночастицы золота, синтезированные и изученные в лаборатории хроматографии химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

Сорбент	Иммобилизовано модификатора	Режим ВЭЖХ, состав ПФ	Разделяемые соединения	Эффективность, ТТ/м	Разрешение
SiO <sub>2</sub> -Au- L-цистеин	15.9 мкг /1 г SiO <sub>2</sub>	НФ Гексан-изопропанол ОФ (ацетонитрил-110 мМ Н <sub>3</sub> РO <sub>4</sub> ПО (ацетонитрил-МеОН-триэтиламин-СН <sub>3</sub> СООН	Нитроанилины, пиридины триазольные пестициды  производные гидразинов Энантиомеры альпренолола, окспренолола	2000-4000 3000-4000  10000-20000  4000	1-4 0.5-1  1-2.3  0.5
SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> -Au- L-цистеин	2.8 мг /1 г SiO <sub>2</sub>	НФ Гексан-изопропанол ОФ (ацетонитрил-АБР)	Нитроанилины, пиридины, триазольные пестициды.  Витамины С, В1, В2, В3, В12, В5, В6, В10	3000-12000 1000  2000-3000	1-4 0.5  1-2
SiO <sub>2</sub> -S-Au-L-цистеин	10.3 мг /1 г SiO <sub>2</sub>	НФ Гексан-изопропанол	Нитроанилины, пиридины Диниконазол, тебуконазол, пропиконазол, дифеноконазол.	5000-20000	1-4
ССД-Au-L-цистеин	0,18 мг/1 г ССД	ОФ (ацетонитрил-ФБ)	Энантиомеры индопрофена, кетопрофена, ибупрофена, фенопрофена, флурбипрофена	3000-5000	0.5-0.8
SiO <sub>2</sub> -S-Au-S-COOH-ванкомицин	51 мкмоль/г SiO <sub>2</sub>	ОФ (Ацетонитрил-ФБ или АБР)	Энантиомеры надолола, атенолола, метопролола, алпренолола, окспренолола, пиндоллола	8000-16000	0.6-1.0
SiO <sub>2</sub> -S-Au-S-COOH-эремоницин	21 мкмоль/г SiO <sub>2</sub>	ОФ (МеОН-0.5%Н <sub>3</sub> РO <sub>4</sub> )	Энантиомеры пиндоллола, атенолола, эпинефрин Диастереомеры фенотерола	7000 8000 800 1000	0.2 0.2 0.9 1.4
SiO <sub>2</sub> -S-Au-S-COOH-азитромицин	11 мкмоль/г SiO <sub>2</sub>	ОФ (ацетонитрил-ФБ или АБР) и ПО (ацетонитрил-0.5%Н <sub>3</sub> РO <sub>4</sub> )	Тестовые вещества не удерживаются	-	-
SiO <sub>2</sub> -S-Au-S-COOH-БСА	70 мг/1 г SiO <sub>2</sub>	ОФ (изопропанол-ФБ)	Энантиомеры надолола, пиндоллола, метопролола и окспренолола	6000-14000	0.5-1.0



### Глава 3. Разделение и определение азотсодержащих соединений сепарационными методами

Как известно, область применения хроматографических методов бесконечно большая. Наиболее часто хроматография используется в медицине, фармакологии и пищевой промышленности.

В фармакологии и медицине зачастую стоят задачи определения содержания лекарственного препарата либо его чистоты (в том числе энантиочистоты). В пищевой промышленности всегда актуально использование консервантов, усилителей вкуса, подсластителей и т.д. Контроль наличия и содержания таких соединений в пищевых продуктах был и остаётся задачей, которую приходится выполнять химикам-аналитикам в самых разных отраслях, связанных с пищевой промышленностью. В связи с вышесказанным остановимся подробнее на данных классах соединений. Рассмотрим аналитические методы, которые применяются в фармакологии и пищевой промышленности для решения описанных задач.

Многие лекарственные препараты представляют собой азотсодержащие соединения, к ним относятся  $\beta$ -блокаторы,  $\alpha$ -адреномиметики, H-блокаторы и т.д.  $\beta$ -блокаторы применяют для лечения сердечной аритмии и профилактики после инфаркта миокарда. Они улучшают способность сердца к расслаблению, проявляют успокаивающий неврологический эффект, снижают нервозность и стабилизируют двигательную активность [154].  $\alpha$ -адреномиметики – это препараты, которые стимулируют  $\alpha$ -адренорецепторы, что приводит к сосудосуживающему эффекту, H1-блокаторы-антигистаминные противоаллергические препараты.

Большинство таких соединений содержат в своей структуре ароматические кольца, соединенные с первичными, вторичными и третичными  $\text{NH}_2$ -группами, OH-группами, что обуславливает их полярный характер. Для разделения азотсодержащих соединений или их энантиомеров, а также определения содержания таковых в матрицах различной природы чаще всего используют электромиграционные и хроматографические методы анализа [155–157]. Последнее десятилетие активно используют КЭ [158–161], КЭХ и МЭХХ.

В работе [162] проводили определение  $\beta$ -блокаторов в образцах мочи методом КЭХ с масс-спектрометрическим детектированием в режиме ионизации электрораспылением. Разделение осуществляли на монолитной колонке на основе силикагеля (100 мкм, 50 см). Элюирование проводили смесью  $\text{AcN}/\text{NH}_4\text{Ac}$  (80:20) с pH буферного раствора 6.0. Предложенный способ определения  $\beta$ -блокаторов позволяет достичь высокой эффективности колонки и чувствительности определения фармпрепаратов при короткое времени разделения. Разделение ибупрофена, фенопрофена, напроксена, флурбипрофена, миндальной кислоты,

офлоксацина, 3-(бензилоксикарбонил)-4-оксазолидинкарбоновой кислоты и их энантиомеров приведено в работе [163].

Определение антидепрессантов и  $\beta$ -блокаторов в сточных водах методом МЭКХ с гидродинамическим вводом при высоких давлениях описано в работе [164]. В методике присутствовал дополнительный этап – жидкость-жидкостная экстракция. Степень извлечения определяемых веществ лежала в диапазоне 77 – 113 %. Нижняя граница определяемых содержаний для хлорфенирамина, нотриптилина, имипрамина, доксепина, пропраналола, лабеталола, альпренолола составила 7 – 27 нг/мл, стандартные отклонения времён удерживания, площадей пиков и высот пиков составили менее чем 3.2 %, 7.8 % и 4.5 % соответственно.

В работе [165] для определения атенолола, метопролола и эсмолола использовали метод КЭ с электрохемолюминисцентным детектором (ЭХЛ). Предложенный метод позволяет получить низкие пределы обнаружения, которые составили 0.58 мМ для эсмолола и 0.4 мМ для атенолола.

Методом КЭ с УФ-детектированием получено разделение энантиомеров атенолола, хлорфенирамина, кетокконазола, хлорфиклизина, оксозепама, нефопама (наиболее высокие  $R_s$  для нефопама и хлорфенирамина – 2.01 и 1.19 соответственно). Исследование проводили в кварцевом капилляре, в состав ФЭ входил хиральный селектор–полигалооктуроновая кислота [166]. Несколько лучших результатов добились авторы статьи [167] в аналогичных условиях с другим хиральным селектором – эритромицином в качестве добавки в ФЭ.

Среди вариантов хроматографического разделения наибольшую популярность получили газовая и жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС, ЖХ-МС) [168, 169], высокоэффективная жидкостная хроматография сверхвысоких давлений (УВЭЖХ) [170–172]. Относительно недавно стали появляться данные по применению сверхкритической флюидной хроматографии для разделения азотсодержащих лекарственных препаратов [173–175]. Однако пока широкого распространения для этой цели метод не получил.

Традиционным методом определения следовых количеств  $\beta$ -блокаторов в допинговом контроле является метод ГХ-МС, требующий предварительной дериватизации исследуемых соединений для достижения высокой чувствительности определения. Из литературных данных известно [176], что существует несколько путей дериватизации исследуемых соединений в их летучие аналоги: ацилирование, дериватизация циклическими силильными соединениями, триметилсилилирование (ТМС). В работе [176] авторы определяли шесть  $\beta$ -блокаторов с

помощью метода ГХ-МС с предварительной дериватизацией ТМС, как наиболее эффективного из всех процессов силилирования. Пределы обнаружения для метопролола, пропранолола, пиндолола, атенолола, надолола и ацебуталола составили 1.5, 3.0, 3.0, 6.0, 1.5, 6.0 нг/мл соответственно.

Другие примеры в этой области с получением ТМС-производных определяемых веществ описаны в работах [177, 178]. Стоит отметить, что довольно часто этому методу сопутствует твердофазная экстракция.

В работе [156] авторы сопоставили два метода определения  $\beta$ -блокаторов в образцах мочи: ГХ-МС и ЖХ-МС. В качестве аналитов исследовали пять  $\beta$ -блокаторов: атенолол, пиндолол, надолол, соталол, метопролол. Для определения  $\beta$ -блокаторов методом ГХ-МС использовали HP-5MS капиллярную колонку с предварительной ТМС-дериватизацией. ЖХ-МС-разделение проводили на коммерческой колонке Uptisphere HDD C18 в режиме градиентного элюирования. Использовали диодно-матричный детектор и масс-спектрометр с ионизацией при атмосферном давлении и электрораспылением. Метод ЖХ-МС позволил достичь более высокой чувствительности определения, чем метод ГХ-МС. К тому же, ГХ-МС требует дополнительного времени для проведения дериватизации  $\beta$ -блокаторов в их летучие аналоги.

В работе [181] авторы использовали метод двухколоночной ЖХ с флуоресцентным детектором (ФД) для определения пяти  $\beta$ -блокаторов в сточной воде. Такой подход предполагает наличие системы двух колонок, где на одной колонке происходит очистка аналитов, а на второй – их разделение. Это позволяет повысить чувствительность определения. ФД является более селективным по отношению к азотсодержащим соединениям по сравнению с классическим УФ-детектором, а также более дешевым по сравнению с МС-детектором. Схожие примеры с другим детектированием описаны в работе [182].

В работе [183] авторы проводили определение  $\beta$ -блокаторов с разделением их энантиомеров в сточной воде с помощью метода ЖХ-МС/МС. Определяемые соединения предварительно экстрагировали с помощью микроволновой и твердофазной экстракции. Разделение проводили на двух хиральных колонках: СВН (сорбент на основе целобιοгидролазы) и Chirobiotic V (сорбент с ванкомицином). На второй колонке удалось добиться лучшего разрешения пиков, а также чувствительности определения. Нижние границы определяемых содержаний составили 6.16 и 5.65 нг/мл для атенолола (S- и R-изомеры соответственно), 0.05 и 0.03 нг /мл – для метопролола и 0.07 и 0.09 нг/мл для альпренолола.

Такой метод также успешно использован для определения  $\beta$ -блокаторов в свиной и бычьей почках [184].

Метод активно применяется в сочетании с УФ-детектированием и диодноматричным детектированием (ДМД). В статьях [185–188] описаны такие системы для определения лекарственных препаратов и их метаболитов в масле, еде и на производстве, в лечебных учреждениях.

В работе [189] описано применение метода УВЭЖХ с УФ-детектированием для определения  $\beta$ -блокаторов в моче с предварительным концентрированием. В качестве исследуемых соединений выбрали следующие  $\beta$ -блокаторы: милринон, соталол, метопролол, пропранолол, карведиол. Разделение проводили на коммерческой колонке Hypersil Gold (50×2.1мм) в режиме градиентного элюирования (0.05%  $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{AcN}$ ). Нижние границы определяемых содержаний составляют сотни нг/мл. В литературе существуют и другие примеры определения азотсодержащих препаратов этим методом в пищевых продуктах [190], плазме крови [191] и прочих объектах [192]. Информация по определению азотсодержащих соединений в различных природных объектах основными сепарационными методами сведена в табл. 5.

Подводя итог, следует отметить, что среди всех существующих методов определения азотсодержащих соединений жидкостная хроматография в сочетании с разными способами детектирования является самым эффективным для исследуемого класса веществ. Использование метода ВЭЖХ-МС позволяет достичь низких пределов обнаружения. Однако использование этого метода ограничивается высокой стоимостью аппаратного оформления и эксплуатационных расходов. Результаты метода ГХ-МС сопоставимы с результатами ВЭЖХ-МС, однако недостатком считается необходимый процесс дериватизации исследуемых соединений. Успешное определение азотсодержащих фармпрепаратов может быть проведено и при использовании более дешевых (УФ и ДМД) и селективных по отношению к этому классу соединений детекторов (ФД, ЭХЛ).

**Таблица 5.** Хроматографические и электромиграционные методы определения азотсодержащих соединений в матрицах различной природы.

Метод	Детектор	Неподвижная фаза	Условия	Объект	Определяемые соединения	Предел обнаружения, нг/мл	Нижняя граница определяемых концентраций, нг/мл	Ссылки
КЭ	ЭХЛ	Кварцевый капилляр (50см×50 мкм)	10 мг/мл β-ЦД в 20 мМ ФБ (рН 10.0), U = 9 кВ.	Моча	Эсмолол Атенолол	0.58 0.4		[165]
	ФД	Кварцевый капилляр (47/33.5 см×50 мкм)	25 мМ ТРИС-буферный раствор (рН 2.8), U = 30 кВ, λ=330 нм	Плазма крови	Пропранолол	50		[160]
	МС	Монолитная колонка с силикагелем	AcN/NH <sub>4</sub> Ac (рН 6.0), (80:20)	Моча	Атенолол Метопролол Эсмолол	0.8 0.15 0.2		[162]
КЭХ	ДМД	Кварцевый капилляр, модифицированный γ-метакрилоксипропил-триметоксисиланом в 6 мМ уксусной кислоте	ацетонитрил/60 мМ ацетат натрия (рН 7.0), (85:15)	Модельный раствор	Энантиомеры офлоксацина	100000		[163]
	УФ	Кварцевый капилляр (50/41.5 см×50 мкм)	ЖЖ-экстракция 50 мМ ДСН , 50мМ фосфорной кислоты/ацетонитрил (72.5:27.5); U = -15 кВ, λ=214 нм	Сточная вода	Хлорфенирамин, нотриптилин, имипрамин, доксепин, пропранолол, лабеталол, альпренолол		7-27	[164]

МЭКХ	МС	Кварцевая капиллярная колонка Rtx-5 (30 м×0.25 мм)	Аргон, F = 2 мл/мин		Метопролол Пропранолол Пиндолол Атенолол Надолол Ацебуталол	1.5 3.0 3.0 6.0 1.5 6.0		[176]
	МС	HP-5 MS капиллярная колонка (30 м×0.25 мм)	Гелий, F = 2 мл/мин	Моча	Соталол Метопролол Пиндолол Надолол Атенолол		0.3 1.2 2.8 9.0 40.1	[156]
ГХ	МС	HP-5-MS капиллярная колонка (30 м × 0.25 мм)	Гелий, F = 1.2 мл/мин	Моча	β-блокаторы ,флавоноиды и продукты их метаболизма	1.3–6.2 (β-блокаторы) 0.6–9.7 (флавоноиды)	4.1–18.7 (β-блокаторы) 1.8–29.3 (флавоноиды)	[177]
	МС	Agilent J&WHP-5MSUI (30.0м×0.25 мм; локрyт 0.25 мкм плёнкой смеси дифенилсилоксан/диметилсилоксан (5:95))	Гелий, F = 1.0 мл/мин	Вода водоёмов	Противовоспалительные лекарственные препараты	0.005–0.010	0.010–0.020	[178]
	МС	HP-5MSGCcolumn (30 м ×0.25 мм)	Гелий, F = 1.2 мл/мин	Осадок сточных вод	Диклофенак Ибупрофен Кетопрофен Напроксен Парацетамол	11.0 2.0 5.0 5.0 11.0	37.0 6.7 17.0 7.6 39.0	[179]

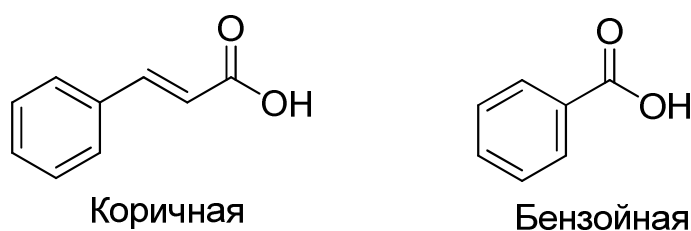
	МС	1) xi-5Sil MS (30 м × 0.25 мм, 0.25 мкм) 2) ВРХ-50 (1.5 м, 0.1 мм, 0.1 мкм)	Гелий, F = 1.0 мл/мин	Вода из различных рек	Ибупрофен Кофеин Капроксен Кетопрофен Диклофенак	3.16 0.61 0.51 0.71 1.80	10.54 2.03 1.71 2.36 6.00	[180]
ГХ/ГХ	МС	Uptisphere HDD C18 (100×2 мм, 3 мкм)	Градиентное элюирование: А – 10 мМ НСООН <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O В – СН <sub>3</sub> ОН	Моча	Соталол Метопролол Пиндолол Надолол Атенолол		0.9 0.53 0.66 1.52 0.69	[156]
ВЭЖХ	ФД	C16 (150×4.6 мм), C18 (50×4.6 мм)	Градиентное элюирование: А – ФБ (рН 3.0), Б – СН <sub>3</sub> ОН	Сточная Вода	Атенолол Надолол Метопролол	1.0 3.5 3.9	8.6 8.9 7.0	[181]
	МС-МС	Chirobiotic V (250 ×2.1 мм, 5 мм)	Градиентное элюирование: А – 4 мМ НСООН <sub>4</sub> , В – СН <sub>3</sub> ОН	Сточная вода	Атенолол (S/R) Метопролол (S/R) Альпренолол (S/R)		6.16 и 5.65 0.05 и 0.03 0.07 и 0.09	[183]
	МС-МС	Zorbax SB-C8 (150×2.1 мм, 3.5 мкм); SB-C8 (12.5×2.1 мм, 5 мкм)	А – вода / ацетонитрил /муравьиная кислота (94.5:5.0:0.5); Б - AcN/ муравьиная кислота (99.5:0.5). Градиент: 100 % А до 25 % Б за 13 мин	Осадок сточных вод	β-блокаторы β <sub>2</sub> -агонисты	6–11		[182]
	ДМД	C18 (150×4.6 мм, 5 мкм)	Ацетонитрил/70 мМ ФБ (рН 2.5), (35:65); λ=230 нм	Экстракт масла	β-блокаторы флавоноиды	1–50		[185]
	ДМД	C18 (250 × 4.6 мм; 5 мкм)	50 мМ АБР (рН 4.6)/ацетонитрил, (73:27); λ=265 нм	Мясо быка	Триметаприм, антибактериальные препараты	31	62	[186]

	УФ	Hypersil ODS (250×4.6 мм, 5мкм)	AcN/вода/раствор бромид тетрагептиламмония (ТГА) (pH 7) / ТГА (pH 5), (39:55:5.5:0.5), $\lambda = 254$ нм	Стальные поверхности в помещении фармзавода	Цефтриаксон	17	60	[187]
	УФ	Hypersil ODS (250×4.6 мм, 5мкм)	CH <sub>3</sub> OH /вода/0.05 М ФБ р (pH 3)/гептансульфонат натрия (65:35:3:0.13); $\lambda=235$ нм	Стальные поверхности в помещении фармзавода	Нимесулид	24	73	[188]
	УФ	Hypersil Gold (50×2.1 мм, 1.9 мкм)	Градиентное элюирование: А – 0.05 % водный раствор CF <sub>3</sub> COOH, Б – 0.05 % раствор CF <sub>3</sub> COOH в AcN; $\lambda=227,$ 254 и 324 нм	Моча	Милринон Соталол Метопролол Пропранолол Карведиол	22.0 12.8 28.8 14.8 13.8	66.1 38.4 36.3 44.4 89.0	[189]
УВЭЖХ	МС	Hypersil Gold aQ C18 (100 × 2.1 мм, 1.9 мкм)	Градиентное элюирование: А – 0.1% муравьиной кислоты в воде, Б – 0.1% муравьиной кислоты в AcN	Баранина, свинина, говядина, курица	$\beta_2$ -агонисты	0.0033–0.01 (мкг/кг экстракта)	0.01–0.03 (мкг/кг экстракта)	[190]
	МС	Acquity UPLC BEH C18 (2.1 ×100 мм, 1.7 мкм), предколонка- UPLC BEH C18 (2.1×5 мм, 1.7 мкм)	А – 5 мМ формиатный буферный раствор (pH 10.2), Б – AcN	Кровь	Лекарственные препараты основной природы	1.0 –20	1.3–26	[191]



## Глава 4. Разделение и определение фенолкарбоновых кислот сепарационными методами

Фенольные кислоты содержат карбоксильную группу, связанную с бензольным кольцом. Они называются фенолкарбоновыми кислотами (**ФКК**) и делятся на две группы: производные бензойной и коричной кислот (рис. 18). Характерные черты их строения – ароматическое кольцо и одна или несколько гидроксильных, алкильных и прочих групп [193, 194].



**Рис. 18.** Структурные формулы бензойной и коричной кислот.

Заметно возросший интерес к этим веществам в первую очередь связан с их высокой антиоксидантной, антимуtagenной и антиканцерогенной активностью. ФКК присутствуют во многих лекарственных растениях, чае, фруктах как в свободной форме, так и в виде простых или сложных эфиров. Вкусовые характеристики многих напитков растительного происхождения во многом определяются наличием в их составе этих соединений. По содержанию отдельных ФКК – маркеров, можно судить о подлинности алкогольной продукции, например, вин. Фенольный состав индивидуален для конкретного продукта и зависит как от сорта и места происхождения винограда, так и способа приготовления и хранения вин и коньяков. Кроме того, некоторые ФКК и их эфиры находят широкое применение в пищевой промышленности в качестве сильных и одновременно нетоксичных консервантов. Очень важно определять низкие содержания ФКК в водах, так как они служат своеобразными индикаторами распада органических веществ, в частности лигнина [195–197].

Большое внимание исследователей уделено изучению натуральных веществ, среди которых флавоноиды, изофлавоноиды, каротины, витамины Е и С. В широкую группу соединений, проявляющих антиоксидантную активность, входят и ФКК. Эти соединения применяются при лечении серьезных патологий, таких как онкологические заболевания, сердечнососудистые заболевания, воспалительные процессы. ФКК присутствуют в зеленом чае, продуктах пищевой и алкогольной промышленности, ягодах, фруктах и овощах. Наиболее распространенными кислотами, содержание которых определяют в различных объектах, являются ванилиновая, кофеиновая, кумаровая, феруловая, синаповая, сиригиновая,

бензойная, салициловая, аскорбиновая, сорбиновая кислоты. Содержание ФКК в различных объектах определяют в первую очередь хроматографическими и электромиграционными методами. Основными для решения этой задачи на данный момент являются КЭ, ГХ-МС, ВЭЖХ с УФ-детектированием, диодно-матричным детектором, ФД, ЭХД и МС- детекторами, УВЭЖХ, гидрофильная жидкостная хроматография. Для повышения чувствительности определения метод ВЭЖХ зачастую сочетают с предварительными методами концентрирования, а ГХ – с дериватизацией ФКК в их летучие аналоги.

КЭ – высокоэффективный метод разделения, который нашел широкое применение в анализе пищевых продуктов благодаря экспрессности анализа, маленькому расходу образцов, низким эксплуатационным расходам. В работе [198] описано определение содержания ФКК в брокколи и брюссельской капусте методами КЭ и ВЭЖХ. ФКК извлекали из образцов методом твердофазной экстракции в патроне С18 с помощью метанола. В методе КЭ разделение проводили в немодифицированном кварцевом капилляре, в качестве ФЭ использовали 15 мМ боратный буферный раствор (рН 9.13), детектор – диодно-матричный.

В работе [199] авторы определяли содержание ФКК в оливковом масле. Аналиты предварительно экстрагировали метанолом, а затем определяли методом КЭ с фотометрическим детектором при  $\lambda = 200$  нм. Разделение проводили в кварцевом капилляре. В качестве ФЭ использовали смесь метанола и 25 мМ раствора тетрабората натрия (рН 9.15) в соотношении 5:95.

Определение лимонной, салициловой, бензойной, сорбиновой и аскорбиновой кислот в различных напитках и фруктах методом КЭ описано в работе [200]. В данном случае авторы использовали кремнивые наночастицы как псевдостационарную фазу для КЭ. Изучено влияние различных факторов на разделение этих соединений: концентрация и рН буферного раствора, концентрация аминированных наночастиц кремния в ФЭ, влияние других содержащихся в реальных образцах соединений. Пределы обнаружения для исследуемых кислот лежат в диапазоне 0.15 – 10.0 мкг/мл.

В литературе также описаны методы определения ФКК во фруктах (авокадо, например [201]) и ягодах (клубника, клюква). Однако сложная матрица подобных объектов требует длительного и кропотливого процесса пробоподготовки образцов. Чаще всего ФКК извлекают из матриц путем многократных процессов экстракции / реэкстракции. Это значительно увеличивает время определения, а также расход органических растворителей.

В работе [202] продемонстрировали возможности КЭ в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием на примере определения ФКК и флавоноидов в

гречневой крупе. Стандартное отклонение электрофоретической подвижности определяемых соединений не превышало 0.54, а предел обнаружения для кофеиновой кислоты, например, составил 0.70 мкг/мл.

Менее распространённым из электромиграционных методов для определения и разделения фенольных кислот является метод КЭХ [27, 203, 204]. В работе [205] описано получение нескольких монолитных колонок для КЭХ по принципу включения различных наночастиц в полимерную матрицу монолита (сополимер бутилметакрилата и этилендиметакрилата). В качестве включённых частиц выступали микрочастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{SiO}_2$ , стабилизированные аминогруппами, и червеобразные и гексагональные частицы кремния с БСА. Оценку хроматографических свойств колонки проводили на примере некоторых кислот (рис. 19).

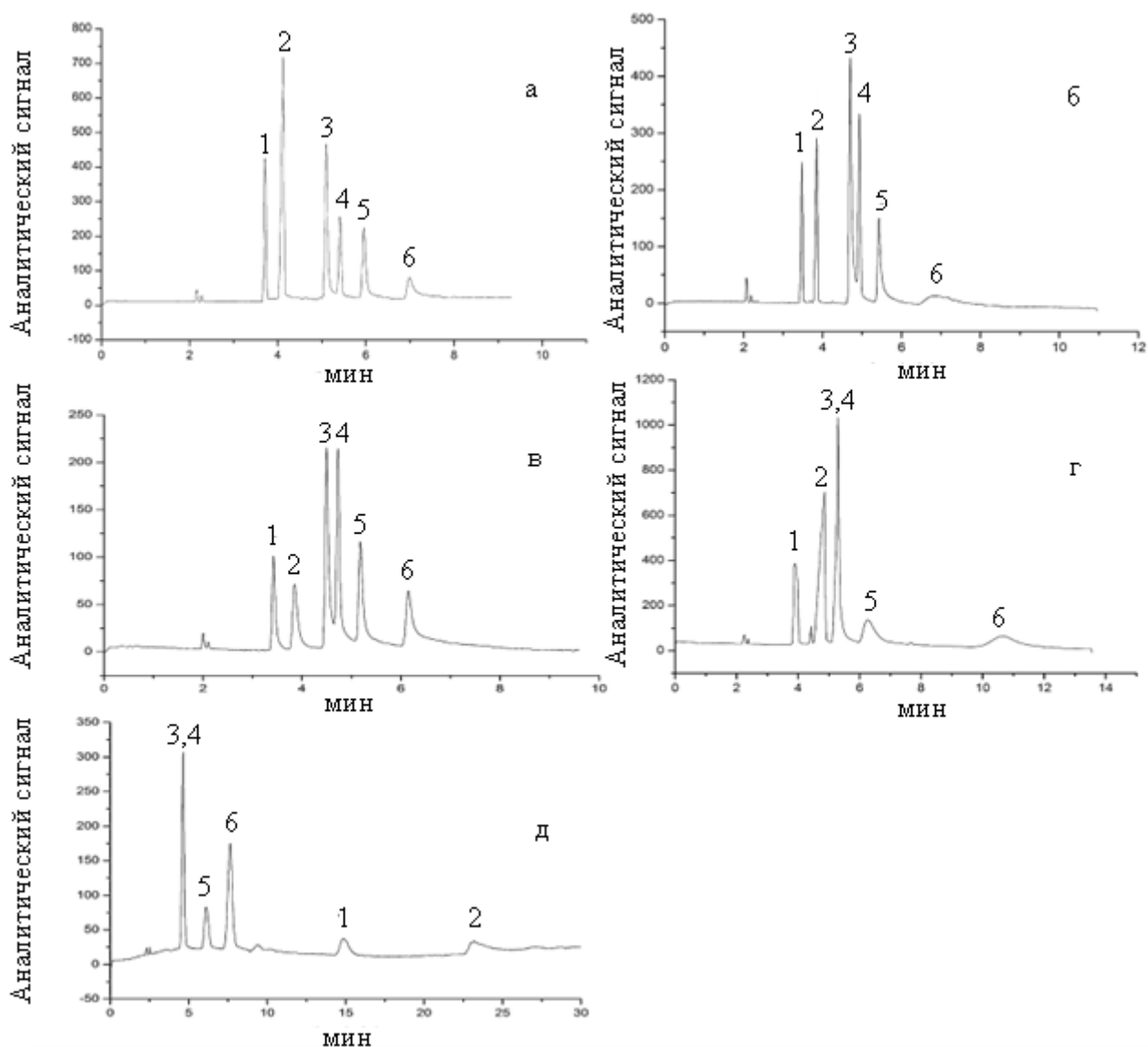
Включение таких частиц в полимерный монолит приводит к повышению эффективности колонки (до 290000 ТТ/м), экспрессности разделения, селективности по отношению к исследуемым соединениям. Также отмечено улучшение формы пиков. Эти параметры снижаются при переходе от частиц с железом к частицам с БСА и при замене монолитных колонок на заполненные.

Более простым, но и менее чувствительным для определения ФКК вариантом – МЭКХ – воспользовались авторы статей [40, 206, 207]. Стоит отметить, что работ по определению ФКК в реальных объектах методом МЭКХ значительно больше, чем таковых в случае КЭХ.

В работе [207] ФКК определяли в экстрактах цветка *Arnica montana*. Пределы обнаружения для кислот были не менее, чем 4.5 мкг/мл, а ошибка воспроизводимости времени удерживания – не более 4.4 %. Девять соединений были разделены за 20 мин.

Распространённым методом определения ФКК в пищевых продуктах является ВЭЖХ. В литературе описано большое число исследований, проведенных с целью определения и разделения ФКК в различных матрицах. Рассмотрим наиболее интересные примеры и подходы к определению ФКК методом ВЭЖХ.

Широко исследуемым объектом, в котором определяют содержание ФКК, является красное вино. Определение ФКК в вине является довольно сложной задачей. Оно включает различные виды пробоподготовки перед непосредственным разделением кислот хроматографическими методами. К примеру, зачастую хроматографическое определение ФКК в вине сочетают с предварительной жидкость-жидкостной экстракцией с этилацетатом в качестве экстрагента.



**Рис. 19.** Электрохроматограммы кислот на гибридных монолитных колонках и колонках сравнения. Колонки: а)  $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{SiO}_2 / \text{NH}_2$  – монолит, б) (BCA-Si червеобразные) – монолит, в) (BCA-Si гексагональные) – монолит, г) исходный полимерный монолит, д) заполненная частицами (BCA – Si червеобразные) колонка 18/11 см×75 мкм. ПФ:  $\text{AcN} / 25 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 4.1) (20:80);  $U = 6.12 \text{ кВ}$ ; ввод пробы: 6 кВ за 2 с,  $\lambda = 214 \text{ нм}$ . Соединения: 1 – изофталевая, 2 – фталевая, 3 – сульфаниловая, 4 – салициловая, 5 – о-йодбезнойная, 6 – *n*-аминобензойная кислоты ( $c = 10 \text{ мкг/мл}$ ) [205].

Наряду с определением кислот валкольной продукции, актуальной задачей является определение ФКК в соках. Как правило, в состав сока входит большое число кислот, которые проявляют антиоксидантную активность, а также усиливают вкусовые характеристики продукции.

В работе [208] галловую, кофеиновую и *n*-кумаровую кислоты определяли методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором. В качестве НФ использовали коммерческую колонку

Eclipse XDB C18 (250×4.6 мм, 5 мкм). Элюирование проводили в градиентном режиме. Образцы вина без пробоподготовки вводили прямым вводом и после проведения жидкость-жидкостной экстракции этилацетатом. Благодаря процедуре экстракции значительно увеличивается эффективность, селективность и чувствительность определения ФКК в вине. Степень их извлечения составила 89.5 – 105.9%.

Другой пример – качественное и количественное определение ФКК в сортах пива, производимых разными странами (Италия, Австрия, Германия) [209]. Экспериментальные условия, описанные в ряде статей, указывают на проведение щелочного гидролиза ФКК. Однако, в результате этой процедуры, происходит их частичная потеря. Поэтому авторы предложили новую методику пробоподготовки для определения ФКК в пиве. Она включала щелочной гидролиз 2 М раствором NaOH, содержащего 1% раствор аскорбиновой кислоты и 10 мМ раствора ЭДТА, как хелатообразующего реагента, и экстракцию целевых веществ этилацетатом. Такой подход приводит к повышению степени извлечения ванилиновой, кофеиновой, сиригиновой и *n*-кумаровой кислот из образцов пива разных брендов. В качестве НФ использовали колонку Supercosil LC–18 C18 (250×4.6 мм, 5мкм) и предколонку C18 (20×4 мм, 5мкм). Разделение осуществляли в режиме градиентного элюирования (растворитель А – 1.25% CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O, растворитель В – CH<sub>3</sub>OH).

В работе [210] ФКК определяли в различных соках с предварительной жидкость-жидкость-жидкостной микроэкстракцией (в англоязычной литературе – аббревиатура LLLME) и дальнейшим определением кислот методом ОФ ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием. Метод LLLME основан на экстракции аналитов из водных образцов в органическую мембрану (полипропиленовая мембрана, пропитанная гексилацетатом) с последующей экстракцией из органической мембраны в водный раствор акцептора (NaOH). В качестве стационарной фазы использовали колонку для ОФ ВЭЖХ LiChrospher C18 (5мкм, 125×4 мм); элюирование проводили в градиентном режиме (растворитель А – CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O, растворитель Б – CH<sub>3</sub>OH). Объектами анализа служили апельсиновый, гранатовый и вишневый соки.

Степени извлечения, достигнутые при использовании данной методики, лежат в диапазоне от 61 – 132%. Такой результат демонстрирует наличие матричных эффектов. По этой причине значения пределов обнаружения в реальных образцах и стандартных водных растворах сильно отличаются.

В работе [211] предложен более простой подход к определению ФКК в виноградном соке, содержащем большое количество фенольных кислот. Несомненным преимуществом

описанной в работе методики определения ФКК в соке является простота проведения пробоподготовки: растворение сока в ПФ с дальнейшей фильтрацией через полиамидную мембрану с размером пор 0.45 мкм. Для идентификации и количественного определения ФКК применяли метод ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием. Разделение осуществляли на колонке Gemini NX C18 (3 мкм, 150×4.6 мм); элюирование проводили в градиентном режиме (растворитель А – 0.85 % раствор фосфорной кислоты, растворитель В – АсN). Таким образом, предложенная методика определения ФКК в виноградном соке является достаточно простой, экспрессной, не требующей большого расхода органических растворителей. Удалось определить содержание ФКК в виноградном соке на низком уровне – десятки и сотни нг/мл.

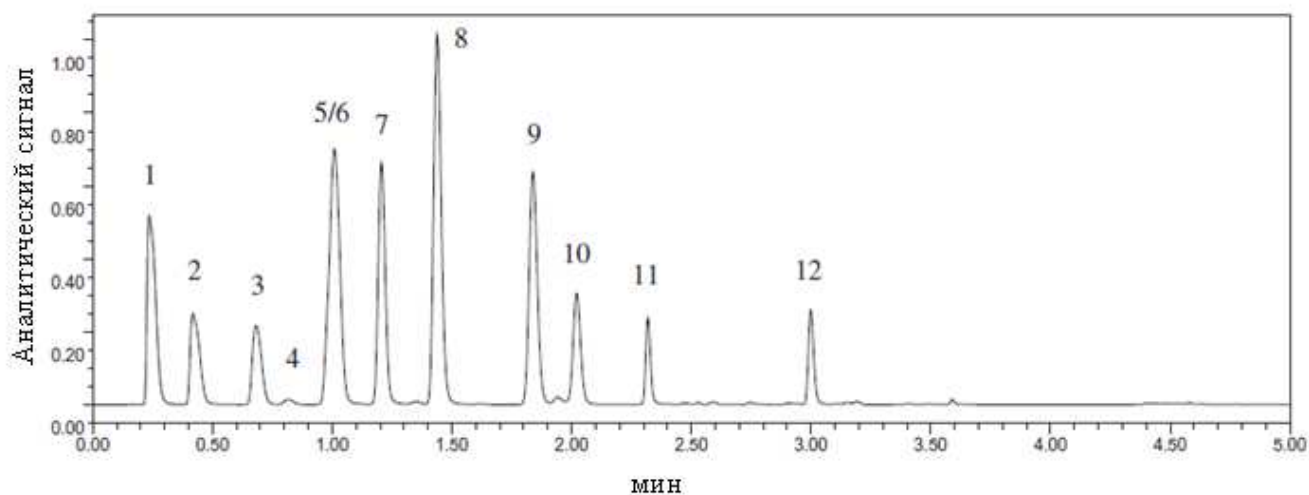
Еще одним интересным объектом, в котором зачастую определяют содержание ФКК, является мед. В работе [213] авторы определяли ФКК методом ОФ ВЭЖХ в цитрусовом меде при использовании диодно-матричного и электрохимического детектирования. Разделение проводили на колонке ZorbaxC18 (5мкм, 150×4.6 мм) в градиентном режиме элюирования (растворитель А – 4% CH<sub>3</sub>COOH, растворитель В – CH<sub>3</sub>OH). Для электрохимического детектора использовали стеклянный рабочий электрод и Ag/AgCl в качестве электрода сравнения. Работа привлекает внимание простой пробоподготовкой образцов меда: растворение навески меда в воде с дальнейшим перемешиванием на УЗ-ванне и фильтрацией через мембранный фильтр с диаметром пор 0.46 мкм. Отмечено, что использование электрохимического детектора позволяет снизить предел обнаружения и чувствительность на порядок по сравнению с диодно-матричным детектором (десятки нг/мл). Однако это не исключает возможности использования диодно-матричного детектора для определения ФКК, например, в тех лабораториях, где отсутствует соответствующее оборудование.

В работе [214] авторы определяли ФКК в образцах клубничного сока методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором. Разделение проводили на колонке LiChrospher 100 RP-18 (5мкм, 250×4 мм) в режиме изократического элюирования ПФ следующего состава: АсN/H<sub>2</sub>O (11:89) + 0.1 % ацетатный буферный раствор (рН 4.25). Предварительно кислоты экстрагировали метанолом из образцов клубничного сока. Пределы обнаружения галловой, ванилиновой, кофеиновой, *n*-кумаровой, бензойной, феруловой и синаповой кислот составили 1.3, 0.6, 0.9, 0.5, 0.8, 0.6 и 0.5 мкг/мл.

Достаточно прочную позицию в обсуждаемой задаче занял метод ВЭЖХ с различными вариантами масс-спектрометрического детектирования. Рекомендации по условиям работы с ФКК применительно к масс-спектрометрическому детектированию достаточно полно описаны в работе [215] (по крайней мере, при определении таких соединений в растениях).

Метод часто используют при исследовании такого объекта как вино. Так в статье [216] изучают профиль фенольных соединений в красном вине на всех стадиях винопроизводства. Для этого применяют две соединённых друг с другом коммерческих колонки: XTerra™MS C18 (150× 2.1 мм, 3.5 мкм (Waters)) и XTerra™ MS C18 (10 мм×2.1 мм 3.5 мкм (Waters)), а также градиентный режим элюирования. В работе сравнили метрологические характеристики определения ФКК при использовании диодно-матричного и масс-спектрометрического детектирования. Чувствительность определения в случае масс-спектрометрического детектирования выше (4.2 – 4.8 нг/мл).

Активно применяется для определения ФКК в самых разных объектах метод УВЭЖХ с различными системами детектирования. При переходе к высоким давлениям сразу становится заметным сокращение времени определения, но для работы необходимы насосы сверхвысокого давления и болеекороткие и эффективные колонки. Смесь флавоноидов и ФКК в экстракте проросшей пшеницы определяли этим методом со спектрофотометрическим детектированием в работе [217]. Разные подходы использовали для получения экстракта из пшеницы. Наилучшего извлечения кислот удаётся добиться при сочетании спиртовой и щелочной экстракций (исследовали также каждый вариант по отдельности). Наиболее удачная хроматограмма приведена на рис. 20.



**Рис. 20.** Разделение ФКК и флавоноидов в проросшей пшенице методом УВЭЖХ. Колонка: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (30 ×2.1 мм, 1.8 мкм). Градиентный режим элюирования. Спектрофотометрическое детектирование при  $\lambda = 280$  и 325 нм. Соединения: 1 – галловая, 2 – протокатеховая, 3 – гидроксибензойная, 4 – кофеиновая, 5 – ванилиновая, 6 – сиригиновая, 7 – сиригиновая, 8 – *n*-кумаровая, 9 – феруловая, 10 – синаповая кислоты, 11 – рутин, 12 – кверцетин [217].

В работе [218] полярные ФКК определяли в плазме крови методом УВЭЖХ с МС/МС детектированием. Разделение проводили на колонке Acquity UPLC ВЕН С18 (1.7 мкм, 100×2.1 мм) в режиме изократического элюирования ПФ состава AcN/CH<sub>3</sub>OH (4:1). Линейный диапазон определяемых содержаний составил 0.74 – 378 нг/мл для неохлорогеновой кислоты, 0.5 – 1030 нг/мл для хлорогеновой кислоты и 1.9 – 250 нг/мл для криптохлорогеновой кислоты. Похожий пример применения метода приведен в работе [219]. Однако нельзя не отметить сопоставимое по пределу обнаружения и нижней границе определяемых концентраций определение ФКК при использовании метода УВЭЖХ с диодно-матричным детектированием [220].

Популярные относительно недавно появившиеся сепарационные методы – гидрофильная хроматография и хроматография смешенного типа (mix-mode chromatography) – начинают достаточно плотно занимать свою нишу. Работ, опубликованных по темам определения ФКК с помощью этих аналитических методов, становится всё больше и больше [24, 41, 221, 222, 223].

В литературе встречаются и случаи определения ФКК в биологических жидкостях. В работе [223] содержание полярных фенольных кислот определяли в моче методом гидрофильной хроматографии с МС/МС детектированием. Разделение осуществляли на колонке ZIC-HILIC (5 мкм, 250×4.6 мм) в изократическом режиме на ПФ состава: AcN/10 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (70:30). Пределы обнаружения лимонной, глутаминовой и молочной кислот составили соответственно 2.0, 1.2 и 0.5 нг/мл.

На примере определения состава белых вин сравнивали методы ЖХ-ЖХ (двумерная жидкостная хроматография) и хроматографию смешенного типа. Авторы описывают явное превосходство по эффективности колонки для второго метода. Более того в последнем случае можно одновременно определять как заряженные соединения, так и нейтральные [224].

Работ по ионной хроматографии в области определения ФКК и флавоноидов очень мало, но есть несколько примеров [225–228].

Газовая хроматография для решения обсуждаемой задачи используется реже из-за длительной пробоподготовки с дериватизацией и ограничений по температурному режиму для исследуемых кислот. Определение ФКК данным методом часто сочетается с твердофазной экстракцией, твердофазной микроэкстракцией и даже микроэкстракцией из капли [229–232].

В работе [233] авторы определяли содержание ФКК в клюкве методом ГХ-МС. ФКК предварительно гидролизовали соляной кислотой с применением ультразвука, экстрагировали этилацетатом, а затем проводили ТМС-дериватизацию. Суммарное содержание ФКК (бензойной, ванилиновой, кумаровой, феруловой, кофеиновой и синаповой) составило 12.4 мг/г в клюкве, 9.1 мг/г в клюквенном соке и 11.1 мг/г в клюквенной настойке. Предложенный метод



рекомендован для определения ФКК в других продуктах растительного происхождения благодаря высокой чувствительности определения, хорошей селективности и воспроизводимости результатов. К недостаткам следует отнести длительность анализа и большой расход органических реагентов, связанный с процедурами дериватизации и экстракции.

Хороших результатов добились авторы работы [234] при определении ФКК в плазме крови. Предложенная ими методика сочетает ион-парную микроэкстракцию для извлечения кислот и ГХ-МС -определения. Степень извлечения из крови всех компонентов составила 99 %, а предел обнаружения лежит в диапазоне 10 – 100 нг/мл.

44 кислоты методом ГХ-МС разделили и определили авторы статьи [235]. Тщательный подбор масс-спектрометрических условий, методики жидкость-жидкостной экстракции и конечно получение летучих производных предшествовали этому. Новые статьи по определению ФКК методом ГХ появляются всё реже и, как правило, с тенденцией к усложнению и подорожанию процедуры пробоподготовки и хроматографического определения. Так в работе [236] для определения фенольного состава карамели используют многомерные варианты ГХ.

Данные по основным методам, используемым для определения фенолкарбоновых кислот в различных природных объектах, обобщены в табл. 6.

**Таблица 6.** Электромиграционные и хроматографические методы определения фенолкарбоновых кислот в матрицах различной природы.

Метод	Детектор	Неподвижная фаза	Условия	Объект	Определяемые соединения	Предел обнаружения, нг/мл	Нижняя граница определяемых концентраций, нг/мл	Ссылки
КЭ	ДМД	Кварцевый капилляр (60/52см×50мкм)	15 мМ боратный буферный раствор (рН 9.13), U = 30 кВ, λ=320 нм	Капуста	Синаповая кислота Феруловая кислота <i>n</i> -Кумаровая кислота Кофеиновая кислота	2.3 1.4 1.2 1.1 (мкг/кг капусты)	7.5 4.7 4.0 3.8 (мкг/кг капусты)	[198]
	ДМД	Кварцевый капилляр (40 см×50 мкм)	25 мМ тетраборат натрия (рН 9.15)/метанол, (95:5); U = 30 кВ, λ=200 нм	Оливковое масло	Коричная кислота <i>m</i> -Кумаровая кислота Хлорогеновая кислота Сирингиновая кислота Бензойная кислота Ванилиновая кислота Кофеиновая кислота	79 66 160 47 23 34 31	240 200 490 140 70 100 93	[199]
	УФ	Кварцевый капилляр, (36/27 см×50 мкм), заполненный кремниевыми наночастицами	30 мМ ФБ (рН 7.0) с добавкой SiNPs (1 мг/мл); U = 8 кВ; λ=254 нм	Напитки и фрукты	Лимонная кислота Салициловая кислота Бензойная кислота Сорбиновая кислота Аскорбиновая кислота	7500 150 230 330 10000		[200]
	МС	Кварцевый капилляр (90 см×50 мкм)	50 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор (рН 9.2)/ 2.5% метанола, U= 28 кВ.	Гречневая крупа	Кофеиновая кислота Катехин Рутин Кверцетин	700 120 430 520		[202]

	УФ	Кварцевый капилляр (60/50см×50мкм)	40 мМ тетрабората натрия (рН 9.4), U = 30 кВ; λ=254 нм	Авокадо	ФКК и флавоноиды	9–145	030–483	[201]
КЭХ	ДМД	Hypersil SCX/C18, (33.5/25.0 см×50 мкм)	50 мМ Фб (рН 2.8)/ацетонитрил (50:50), λ=337 нм	Экстракты растения <i>Chamomilla recutita</i>	ФКК, флавоноиды	35000	150000	[203]
	ДМД	RP Cogent® bidentate C18 (33/23, 75 мкм)	100 мМ формиатный буферный раствор (рН 3)/АСN/H <sub>2</sub> O (5:30:65); U = 22 кВ, λ=220 нм)	Оливковое масло	ФКК	15-2500	1250-10000	[204]
МЭКХ	УФ	Кварцевый капилляр (30/22.5 см×75 мкм)	70мМ ДСН в смеси 17.6 мМ ФБ (рН 2.5)/метанол (95:5), U=17 кВ, λ= 325 нм	Зёрна кофе	Хлорогеновая, кофеиновая, феруловая кислоты	98	4000	[206]
	ДМД	Кварцевый капилляр (70/62 см×50 мкм)	25 мМ ДСН в 50 мМ водный раствор буры (рН 6.75)/ ацетонитрил (70:30); U = 25 кВ, λ= 254 нм	Экстракты растения <i>Arnica montana L</i>	Хлорогеновая кислота 3,5-дикофеилхинная кислота	4100 4500	12300 13500	[207]
ИОХ	ДЭ	Dionex АТС-3 (24 мм × 39 мм)	А - вода, Б - 5.0 мМ NaOH, В - 100 мМ NaOH, Г - 90% водный раствор СН <sub>3</sub> ОН. Градиент	Искусственно выращенные клетки млекопитающих	Фенолкарбоновые кислоты и родственные им соединения	0.12–0.40 мкМ		[228]
	ДЭ	IonPacAS11-НС (250×4) мм, предколонка-IonPac AG11-НС	А - 100 мМ NaOH, Б - метанол, В - 1.0 мМ NaOH. Градиент	Стандартная среда <i>Luria–Bertani</i> для бактерий <i>Escherichiacoli</i>	19 органических кислот (добавка 10 неорганических анионов)	0.65–2.76	2.17–9.20	[225]

	ДЭ	Юспас АS11 (250 ×2 мм), предколонка- Юспас АG11 (50×2 мм)	Водный раствор КОН. Градиент: 0-7 мин 1-15 мМ, 7-30 мин 15 мМ, 30-30. 01 мин 15-1 мМ	Газированные напитки, соки	Подсластители	19–870		[226]
ГХ	МС	АТ. FFAP (20 м×0.32мм, 5 мкм)	Азот, F = 2.2 мл/мин, температурное программирование	Газированный напиток	Сорбиновая кислота Бензойная кислота	5.83 11.4		[226]
	МС	DB-5 -5 MS капиллярная колонка (30 м×0.32 мм, 25 мкм)	Гелий, F = 2 мл/мин	Клюква	Бензойная кислота <i>o</i> -Гидроксibenзойная кислота Ванилиновая кислота <i>n</i> -Кумаровая кислота Феруловая кислота	60 62 70 82 100		[233]
	МС	VF-17 MS (30 м× 0.25 мм, 0.1 мкм)	Гелий, F = 1.2 мл/мин	Плазма крови	ФКК	10		[234]
	МС	HP-5MS кварцевая капиллярная колонка (30 м× 0.25 мм, 0.25 мкм)	Гелий, F = 1.0 мл/мин	Микрофлора кишечника	ФКК	1.8–38.0	6.0–102.8	[235]
ВЭЖХ	ДМД	Gemini NX C18 (150×4.6мм, 5 мкм)	Градиентное элюирование: А- 0.85% Н <sub>3</sub> РO <sub>4</sub> , В - AcN	Виноградный сок	Кофеиновая Коричная Галловая <i>n</i> -Кумаровая	80 110 70 50	280 370 240 160	[211]
	ДМД	Zorbax C18 (150×4.6) мм, 5 мкм	Градиентное элюирование: А - 4% CH <sub>3</sub> COOH, В - CH <sub>3</sub> OH	Цитрусовый мед	Кофеиновая <i>n</i> -Кумаровая Феруловая Кофеиновая	65 46 53 3.8	190 150 100 14	[213]
	ЭХД							

	ДМД	LiChrospher 100 RP-18 (250×4 мм, 5 мкм)	Изократическое элюирование: AcN/H <sub>2</sub> O (11:89)	Клубничный сок	Галловая Ванилиновая Кофеиновая <i>n</i> -Кумаровая Бензойная Феруловая Синаповая	1300 600 900 500 800 600 500	4600 2000 2900 1700 2800 2000 1600	[214]
	МС	C18 Luna column (50×2.0мм)	А - 0.1% муравьиной кислоты в воде, Б - ацетонитрил. Градиент: 0 мин - 5% Б, 0-1 мин 15% Б, 1-3 мин 15 % Б, 3-5 мин 100 Б, 5-6 мин 100% Б, 6-7 мин 5 % Б, 7-12 мин 5 % Б.	Оливковое масло	Гидрокситирозол Гомованилиновая кислота	0.24 3.0	0.8 10.8	[234]
	МС	Poroshell 120 EC-C18 (100× 2.1 мм, 2.7 мкм)	А - H <sub>2</sub> O/муравьиная кислота, (99.5:0.5%), Б - ацетонитрил / муравьиная кислота, (99.5:0.5). Градиент.	Экстракт растений	ФКК	–	–	[215]
	ДМД/МС	XTerra™ MS C18 (150× 2.1 мм, 3.5 мкм), предколонка XTerra™ MS C18 (10 мм ×2.1 мкм, 3.5 мкм)	для водной фракции: А - 2 % муравьиной кислоты в воде, Б - 2 % МК в AcN. для органической фракции: А - 0.1 % МК вода/AcN (98:2), Б - 0.1 % МК в смеси вода-AcN	Красное вино	Фенольные соединения (кислоты, флавоноиды, антоцианины и т.д.)	4.2–4.8		[216]

	УФ	Hichrom C18 (250 × 4.6 мкм, 5 мкм)	(0.02 М КН <sub>2</sub> РO <sub>4</sub> /ACN, (90:10)/фосфорная кислота),	Напитки и нектары	Сахарин Кофеин Бензойная Сорбиновая		500 1000 4000 7000	[212]
	ДРСИ	Zorbax Extend-C18, Purospher® Star RP-18, Nucleodur® C18 Pyramid, Nucleodur® C8 Gravity, для всех: (250×3 мм, 5 мкм)	А – метанол / буферный раствор/ацетон (69:24:7), Б - метанол/буферный раствор/ацетон (11:82:7).	Пищевые продукты	Подсластители	15 мкг/г образца	30 мкг/г образца	[238]
<b>УВЭЖХ</b>	МС	Acquity UPLC BEH C18 (100×2.1 мм, 1.7 мкм)	0.4 % уксусной кислоты в смеси AcN/CH <sub>3</sub> OH (4:1)	Плазма крови крыс	ФКК		0.5–1.95	[218]
	МС	Acquity UPLC BEH C18 (100×2.1 мм, 1.7 мкм)	А - метанол, Б - 0.1% муравьиной кислоты в воде. Градиент.	Оливковое масло	ФКК	10–100 (мкг/кг образца)	25–250 (мкг/кг образца)	[219]
	ДМД	Zorbax SCN (50 ×2.1 мм, 1.7 мкм)	А - 0.3 % водный раствор уксусной кислоты, Б - метанол. Градиент: 0–0.5 мин, 10 % Б; 0.5–1.8 мин, 10–45% Б; 1.8–3.0 мин, 45–10 % Б; 3.0–4.0–10 % Б.	Экстракты растений	ФКК, изофлавоноиды (19 соединений)	0.189–0.566	0.63–1.89	[220]

\*\*\*

Обзор литературных данных подтвердил необходимость определения полярных соединений, таких как ФКК и азотсодержащие фармпрепараты, в матрицах различной природы. Подобные исследования проводят в аналитических лабораториях всего мира. Разрабатывается огромное число методик определения ФКК и азотсодержащих соединений, направленных на упрощение пробоподготовки и повышение чувствительности определения компонентов.

Важным направлением в практике хроматографического разделения является поиск новых эффективных гидрофильных сорбентов для разделения полярных соединений методами ВЭЖХ. Изложенные данные свидетельствуют о разнообразии НФ для хроматографии. Список коммерчески доступных на сегодняшний день гидрофильных сорбентов продолжает расширяться. Как показывает сравнение различных гидрофильных сорбентов, наиболее интересные результаты получены при модифицировании силикагелевой матрицы крупными молекулами катионными и анионными полиэлектrolитами. Однако не так хорошо исследованы хроматографические системы на основе полиэлектrolитных комплексов. Такое модифицирование силикагеля для ВЭЖХ открывает ряд новых сорбентов, отличных от силикагелей, модифицированных каким-либо полимером или ковалентно связанными полимерами. Во время послойной самоорганизации монослои полиэлектrolитов не только электростатически взаимодействуют друг с другом, но также имеют склонность к взаимопроникновению. Образование полиэлектrolитных покрытий (особенно при использовании двух и более слоёв полиэлектrolитов) приводит к гораздо более упорядоченной структуре на поверхности силикагеля и зачастую более тонкому модифицирующему слою по сравнению с единичным модифицирующим слоем полиэлектrolита. Таким образом, хроматографические исследования, направленные на определение и разделения полярных соединений на колонках с гидрофильными полиэлектrolитными сорбентами являются актуальными.

Важно выбрать способы модифицирования матрицы, не требующие дорогих исходных материалов и длительного многостадийного органического синтеза. Пока недостаточно внимания уделяется полислоистым гидрофильным сорбентам. Необходимы исследования как закономерностей формирования полислоев на поверхности матрицы, так и изучение возможности и особенностей удерживания различных полярных веществ на таких сорбентах.

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

## Глава 5. Исходные вещества, аппаратура, методики эксперимента, техники эксперимента

### 5.1. Исходные вещества

Для синтеза сорбентов в работе использовали следующие реагенты:  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (х.ч.),  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5.5\text{H}_2\text{O}$ , (ос.ч., “Merck”, Германия), соляная кислота, конц. (ос.ч.), 0.001 М раствор  $\text{NaOH}$ ; этиловый спирт (х.ч.), раствор глутарового альдегида квалификации “хч”, 20%, хитозан (Mr 5.0 кДа) и СКПХ (Mr 5.0 кДа), предоставленный д.х.н. Варламовым В.П., лигносульфонат натрия (ЛСТ) (Mr 24.2 кДа), предоставленный д.х.н. Боголициным К.Г. (элементный состав образца следующий: С – 33.31%, Н – 1.59 %, О – 55.93%, S – 9.0%, N – 0.27%), 6,10-ионен, синтезированный по *Методике № 2* (элементный состав образца следующий: С – 46.26 %, Н – 8.54 %, N – 6.67 %; Mr 10.0 кДа), сульфат декстрана (Mr 15.0 кДа, “Sigma-Aldrich”, США), 0.1 М фосфатный буферный раствор (рН 6.86), 25 мМ цитратный буферный раствор (рН 6.5).

В качестве матриц для синтеза сорбентов использовали силикагель Kromasil 100–5-Sil (сферический, размер частиц 5 мкм, площадь поверхности 300 м<sup>2</sup>/г, размер пор 100 Å, “Ekachemicals”, Швеция) и аминосиликагель “SilasorbNH<sub>2</sub>” (размер частиц 7.5 мкм, “Merk”, Германия).

Для синтеза 6,10-ионена использовали N,N,N',N'-тетраметил-1,6-гександиамин и 1,10-дибромдекан (“Sigma-Aldrich”, США).

В работе для приготовления ПФ и ФЭ использовали ацетонитрил (“для хроматографии”, “Panreac”, Испания), метанол (“хч”, “Honeywell”, Германия), изопропанол (“хч”, LiChrosolv, Германия), тетрагидрофуран (ТГФ) (“для хроматографии”, “Реахим”, Россия), фосфатный, цитратный и гидрофталатный буферные растворы. Стандартные буферные растворы готовили согласно [239]. Для приготовления буферных растворов использовали точные навески твердых дигидрофосфата калия, тригидрата гидрофосфата калия, дизамещённую натриевую соль лимонной кислоты (“хч”, “Реахим”, Россия), фталат калия (“чда”, “Черкасский завод химреактивов”, Россия).

В качестве маркеров ЭОП в КЭ использовали 3% раствор метилэтилкетона (“хч”, ООО Компонент-реактив, Россия) и деионизованную воду.

Растворы сорбиновой, бензойной, никотиновой, галловой, салициловой, феруловой, синаповой, *n*-кумаровой, сирингиновой, кофеиновой (“хч”, “Sigma”, Germany) и ванилиновой



кислот (“хч”, “Fluka”, China) с концентрацией 100 мкг/мл готовили растворением точной навески в деионизованной воде.

Растворы атенолола, пиндолола, надолола, хлорфенирамина, карбиноксамина, тетрагидрозолина, тербуталина, доксиламина, гидроксизина, орфенадрин, кофеина (“хч”, “Sigma-Aldrich”, USA) с концентрацией 100 мкг/мл готовили растворением точной навески в деионизованной воде.

Стандарты ГСО “Экоаналитика” хлорида, нитрата, сульфата натрия и хлоридов калия, магния квалификации “хч” с концентрацией 10 мг/мл использовали для изучения удерживания на сорбентах неорганических анионов. Рабочие растворы с концентрацией 100 мкг/мл готовили разбавлением стандартов деионизованной водой.

Для приготовления модельной смеси ASTM-теста на гидрофобность использовали бензиловый спирт, бензол, ацетофенон, метилбензоат и диметилтерефталат (“хч”, “Хромлаб”, Россия). Концентрации веществ в смеси составили 0.1 мг/мл. Для хроматографического теста сорбентов на остаточные силанольные группы использовали фенол (“хч”, “РусХим”, Россия) и пиридин (“хч”, “Sigma-Aldrich”, USA). Растворы готовили согласно [52].

## 5.2. Аппаратура

В работе использовали жидкостной хроматограф LC–20 Prominence (“Shimadzu”, Япония) с диодно-матричным детектором SPD–M20A (“Shimadzu”, Япония); жидкостной хроматограф “Shimadzu” SLC–10A со спектрофотометрическим детектором “Shimadzu” SPD–10AV и насосом LC–10AT (“Shimadzu”, Япония); жидкостной хроматограф “Agilent 1200” с масс-спектрометрическим детектором “ABSciexQTrap 5500” (“ABSciex”, Канада) с источником ионизации Turbo V (ESI). Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LCSolution фирмы “Shimadzu” и “Analyst 1.5.2.”. Скорость подачи элюента составляла 0.7 – 1.0 мл/мин, объем петли дозатора составлял 20 мкл, ввод пробы осуществляли шприцом объемом 50 мкл.

Синтезированными сорбентами заполняли стальные колонки размером 100×4.6 мм и 150×4.6 мм при помощи насоса “KnauerK-1900” под давлением 300 – 350 бар суспензионным методом. Для этого навеску сорбента вносили в 20 мл растворителя и гомогенизировали полученную суспензию в ультразвуковой ванне в течение 2 мин. Затем проводили заполнение колонки.

Для предварительных исследований полислоистых покрытий использовали систему для КЭ Капель 105-М (“Люмэкс”, Россия) со спектрофотометрическим УФ детектором.

Использовали кварцевый капилляр 38.7/29.3 см с внутренним диаметром 50 мкм (Polymicro Technologies, США). Обработку информации проводили с помощью программы “Elforan”. Перед использованием ФЭ дегазировали на ультразвуковой ванне “Сапфир 6580” (рабочая частота 35 кГц, мощность 60 Вт, НПФ “Сапфир”, Россия) в течение 10 мин для снижения колебаний фонового сигнала и обеспечения нормальной работы прибора. рН водных растворов измеряли на рН-метре “рН-Эксперт” (“Эконикс”, Россия).

Детектирование в случае обоих сепарационных методов проводили при длинах волны 220, 235, 254 и 276 нм.

Элементный анализ образцов проводили на анализаторе Elementar Vario Micro CUBE (“Elementar”, Германия).

Строение синтезированного 6,10-ионена подтверждали методом ЯМР-спектроскопии (растворы в дейтерированной воде D<sub>2</sub>O). Для этого использовали ЯМР-спектрометр Bruker Avance II NMR spectrometer (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C при 400 и 100 МГц, соответственно). Среднюю молекулярную массу рассчитывали с применением метода масс-спектрометрии МАЛДИ. Для этого использовали масс-спектрометр Bruker Ultraflex (в качестве матрицы выступала 2,4-дигидроксibenзойная кислота).

Для получения микрофотографий сорбентов использовали сканирующий электронный микроскоп LEO 912 ABO MEGA EFTEM (“CarlZeiss”, Германия) на базе центра коллективного пользования МГУ. Микрофотографии были получены С.С. Абрамчуком. Обработку информации проводили под руководством к.х.н. Апяри В.

Регистрацию спектров диффузного отражения синтезированных сорбентов осуществляли на Perkin Elmer Lambda 950 (диапазон съемки: от 200 до 1000 нм, шаг 1 нм, интегрирующая сфера диаметром 13 мм и покрытием SPECTRALON). Полученные данные обрабатывали с использованием функции Кубелки-Мунка:

$$(1-R)^2/2R,$$

где **R** – коэффициент отражения.

Получение и обработку спектров выполняла аспирант Погосова М. (каф.неорганической химии, лаборатория неорганического материаловедения, группа магнитных измерений).

Для контроля стадии модифицирования сульфатом декстрана использовали метод ИК-спектроскопии. Для этого использовали ИК-спектрометр Shimadzu IR Affinity-1 (“Shimadzu”, Япония). Спектры были получены в цинкселеновых кюветах ZnSe (d = 0.05 мм) в диапазоне волновых чисел 1400 – 1000 с разрешением 2 см<sup>-1</sup>.

Параметр Гидрофобности Ханша ( $\log P$ ) для неионизированного состояния веществ и величины константы диссоциации ( $pK_a$ ) рассчитывали с помощью программы ACD LABs 6.0 (Канада).

### 5.3. Методики эксперимента

**Методика 1. Синтез наночастиц золота (10 нм).** Перед каждой стадией синтеза посуду для проведения эксперимента тщательно мыли царской водкой ( $HNO_3$  конц/ $HCl$  конц (1:3)) и затем ополаскивали деионизованной водой. Такая операция позволяет избежать агрегации НЧЗ. В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, помещали раствор 75 мг  $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$  в 250.0 мл деионизованной воды и доводили раствор до кипения. Быстро добавляли 26.0 мл 1% раствора цитрата натрия и кипятили в течение одного часа. При кипении наблюдали изменение цвета раствора со светло-желтого (раствор золотохлористоводородной кислоты) на вишневый через темные (серые и черные) тона. Раствор охлаждали до комнатной температуры. Полученный раствор НЧЗ хранили в холодильнике при температуре около  $4^\circ C$ , в таких условиях раствор сохранялся длительное время.

**Методика 2. Синтез 6,10-ионена.** Эквимольные растворы N,N,N',N'-тетраметил-1,6-гександиамина и 1,10-дибромдекана растворяли в ДМФА для получения 1 М раствора по каждому из компонентов. Смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 24 часов при комнатной температуре. В ходе реакции наблюдали выпадение осадка образующегося полимера. Окончание реакции контролировали визуально до прекращения увеличения объема осадка. Реакционную смесь выливали при перемешивании в примерно 20-кратный объем безводного ацетона. Затем осадок отфильтровывали на водоструйном насосе и промывали двумя порциями ацетона по 10 мл. Полимер сушили под вакуумом масляного насоса ( $2 \cdot 10^{-2}$  мм рт. ст.) 4 часа.

**Методика 3. Модифицирование кварцевого капилляра наночастицами золота, стабилизированными цитрат-ионами.** Новый кварцевый капилляр перед модифицированием подвергли стандартной обработке: последовательно промывали 0.1 М соляной кислотой (30 мин), деионизованной водой (30 мин), 0.1 М гидроксидом натрия (30 мин), водой (30 мин). После этого его кондиционировали 0.76 мМ раствором НЧЗ (20 мин) под давлением 1000 мбар. Затем капилляр оставляли на ночь и на следующий день перед работой промывали 10 мин водой.

**Методика 4. Модифицирование кварцевого капилляра 6,10-ионеном и наночастицами золота, стабилизированными цитрат-ионами.** После стандартной обработки (см. Методику 2) капилляр промывали 20 мин водным раствором 6,10-ионена (2 мг/мл) в течение 20 мин. Затем капилляр оставляли на ночь. На следующий день капилляр промывали

последовательно 10 мин водой, 20 мин 0.76 мМ раствором НЧЗ, стабилизированных цитрат-ионами, после чего оставляли на ночь. Перед работой капилляр промывали 10 мин водой.

**Методика 5. Модифицирование кварцевого капилляра 6,10-ионеном и производным природного полимера.** После стандартной обработки (см. *Методику 3*) капилляр промывали 20 мин водным раствором 6,10-ионена (2 мг/мл) в течение 20 мин. Затем капилляр оставляли на ночь. На следующий день промывали последовательно 10 мин водой, 40 мин водным раствором полимера (1 мг/мл), после чего капилляр оставляли на ночь и на следующий день промывали 10 мин водой.

**Методика 6. Модифицирование кварцевого капилляра 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитрат-ионами, и производным природного полимера.** После стандартной обработки (см. *Методику 3*) капилляр промывали 20 мин водным раствором 6,10-ионена (2.0 мг/мл) в течение 20 мин и оставляли на ночь. На следующий день капилляр промывали последовательно 10 мин водой, 20 мин 0.76 мМ раствором НЧЗ, стабилизированных цитрат-ионами, после чего капилляр оставили на ночь. На следующий день капилляр последовательно промывали 10 мин водой, 40 мин водным раствором полимера (1.0 мг/мл), после чего капилляр оставляли на ночь и на следующий день промывали водой в течение 10 мин.

Для получения хроматографических сорбентов использовали аналогичные методики послойного нанесения: силикагель последовательно обрабатывали растворами реагентов, оставляли на ночь после каждой стадии модифицирования и промывали водой/цитратным буферным раствором до полного удаления реагента перед каждой новой стадией и на следующий день после окончания модифицирования.

**Методика 7. Модифицирование силикагеля 6,10-ионеном (Получение Сорбента-1).** Силикагель Kromasil 100-5-Sil (5 мкм) активировали раствором 0.001 М NaOH. Затем 2 раза промывали деионизованной водой. 1.5 г активированного силикагеля обрабатывали 22 мл раствора 6,10-ионена (20.9 мг/мл) в воде в течение 20 минут при температуре 60°C на УЗ-ванне. Количество сорбированного на поверхности силикагеля 6,10-ионена во всех синтезах с данной стадией оценивали по разнице между его исходным количеством, используемого для модифицирования, и содержанием ионена в растворе после сорбции, обнаруженным методом осадительного титрования по *Методике 8*.

**Методика 8. Осадительное титрование 6,10-ионена.** На следующий день после нанесения 6,10-ионена на силикагель, постреакционную смесь разбавляли водой в 2 раза и титровали 0.01 М раствором додецилсульфата натрия. Формирование ионных ассоциатов при

взаимодействии ионена и ДСН приводит к помутнению раствора. Исчезновение помутнения означает полный расход ионена из раствора на образование ассоциатов преизбыток ДСН в растворе, что приводит к растворению ПЭК (т.е. его диссоциации на исходные полиэлектролиты). Таким образом, титровать следует до исчезновения помутнения. Предел обнаружения методики 0.0005 г/мл.

**Методика 9. Модифицирование силикагеля 6,10-ионеном и лигносульфонатом натрия (Получение Сорбента-2).** Силикагель Kromasil 100-5-Sil (5 мкм) последовательно обрабатывали растворами 0.001 М NaOH, 6,10- ионена (10.0 мг/мл), предварительно растворенного в воде. Затем 2 раза промывали деионизованной водой. Далее сорбент 30 мин обрабатывали водным раствором ЛСТ (1 мг/мл) при нагревании на УЗ-ванне до 60°C, после чего оставили на ночь.

**Методика 10. Модифицирование аминопропилсиликагеля глутаровым альдегидом, хитозаном и лигносульфонатом натрия (Получение Сорбента-3).** Аминопропилсиликагель (7.5 мкм) обрабатывали раствором глутарового альдегида (0.2%) в ФБ (рН 6.86) и выдерживали в течение часа при встряхивании на механическом шейкере. После этого сорбент промывали деионизованной водой и помещали в водный раствор хитозана (0.67 мг/мл), доведенный до значения рН 7 уксусной кислотой, и выдерживали в течение 16 часов. Затем сорбент вновь промывали водой и встряхивали в течение часа с водным раствором ЛСТ (1 мг/мл). Для заполнения колонок Сорбентами 1 – 3 выбрали ФБ (рН 7.24).

**Методика 11. Модифицирование силикагеля 6,10 –ионеном и сульфатом декстрана (Получение Сорбента-4).** Силикагель Kromasil 100-5-Sil (5 мкм) массой 2.80 г активировали согласно *Методике 7*. Активированную поверхность силикагеля обрабатывали раствором 6,10-ионена (0.07 г/мл) в течение 20 минут при температуре 60°C на УЗ-ванне. Раствор оставляли на сутки, затем 2 раза промывали деионизованной водой. Полученный сорбент обрабатывали раствором СД (12.5 мг/мл), перемешивая на механическом шейкере 40 минут. Полученную смесь оставляли на ночь.

**Методика 12. Модифицирование силикагеля 6,10 –ионеном и сульфатом декстрана двукратно (Получение Сорбента-5).** Получали Сорбент-4 по *Методике 11*, после чего повторяли процедуры нанесения 6,10-ионена и СД по данной методике.

**Методика 13. Модифицирование силикагеля 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитрат-ионами, и сульфатом декстрана (Получение Сорбента-6).** 3.75 г силикагеля Kromasil 100-5-Sil (5 мкм) обрабатывали раствором 0.001 М NaOH (16 мл), помещали на УЗ-ванну на 20 минут, после чего дважды промывали деионизованной водой.

Активированную поверхность силикагеля обрабатывали раствором 6,10-ионена (0.07 г/мл) в 15 мМ цитратном буферном растворе (ЦБ) (рН 6.5) в течение 20 минут при температуре 60°C на УЗ-ванне. Смесь оставляли на ночь. На следующий день полученный сорбент 2 раза промывали водой и обрабатывали 30 мл раствора НЧЗ (0.76 мМ), встряхивая на механическом шейкере в течение 40 минут, после чего оставляли на сутки. Затем промывали сорбент водой, после чего обрабатывали раствором СД (12.5 мг/мл) в 15 мМ ЦБ (рН 6.5), встряхивая на механическом шейкере 40 минут. Полученную смесь оставляли на ночь. На следующий день синтезированный сорбент промывали водой.

По данным ИК-спектроскопии после синтеза на поверхности сорбента остаётся 99.9 % используемого в синтезе СД, после промывки сорбента – не менее 90 %.

Заполнение колонок Сорбентом-4 и Сорбентом-5 проводили из смеси метанол/вода в соотношении (1:7).

**Методика 14. Определение тетрагидрозолина, карбиноксамина и фурацилина в моче человека.** Аликвоту мочи (1 мл) разбавляли в 10 раз ФЭ, после чего центрифугировали в течение 5 мин при скорости 10000 об/мин. Полученный фильтрат использовали для электрофоретического определения. Условия электрофоретического определения: капилляр – кварцевый капилляр, модифицированный 6,10-ионеном и сульфатом декстрана; ФЭ – 25 мМ ЦБ (рН 6.5), приложенное напряжение составило 15 кВ, длина волны детектирования 235 нм. На основе предварительно полученных в данных условиях градуировочных зависимостей для тетрагидрозолина, карбиноксамина и фурацилина определяли по площади пика содержание этих соединений в моче человека (построение градуировочной зависимости и проверка правильности определения методом ВЭЖХ описаны в главе 6.4). Предложенным способом проводили определение тетрагидрозолина, карбиноксамина и фурацилина в 5 аликвотах мочи.

**Методика 15. Определение сорбиновой и бензойной кислот в минеральной воде “Архыз”.** Кислоты определяли методом внешнего стандарта. Для этого предварительно для них получали градуировочные зависимости в координатах площадь пика – концентрация кислоты по водным растворам (описание получения зависимостей и проверки правильности определения методом КЭ приведено в главе 7.3). Аликвоту минеральной воды (10 мл) разбавляли в 2 раза деионизованной водой и тщательно перемешивали полученный раствор. Далее его использовали непосредственно для хроматографического определения кислот. Условия хроматографического определения: НФ – силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и лигносульфонатом натрия; ПФ – ацетонитрил/7 мМ NaClO<sub>4</sub> (рН 6.80) (70 : 30), спектрофотометрическое детектирование при  $\lambda = 220$  нм, F = 1.0 мл/мин. Пробу (20 мкл) вводили в хроматограф и определяли содержание в

ней кислот по площадям соответствующих им пиков и по предварительно полученным градуировочным зависимостям. Описанным способом проводили определение кислот в 5 аликвотах воды.

**Методика 16. Определение фенолкарбоновых кислот в красном вине “Изабелла”.**

Ванилиновую, галловую и бензойную кислоту определяли методом внешнего стандарта. Из 10 мл вина кислоты экстрагировали 10 мл этилацетата 3 раза. Экстракт осушали, сухой остаток растворяли в ПФ. Полученный раствор использовали для хроматографического определения кислот. Условия определения: НФ – силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и лигносульфонатом натрия; ПФ – ацетонитрил/7 мМ NaClO<sub>4</sub> (рН 6.80) (70:30), спектрофотометрическое детектирование при  $\lambda = 220$  нм, F = 1.0 мл/мин. Пробу (20 мкл) вводили в хроматограф и определяли содержание в ней кислот по площадям соответствующих им пиков и по предварительно полученным градуировочным зависимостям площади пика от концентрации соответствующей кислоты (описание построения градуировочной зависимости и проверки правильности определения методом добавок приведено в главе 7.3). Описанным способом проводили определение кислот в 5 аликвотах вина.

**Методика 17. Определение сорбиновой, галловой, *n*-кумаровой и кофеиновой кислот в цитрусовом мёде.** 3 г цитрусового меда растворяли в 5 мл деионизованной воды. Смесь помещали на 10 минут на УЗ-ванну для полного перемешивания при комнатной температуре. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Собранный фильтрат использовали для хроматографического определения. Содержание сорбиновой, галловой, кумаровой и кофеиновой кислот определяли методом внешнего стандарта (описание построения градуировочных зависимостей для кислот и проверки правильности определения методом добавок приведены в главе 7.5). Условия: НФ – силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и сульфатом декстрана. ПФ – 15 мМ ЦБ (рН 4.8)/метанол (90:10), детектирование спектрофотометрическое при  $\lambda = 254$  нм, F = 0.5 мл/мин.

**Методика 18. Определение азотсодержащих фармпрепаратов в плазме крови.** К аликвоте сыворотки крови (300 мкл) добавляли 50 мкл внутреннего стандарта (фенацетин, водно-метанольный раствор (90:10) 100 нг/мл). После этого добавляли 650 мкл ацетонитрила. Полученную смесь центрифугировали при 4 °С со скоростью 13200 об/мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5415R в течение 10 мин. 900 мкл надосадочного раствора помещали в вакуумную центрифугу ChristRVC 2-25 CDplus и высушивали при 1400 об/мин при 45 °С в течение 1.5 часа. Полученный остаток растворяли в 900 мкл ПФ на УЗ-ванне, затем центрифугировали от нерастворимого осадка 5 мин при 13200 об/мин. Полученную

надосадочную жидкость использовали непосредственно для хроматографического определения методом внутреннего стандарта. Для этого строили градуировочную зависимость в координатах отношение площадей пиков фармпрепарата и внутреннего стандарта – концентрация фармпрепарата. Хроматографические условия: НФ – силикагель, двукратно модифицированный 6,10-ионеном и СД. ПФ состава ацетонитрил / 15 мМ ацетатный буферный раствор (ледяная уксусная кислота/ацетат аммония) (рН 5.55) (10:90). F=1 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме MRM с использованием источника ионизации электрораспылением (ESI). Давление газа-распылителя (азот) составило – 50 psi<sup>1</sup> (3.45бар), турбо-газа (азот) – 60 psi(4.14 бар). Температура турбо-газа – 600 °С. Потенциал на игле-распылителе – 5.5 кВ. Для детектирования использовали 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.

**Методика 19. Потенциометрическое титрование сорбентов для ВЭЖХ.** Навеску сорбента (100 мг) помещали в стакан, добавляли 20 мл 0.25 М KNO<sub>3</sub>, измеряли значение рН. Затем добавляли порции титранта (0.100 М NaOH или 0.100 М HCl) по 0.1 мл, ждали 5 минут для установления равновесия на поверхности и снова измеряли значение рН.

#### 5.4. Техника эксперимента

**Определение хроматографических параметров разделения.** Новую хроматографическую колонку после заполнения оставляли на сутки. На следующий день её промывали соответствующим растворителем в течение 1 часа со скоростью 0.5 мл/мин.

Непосредственно перед проведением экспериментов колонку кондиционировали ПФ в течение 20 – 30 минут. Из полученных хроматограмм определяли времена удерживания неудерживаемых (мертвое время) и удерживаемых компонентов, а также ширину пиков у основания. Затем по приведённым ниже формулам рассчитывали хроматографические параметры – исправленное время удерживания ( $t'_r$ ), факторудерживания ( $k'$ ), коэффициент селективности ( $\alpha$ ), разрешение пиков ( $R_s$ ), число теоретических тарелок ( $N$ ).

$$t'_r = t_r - t_m$$

---

<sup>1</sup>psi–мера давления (1 psi=0.069 бар)



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

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2}$$

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w_i} \right)^2$$

где  $t_m$  – мертвое время,  $t_{r1}, t_{r2}$  – времена удерживания компонентов,  $w_1, w_2$  – значение ширины пика у основания.

**Определение электрофоретических параметров разделения.** Новый капилляр готовили к работе следующим образом: последовательно промывали водой (30 минут) и раствором ФЭ (30 минут). Ежедневно перед началом работы капилляр последовательно промывали деионизованной водой (10 минут), ФЭ (10 минут). Между параллельными измерениями капилляр промывали раствором ФЭ (2 мин).

Для определения параметров разделения смеси пробу вводили в капилляр и регистрировали времена миграции. Образцы вводили гидродинамически (10 мбар, 30 с). Приложенное напряжение составляло  $\pm(8 - 25)$  кВ. По измеренным временам миграции рассчитывали эффективную электрофоретическую подвижность ( $\mu_{эф}$ ), электрофоретическую подвижность маркера электроосмотического потока ( $\mu_{ЭОП}$ ) по приведённым ниже формулам и разрешение пиков ( $R_s$ ), эффективность капилляра (ГТ) по формулам, обсуждаемым в технике хроматографических экспериментов.

$$\mu_{эф} = \frac{L_{эф}L}{U} * \left[ \frac{1}{t} - \frac{1}{t_{ЭОП}} \right]$$

$$\mu_{ЭОП} = \frac{L_{эф}L}{U} * \left[ \frac{1}{t_{ЭОП}} \right]$$

где  $L$  – длина капилляра (от входа до выхода),  $L_{эф}$  – эффективная длина капилляра (от входа до детектора),  $U$  – прикладываемое напряжение,  $t$  – время миграции соединения,  $t_{ЭОП}$  – время миграции маркера ЭОП.

## 5.5. Физико-химическое исследование полученных сорбентов

Для контроля стадий модифицирования силикагеля и оценки некоторых свойств полученных сорбентов в работе использовали следующие физико-химические методы анализа.

### Элементный анализ

Для определения содержания модификаторов на поверхности сорбентов был проведен элементный анализ образцов полученных в работе стационарных фаз. В табл. 7 представлено содержание углерода, водорода, азота и серы. Эти данные согласуются с результатами, полученными с использованием для этой цели других физико-химических методов.

Можно сделать вывод, что около 77 % 6,10-ионена сорбировалось на поверхности силикагеля в Сорбенте-1 (183.4 мг на г силикагеля). Около 72 % ЛСТ остаётся на силикагеле при синтезе Сорбента-2 в случае использования ионена в качестве поликатиона и в 2 раза меньше в случае хитозана.

**Таблица 7.** Результаты элементного анализа.

Сорбент	% С	% Н	% N	% S
Сорбент-1	4.23	3.11	0.06	–
Сорбент-2	6.10	2.91	0.05	0.81
Сорбент-3	5.63	2.70	нет данных	0.39
Сорбент-4	3.55	2.33	0.06	0.47
Сорбент-5	6.61	2.09	0.13	0.90
Сорбент-6	7.82	1.53	0.06	0.51

Смена типа полианиона – СД вместо ЛСТ – не приводит к существенным изменениям содержания 6,10-ионена на поверхности силикагеля. По результатам элементного анализа можно сказать, что в Сорбенте-4 присутствует 90.3 % СД, используемого при синтезе, т.е. 17.5 мг СД на грамм силикагеля. ЛСТ сорбируется в меньшей степени – 14.4 мг на грамм силикагеля, что составляет 72 % добавленного при модифицировании ЛСТ.

В случае Сорбента-5 можно сделать вывод о том, что двойное покрытие СД приводит к чуть меньшему, чем в 2 раза увеличению содержания серы по сравнению с его однослойным аналогом. 32 мг СД на грамм силикагеля вместо ожидаемых 35 мг. Видимо, это связано с частичным вымыванием СД с поверхности Сорбента-4 при его промывке.

Можно заметить, что в Сорбенте-6 использование НЧЗ не влияет на содержание 6,10-ионена (видимо, он очень прочно электростатически закрепляется на поверхности активированного силикагеля на первой стадии синтеза). Содержание СД на поверхности данного сорбента составило 18.7 мг на грамм силикагеля. Это почти в 2 раза ниже, чем у двухслойного

Сорбента-5 и немного выше, чем в аналогичном Сорбенте-4 без золота. Можно предположить, что при наличии НЧЗ в структуре ПЭП СД не только электростатически образует ПЭК с оставшимся на поверхности 6,10-ионеном (который не образовал каких-либо связей с НЧЗ), но и замещает в координационной сфере стабилизатор НЧЗ – цитрат натрия.

### **Осадительное титрование**

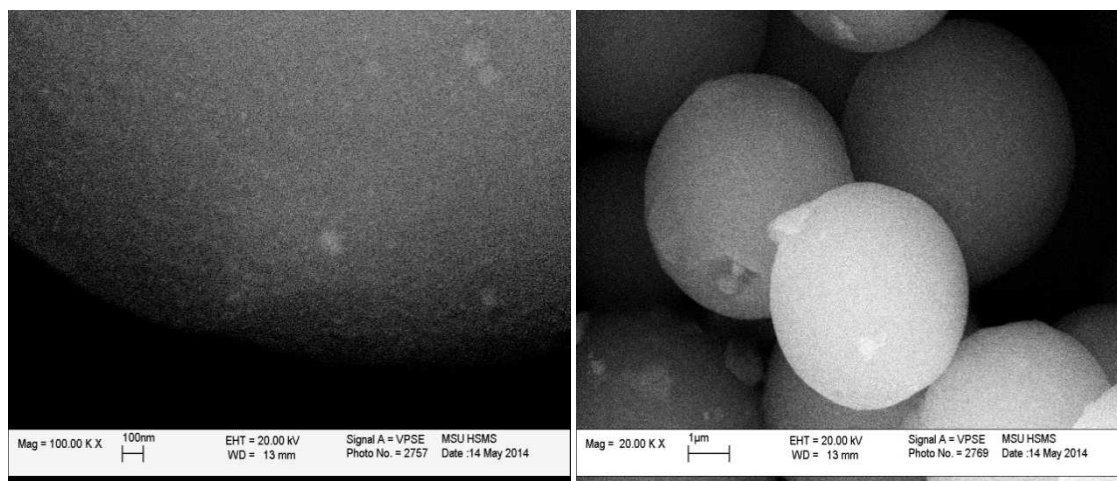
Для подтверждения модифицирования 6,10-ионеном использовали метод осадительного титрования постреакционной смеси 0.01 М раствором ДСН по *Методике* 8. В постреакционных растворах помутнения, свидетельствующего об образовании комплекса между 6,10-ионеном и ДСН, не наблюдалось. Таким образом, в рамках передела обнаружения методики не менее 95 % 6,10-ионена, используемого при модифицировании, сорбируется на силикагеле.

### **ИК-спектроскопия**

Для оценки стадии модифицирования СД постреакционный и растворы после промывок сорбентов исследовали на наличие в них СД методом ИК-спектроскопии. Для этого предварительно была построена градуировочная зависимость интенсивности поглощения ИК-излучения от концентрации СД в растворе в диапазоне 0.3 – 10.0 мкг/мл. В постреакционном растворе было обнаружено 0.68 % от всего СД, используемом на стадии модифицирования. Установлено также, что в промывочных растворах присутствует до 8% используемого синтезе СД. Таким образом, не менее 90 % СД содержится на поверхности модифицируемого силикагеля.

### **Сканирующая электронная микроскопия**

О модифицировании Сорбента-6 НЧЗ можно визуально судить по микрофотографиям, полученным методом сканирующей электронной микроскопии (**СЭМ**) (рис. 21). На микрофотографиях четко видно наличие НЧЗ в структуре сорбента (это белые точки). На микрофотографии справа прослеживается сферическая структура силикагеля марки “Kromasil 100-5-Sil”, а также наличие модифицирующего слоя на его поверхности. К сожалению, извлечь информацию о распределении НЧЗ на поверхности сорбента не представляется возможным, так как структура сорбента сложная и слой НЧЗ покрыт слоем СД.



**Рис. 21.** Микрофотографии, полученные методом СЭМ, для Сорбента-6 (силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и СД).

### Метод низкотемпературной адсорбции азота

Оценку параметров поверхности сорбентов, модифицированных 6,10-ионеном и СД (они обладают лучшей селективностью и обеспечивают наибольшую эффективность колонки) проводили методом низкотемпературной адсорбции азота, использовали соответствующую изотерму адсорбции. Из табл. 8 видно, что с ростом числа модифицирующих слоёв по сравнению с немодифицированным силикагелем площадь поверхности полиэлектролитных сорбентов снижается так же, как и объём их микропор. Это вполне согласуется с процессом послойного модифицирования силикагеля, когда взаимопроницаемые слои модификаторов в некоторой степени “сжимают” друг друга.

**Таблица 8.** Исследование специфической поверхности сорбентов для ВЭЖХ на основе СД.

Сорбент	Площадь поверхности, м <sup>2</sup> /г	Объём микропор, см <sup>3</sup> /г
Силикагель	300	0.90
Сорбент-4	246	0.74
Сорбент-5	234	0.67
Сорбент-6	208	0.62

### Метод диффузного отражения

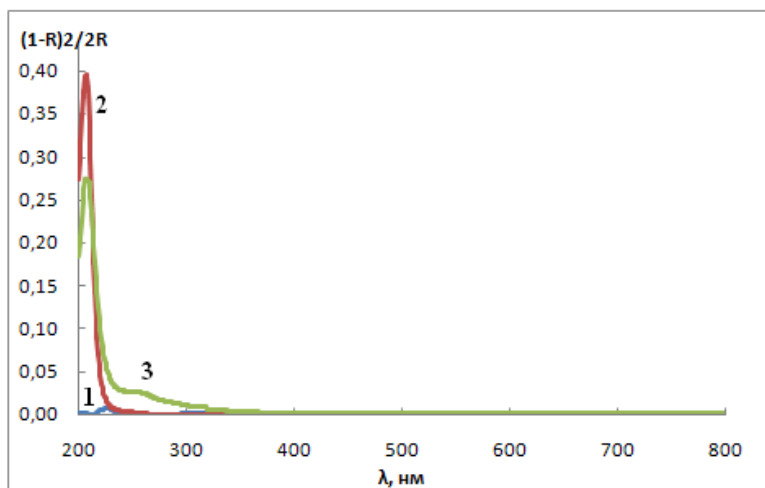
Для подтверждения модифицирования поверхности использовали также метод диффузного отражения (ДО). Теория ДО и пропускания слоев, рассеивающих и поглощающих свет, исследовалась многочисленными авторами, так как эта проблема имеет большое практическое значение для многих областей (кроющая способность красок, содержание

белящего вещества в бумагах, эффективность матовых стекол и т. д.). Наиболее общая теория развита Кубелкой и Мунком. Уравнения, выведенные другими авторами, оказываются, как правило, частными случаями уравнения Кубелки–Мунка. Это уравнение описывает случай бесконечно толстого, непрозрачного слоя, что имеет место для мелких порошков при толщине слоя уже в несколько миллиметров:

$$F(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}}$$

Здесь  $R_{\infty} = \Phi_{\text{образец}}/\Phi_{\text{стандарт}}$  – относительное ДО слоя исследуемого вещества, отнесенное к непоглощающему стандарту, например, MgO или NaCl (коэффициент отражения) [240–242].

На рис. 22 представлены зависимости функции Кубелки–Мунка, связанной с поглощением света веществом, от длины волны для полученных в работе хроматографических сорбентов.

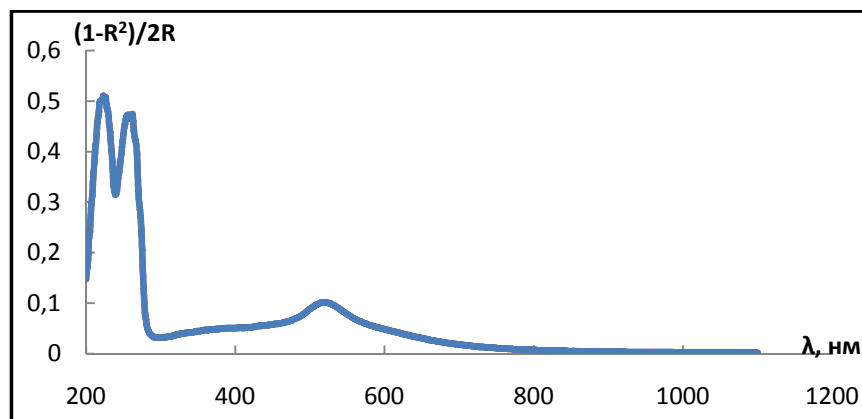


**Рис. 22.** Зависимость поглощения света от длины волны для 1 – силикагеля; 2 – силикагеля, модифицированного 6,10-ионеном; 3 – силикагеля, модифицированного 6,10-ионеном и СД.

Можно сделать вывод о прошедшей первой стадии модифицирования 6,10-ионеном (ярко выраженный максимум поглощения в области 205 нм). Вероятно, часть 6,10-ионена смывается после промывки сорбента после модифицирования 6,10-ионеном либо при дальнейшем модифицировании силикагеля СД. Это можно предположить по снижению максимума при 205 нм на кривой-3 по сравнению с кривой-2. Также на кривой -3 появляется небольшой максимум в области 252 нм, который соответствует СД.

При модифицировании поверхности 6,10-ионеном, НЧЗ и СД соответственно, появляется характерный для золота максимум поглощения в видимой области (рис. 23). Также заметно увеличение интенсивности максимума СД. Это позволяет предположить более прочное его

закрепление по сравнению со случаем поверхности, где есть только 6,10-ионен и нет НЧЗ. Таким образом, можно предположить определённый вклад замены цитрат-ионов в структуре НЧЗ на СД в механизм образования данного полислоистого покрытия.

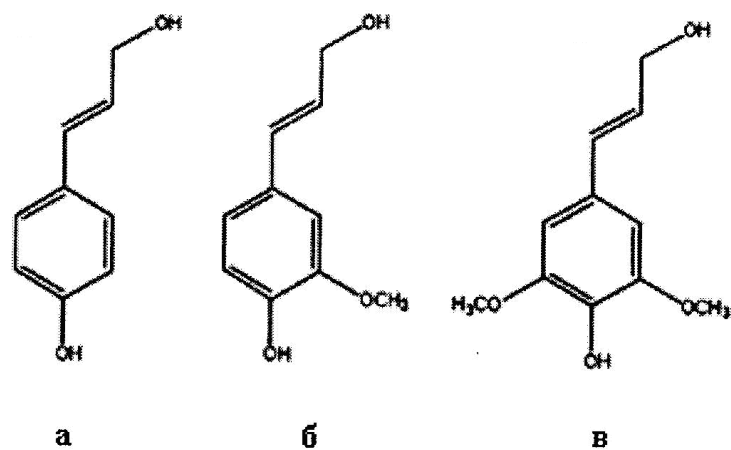


**Рис. 23.** Зависимость поглощения света от длины волны для силикагеля, модифицированного 6,10-ионеном, НЧЗ и СД.

### Потенциометрическое титрование сорбентов для ВЭЖХ

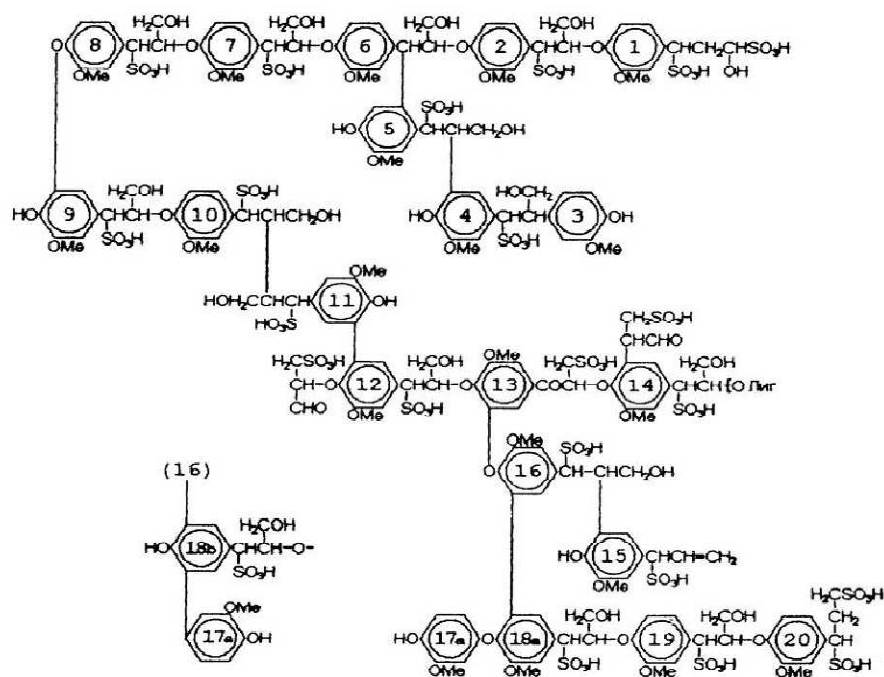
Титриметрические методы являются наиболее простыми и надежными методами оценки поверхности сорбентов, обладающих ионообменными свойствами. Наибольшее распространение получил метод кислотно-основного титрования. Из анализа результатов титрования можно получить информацию о количестве кислотных или основных групп на поверхности сорбента, об их константах диссоциации [243]. Однако, при титровании материалов, содержащих такие полимеры как производные полисахаридов, характер кривых титрования сложен, и определить истинные значения констант диссоциации невозможно. Поэтому на основании кривых титрования можно сделать лишь самые общие выводы о кислотно-основных свойствах макромолекул.

Лигнин – второй по распространенности в природе биополимер, уступающий по запасам только целлюлозе. Как продукт ферментативной радикальной дегидрогенизационной полимеризации трех основных мономерных предшественников – кониферилового, синапового и *п*-кумарового спиртов (рис. 24) [244, 245] – природный лигнин обладает очень сложной хаотической трехмерной структурой, основу которой составляют гваяцильные и сирингильные структурные единицы, представляющие собой *п*-замещенные производные соответственно 2-метоксифенола (гваякола) и 2,6-диметоксифенола [243].



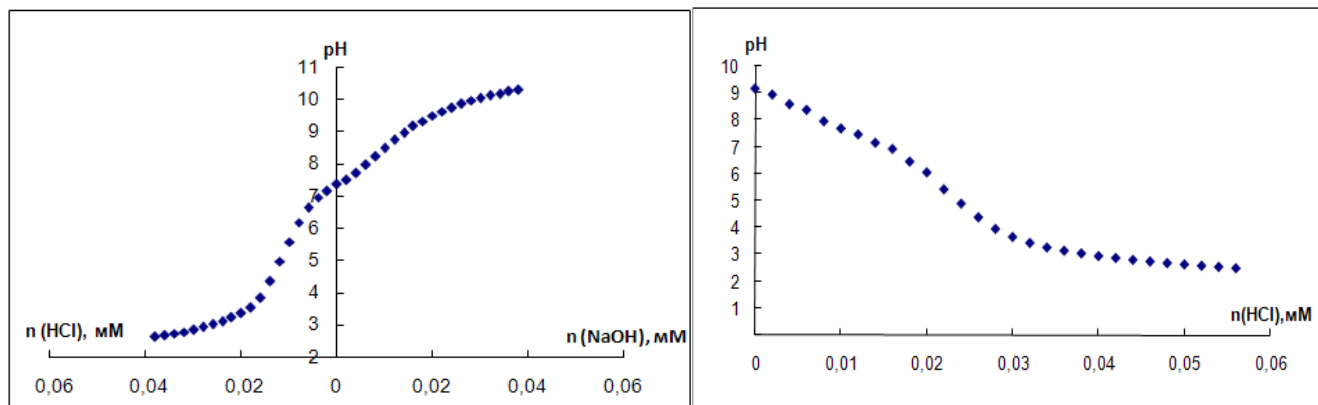
**Рис. 24.** Мономерные прекурсоры лигнина: а) *p*-кумаровый спирт, б) кониферилловый спирт, в) синаповый спирт.

Лигносульфонаты – сульфопроизводные биополимера лигнина, являющиеся вторичным продуктом сульфитной делигнификации древесины [246]. ЛСТ полифункциональны и содержат метоксильные, фенольные и гидроксильные, карбонильные, карбоксильные и сульфо-группы в натриевой форме, при действии на которые растворами кислот Na-форма легко переходит в H-форму (лигносульфовую кислоту). Схема строения лигносульфоновой кислоты представлена на рис. 25.



**Рис. 25.** Схема строения лигносульфоновой кислоты.

Все кривые титрования сорбентов получены по *Методике 19*. На рис. 26 приведены кривые титрования силикагеля, модифицированного ПЭК хитозан – ЛСТ и 6,10-ионен – ЛСТ. Очевидно, у первого наблюдаются преимущественно анионообменные и слабые катионообменные свойства. В случае использования 6,10-ионена в качестве поликатиона можно сделать вывод только о слабых, но заметно выраженных анионообменных свойствах.



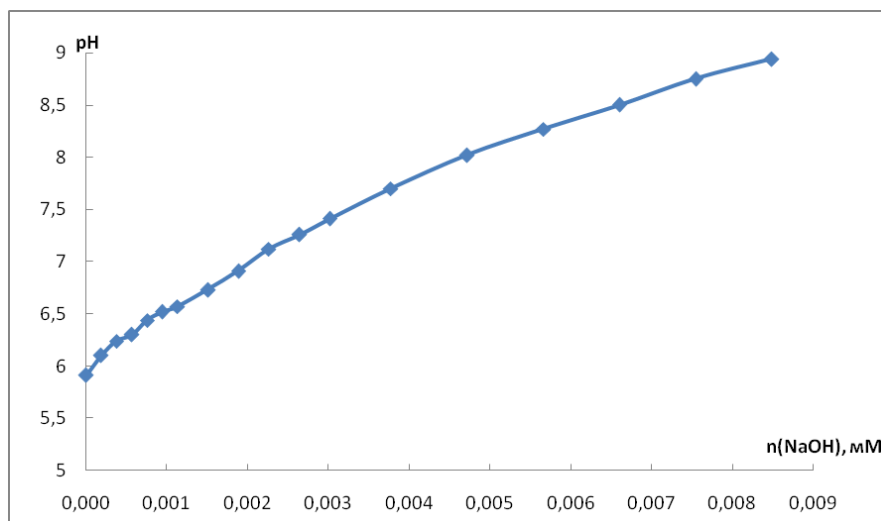
**Рис. 26.** Кривые титрования исследуемых сорбентов (слева направо): силикагель, модифицированный хитозаном и ЛСТ; силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и ЛСТ.

Анионообменные свойства связаны с наличием незакрытых положительно заряженных центров на атомах азота в структуре 6,10-ионена и хитозана. В случае ионена, как уже подтвердил элементный анализ, ЛСТ в большей степени сорбируется на силикагеле при модифицировании. Таким образом, положительно заряженных центров азота становится меньше и скачок на кривой титрования меньше.

Сульфат декстрана – известный модификатор поверхности в сепарационных методах. Напомним, что в его молекуле отсутствуют гидроксильные группы и есть сульфогруппы (рис. 16). Ниже приведена его кривая титрования (рис. 27).

Как следует из структуры 6,10-ионена, положительно заряженные центры на атомах азота, не вступивших в электростатическое взаимодействие с поверхностью силикагеля или сульфогруппами СД, могут способствовать наличию анионообменных свойств у модифицированных им силикагелей. Точно так же как незадействованные в образовании ПЭК и неэкранированные стерически сульфо-группы СД могут придавать сорбентам катионообменные свойства. На рис. 28 представлены кривые титрования силикагеля Kromasil, силикагеля, модифицированного 6,10-ионеном, и силикагеля, послойно модифицированного 6,10-ионеном и СД. Из рис. 29 и 30. можно оценить, как влияет на свойства сорбента двойное модифицирование полимерами и включение в структуру полислоистого покрытия НЧЗ.

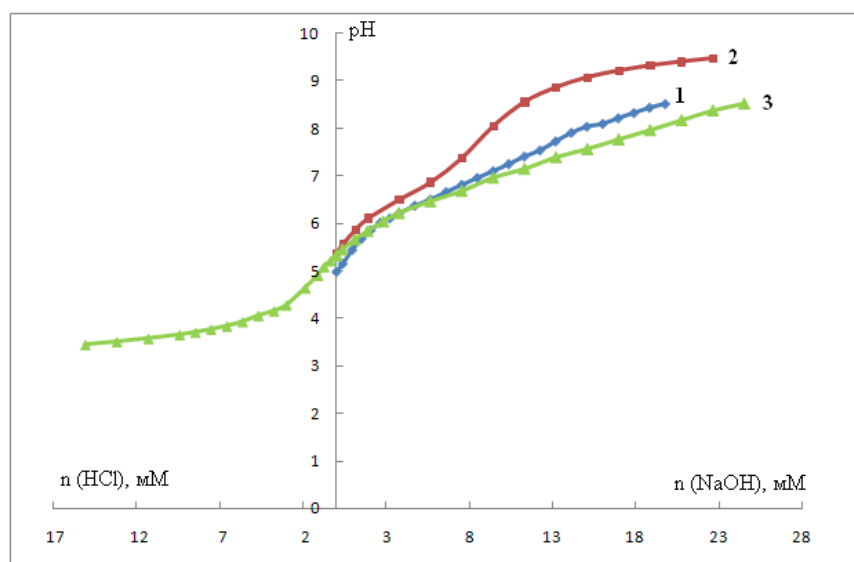




**Рис. 27.** Кривая титрования СД.

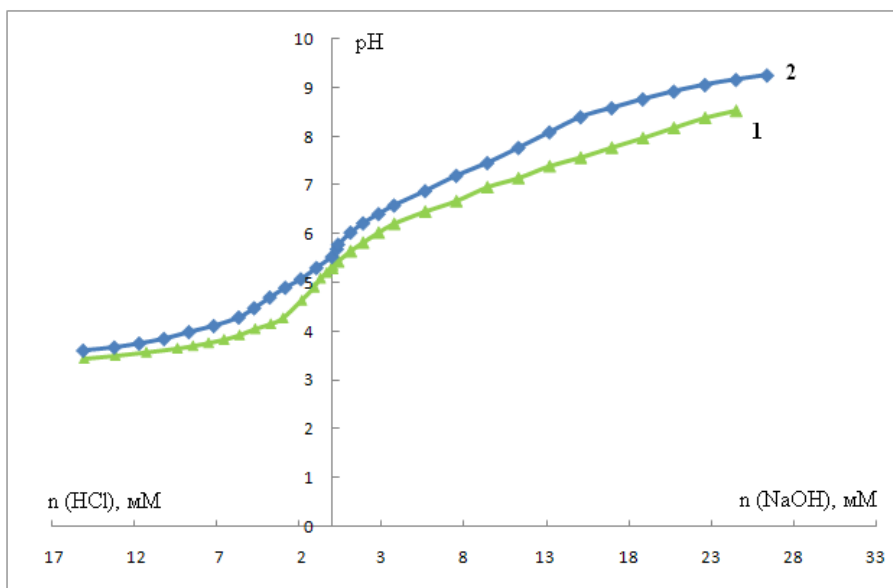
Из формы кривых на рис. 28 можно заключить, что после модифицирования иононом сорбент приобретает слабые основные и анионообменные свойства. Они очень слабо выражены у силикагеля модифицированного послойно иононом и СД (рис. 28) и фактически отсутствуют у силикагеля, модифицированного иононом, НЧЗ и СД (рис. 30). В водном растворе их рН практически одинаков.

В случае дублирования процедуры модифицирования иононом и СД, кривая титрования располагается выше, чем при единичном модифицировании (рис. 29). Авторы [247] объясняют этот эффект разницей в полярности так называемой матрицы, на которой находится ПЭК “6,10-ионен – СД”.



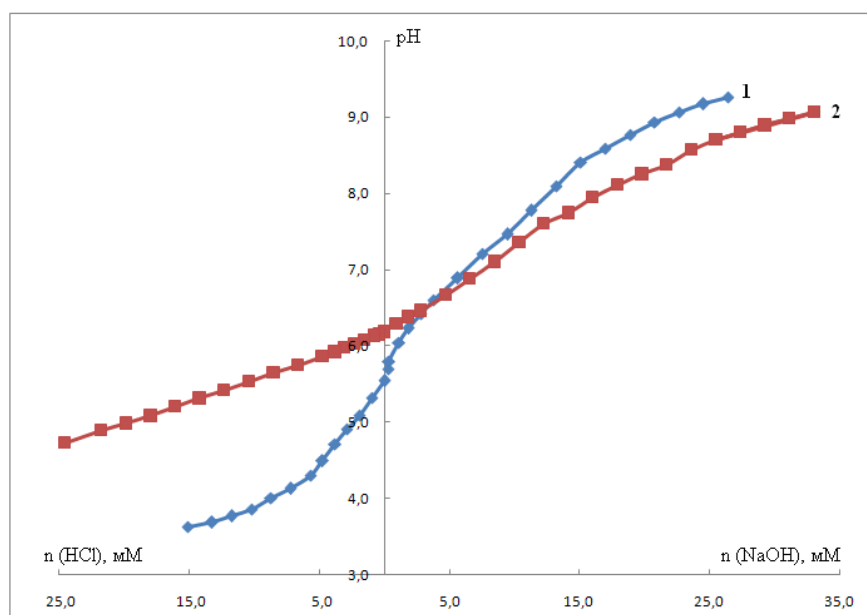
**Рис. 28.** Кривые титрования 1 – силикагеля, 2 – силикагеля, модифицированного 6,10-иононом, 3 – силикагеля, модифицированного 6,10-иононом и СД.

Перед началом титрования величина рН анионита, закреплённого на более полярной матрице меньше и кривая титрования расположена ниже. Чем полярнее матрица, тем больше она снижает основность титруемого анионита. Если ПЭК нанесён на силикагель, уже покрытый таким комплексом, матрица оказывается менее полярной, чем просто силикагель.



**Рис. 29.** Кривые титрования 1 – силикагеля, модифицированного 6,10-иононом и СД, 2 – силикагеля, двукратно модифицированного 6,10-иононом и СД.

Что касается Сорбента-6 с НЧЗ, скачок на его кривой титрования фактически отсутствует (рис. 30). Можно предположить, что свободных положительных центров азота 6,10-ионена на поверхности такого сорбента практически нет, и он не обладает ионообменными свойствами.



**Рис. 30.** Кривые титрования 1 – силикагеля, двукратно модифицированного 6,10-иононом и СД, 2 – силикагеля, модифицированного 6,10-иононом, НЧЗ и СД.

## Глава 6. Электрофоретическое исследование полиэлектролитных систем

Обзор литературных данных показал актуальность хроматографического разделения и определения азотсодержащих соединений (в частности лекарственных препаратов) и ФКК. На примере данных классов соединений мы изучали поведение полиэлектролитных систем, представляющих собой матрицы (кварцевый капилляр и силикагель), послойно модифицированные поликатионами и полианионами, образующими ПЭК на их поверхности. Интересно также было оценить влияние модификатора – НЧЗ – на такие системы.

На основании литературных данных [47, 48, 55, 63–65, 77, 78, 82] и предварительных результатов, полученных в лаборатории хроматографии, в качестве крупного поликатиона для модифицирования силикагеля выбрали 6,10-ионен, а в качестве крупных полианионов – сульфат декстрана, N-(3-сульфо, 3-карбокси)-пропионилхитозан, лигносульфонат натрия.

Кварцевый капилляр динамически послойно модифицировали поликатионом 6,10-ионеном и полианионом (СД, СКПХ или ЛСТ соответственно). В ряде случаев между слоем 6,10-ионена и полианиона на капилляре располагали слой НЧЗ, что по литературным данным могло повысить упорядоченность и стабильность полиэлектролитного покрытия [118–120].

### 6.1. Влияние модифицирования поверхности капилляра на электроосмотический поток

Кварцевый капилляр модифицировали НЧЗ, стабилизированными цитратом натрия, синтезированные по *Методике 1*. Для нанесения НЧЗ пользовались *Методикой 3*. В качестве маркера ЭОП выступал метилэтилкетон. Исследования проводили с 25 мМ ЦБ в качестве ФЭ. В ФЭ добавляли различное количество 0.76 мМ раствора НЧЗ (в объёмных процентах) и наблюдали за временами миграции маркера ЭОП. НЧЗ, стабилизированные цитратом натрия, заряжены отрицательно, поэтому они не должны сорбироваться на силикагеле.

У кварцевого капилляра ЭОП направлен от анода к катоду (положительная полярность). В ходе экспериментов не потребовалось менять положительную полярность электродов для того, чтобы зафиксировать пик маркера ЭОП. Это свидетельствует о том, что заряд поверхности остался отрицательным. При добавлении в ФЭ различных количеств НЧЗ не выявлено значимых изменений во времени миграции маркера ЭОП (табл. 9). Таким образом, используемые НЧЗ действительно заряжены отрицательно и не сорбируются на поверхности кварцевого капилляра.

После нанесения 6,10-ионена на стенку капилляра пик маркера ЭОП (метилэтилкетон) фиксировали при отрицательной полярности. Это согласуется с предполагаемой сменой заряда поверхности с отрицательного на положительный. Прецизионность электрофоретической

подвижности маркера ЭОП была невысокой ( $s_r = 0.11$ ), а её величина достаточно низкой ( $\mu_{\text{ЭОП}} = 8.77 \times 10^{-5} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ ).

**Таблица 9.** Влияние добавки НЧЗ в ФЭ на скорость ЭОП в кварцевом капилляре.

Содержание НЧЗ в пробе, $w_{\text{об}}$ , %	$t_{\text{м ЭОП}}$ , мин
0	2.10
50	2.25
60	2.04
70	2.06

Для капилляра, последовательно модифицированного 6,10-ионеном и НЧЗ, пик маркера ЭОП снова фиксировали при положительной полярности. Это ещё раз подтверждает отрицательный заряд данных частиц. Величина средней электрофоретической подвижности маркера ЭОП в полученном капилляре возросла ( $\mu_{\text{ЭОП}} = 1.11 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ ). Она снижалась в течение нескольких суток (через 3 дня работы до  $\mu_{\text{ЭОП}} = 8.20 \times 10^{-5} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ ) и её прецизионность  $s_r$  составила 0.24. Видимо, это связано с непрочным закреплением НЧЗ на поверхности 6,10-ионена и их смыванием. Вполне вероятно также агрегация со временем этих частиц на поверхности капилляра.

Чтобы проверить последнее предположение, мы решили оценить влияние 6,10-ионена на стабильность НЧЗ, использованных к работе. Стабильность НЧЗ в присутствии ионена исследовали спектрофотометрическим методом. Максимум поглощения НЧЗ фиксируется при 520 нм, для агрегатов таких частиц наблюдается широкий максимум с плечом в области 662 – 675 нм. К 0.76 мМ раствору НЧЗ приливали раствор 6,10-ионена (2 мг/мл) в различных объёмных соотношениях. После этого наблюдали на спектрах полученных смесей за изменением высот пиков, соответствующих НЧЗ и их агрегатам (табл. 10).

**Таблица 10.** Влияние объёмного соотношения растворов НЧЗ (0.76 мМ) и 6,10-ионена (2 мг/мл) на стабильность НЧЗ.

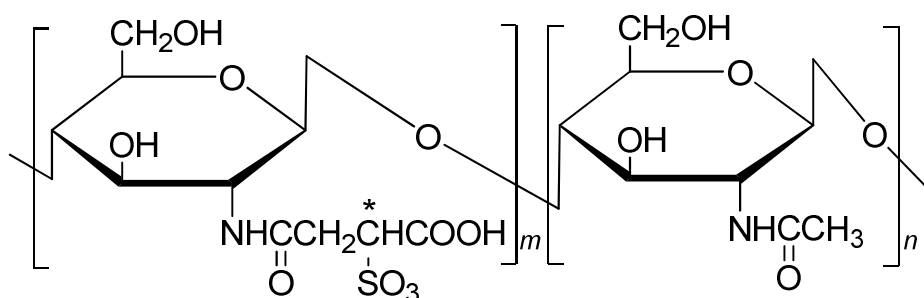
AuNPs	6,10-ионен	$h (\lambda = 520 \text{ нм})$	$h (\lambda = 662 - 675 \text{ нм})$	$h_{662-675}/h_{520}$
1	0	0.665	0	0
1	3	0.457	0.621	1.36
1	5	0.528	0.674	1.28
1	7	0.556	0.697	1.32
1	10	0.554	0.664	1.20

Заметно, что небольшая добавка ионена первоначально приводит к появлению пика агрегата на спектре. Однако по мере увеличения соотношения 6,10-ионен/НЧЗ содержание неагрегированных НЧЗ снова повышается. Из полученных данных можно сделать вывод о некоторой стабилизации НЧЗ 6,10-ионеном.

Изменение величины ЭОП во времени для кварцевого капилляра, модифицированного 6,10-ионеном и НЧЗ, говорит о недостаточности покрытия капилляра только этими модификаторами для создания устойчивого в работе капилляра. Это вполне согласуется с литературными данными [19, 56, 57]. Исходя из экспериментальных и литературных данных, мы продолжили модифицирование капилляра крупными отрицательно заряженными полианионами – производными природных полимеров.

## 6.2. Разделение веществ в кварцевом капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и полианионами

СКПХ – производное природного полисахарида хитозана, впервые предложенное и изучаемое в нашей лаборатории в качестве модификатора поверхности силикагелей и капилляров [77]. В этом соединении по аминогруппе хитозана введен дополнительный хиральный центр, в состав которого входят сульфо-группа и карбоксильная группа (рис. 31).



**Рис. 31.** Структурная формула N-(3-сульфо, 3-карбокси)-пропионилхитозана.

Модифицирование кварцевого капилляра послойно 6,10-ионеном и СКПХ проводили по Методике 5. Заряд поверхности полученного капилляра после нанесения очередного слоя модификатора исследовали, наблюдая за направлением ЭОП. Для этого в качестве ФЭ использовали 25 мМ ЦБ (рН 6.5). Приложенное напряжение составило 15 кВ. После нанесения 6,10-ионена, как и следовало ожидать, ЭОП сменил своё направление на противоположное (полярность электродов отрицательная). Заряд поверхности стенок капилляра стал положительным. После нанесения СКПХ ЭОП снова был направлен от анода к катоду, т. е. обладал положительным зарядом. Это согласуется с отрицательным зарядом внутренней стенки полученного капилляра.

Величина электрофоретической подвижности маркера ЭОП составила  $1.24 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ , её относительное стандартное отклонение – 0.08. Следовательно, при замене НЧЗ на полисахарид (см. главу 6.1) подвижность маркера ЭОП немного повысилась, а стабильность работы капилляра возросла значительно.

Кварцевый капилляр аналогично был послойно модифицирован 6,10-ионеном и СД по *Методике 5*. Пик маркера ЭОП так же, как и в случае с СКПХ, фиксировали при положительной полярности электродов, что подтверждает модифицирование поверхности капилляра СД. Величина электрофоретической подвижности маркера ЭОП составила  $2.00 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ . Её прецизионность составила 0.05.

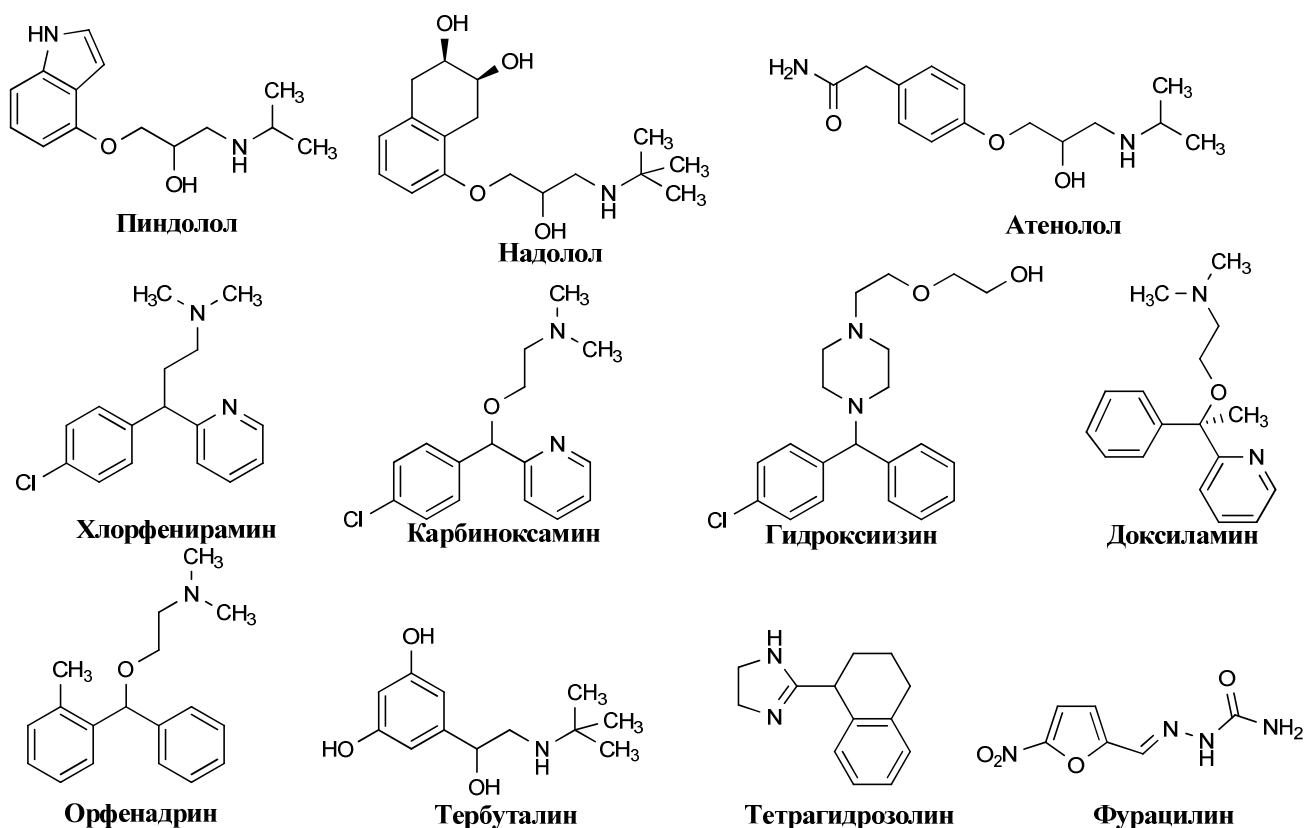
В ЛСТ потенциалопределяющими ионами являются макроионы  $\text{R-HSO}_3^-$  а в качестве противоионов служат катионы натрия. Отрицательно заряженные молекулы ЛСТ обладают низким сродством к поверхности немодифицированного силикагеля. Работы лаборатории предыдущих лет показали, что добавление хлорида натрия, т.е. введение катиона в раствор способствует агрегации ЛСТ и его адсорбции на поверхности, однако полного извлечения из раствора не происходит. Таким образом, для повышения сорбции ЛСТ на кварце или силикагеле необходимо наличие в системе достаточно высокой концентрации катионов, а лучше – крупного поликатиона. Мы хотели оценить возможности ПЭК 6,10-ионена и ЛСТ – соединения, принципиально отличного от изучаемых нами полисахаридов.

Кварцевый капилляр послойно модифицировали 6,10-ионеном и ЛСТ по *Методике 5*. Пик маркера ЭОП, в качестве которого выступал метилэтилкетон, фиксировали при отрицательной полярности. Это ещё раз подтверждает, что ЛСТ сорбируется на поверхности капилляра, модифицированного 6,10-ионеном, и несёт отрицательный заряд. Установлено, что при рН 4.5 электрофоретическая подвижность маркера ЭОП немного ниже, чем при рН 6.5. Можно предположить, что это связано с гидроксильными группами в структуре ЛСТ. При рН 4.5 они находятся ещё в недиссоциированной форме, т.е. общий отрицательный заряд ЛСТ в кислой области ниже, чем при рН 6.5, близком к нейтральному. Таким образом, несущий положительный заряд ЭОП также в первом случае слабее.

При наличии такого покрытия в капилляре в течение нескольких дней ток возрос до недопустимых величин. Работать на данном капилляре не представлялось возможным более 7 дней.

Возможности модифицированных капилляров для разделения полярных соединений исследовали на примере азотсодержащих фармакологически активных соединений – атенолол,

пиндолол, надолол, хлорфенирамин, карбиноксамин, тетрагидрозолин, тербуталин, доксиламин, гидроксизин, орфенадрин (рис. 32).



**Рис. 32.** Структурные формулы изучаемых азотсодержащих соединений.

При выборе рН ФЭ мы руководствовались наличием отрицательного заряда у ионогенных групп наших модификаторов, необходимого для модифицирования. Ранее при разделении оптических изомеров некоторых из данных азотсодержащих соединений в кварцевом капилляре в присутствии СД, установлено, что лучшие результаты получены при рН 6.5 – 6.8 [78]. Для СКПХ рK<sub>a</sub> карбоксильной группы составляет 5.8 [77]. Авторы работы [248] подтверждают, что наибольшая диссоциация ионогенных групп в ЛСТ низкой молекулярной массы (наш случай) наблюдается при рН 5.2. В связи с этим для работы со всеми тремя полианионами как “золотую середину” выбрали рН 6.5.

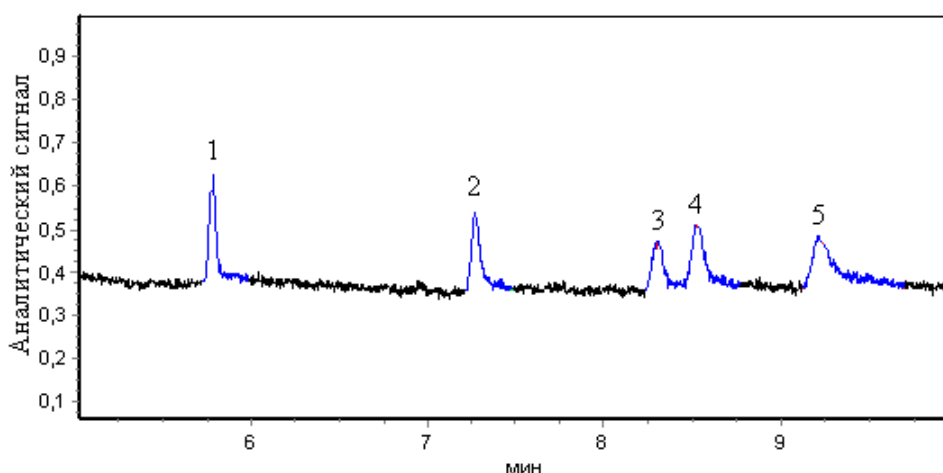
Важно, что при рН 6.5 у всех исследованных соединений, кроме гидроксизина, заряд на первичных, вторичных и третичных атомах азота (не в пиридиновом кольце) положительный. рK<sub>a</sub> пиндолола, атенолола, надолола, тетрагидрозолина, тербуталина и гидроксизина равны соответственно 9.21, 9.17, 9.17, 10.42, 9.33 и 6.34.

В качестве ФЭ использовали ФБ и ЦБ, поскольку они обладают хорошей буферной ёмкостью и могли обеспечить необходимую величину рН. Концентрацию буферных растворов

варьировали от 25 до 50 мМ. При использовании ФБ вещества мигрировали из капилляра менее чем за 2 мин. Разделить их даже при достаточно высокой концентрации 50 мМ не удавалось. Кроме того, предполагалось дальнейшее изучение систем, включающих модифицирующий слой НЧЗ, стабилизированных цитратом натрия. Вполне возможно, что ЦБ мог дополнительно участвовать в стабилизации НЧЗ в полислойном покрытии такого капилляра. Таким образом, мы остановились на ЦБ. Снижать его концентрацию ниже 25 мМ мы сочли нецелесообразным, так как это привело бы к увеличению электрофоретической подвижности модельных соединений. Повышение концентрации буферного раствора до 50 мМ наоборот повлекло бы за собой снижение электрофоретической подвижности азотсодержащих соединений и увеличение длительности их разделения. К тому же сильно возросла токовая нагрузка на капилляр.

Разделение проводили при напряжении 8, 15 и 25 кВ. При наибольшем напряжении скорость миграции препаратов была достаточно высокой и близкой по значению, что препятствовало их разделению. При напряжении 8 кВ разделение занимало длительное время. Разделения изучаемых веществ такого же качества можно было достигнуть за меньшее время при 15 кВ.

Наиболее подходящими условиями были следующие: ФЭ – 25 мМ ЦБ (рН 6.5),  $U = 15$  кВ.  $\lambda = 235$  нм (для пиндолола – 270 нм). Смесь тетрагидрозолина, пиндолола, тербуталина, надолола и гидроксизина была разделена за 10 мин (рис. 33). При достаточно удовлетворительных параметрах этого разделения (табл. 11) стоит отметить и недостатки такой системы – заметный уровень шума в базовой линии и повышение предела обнаружения некоторых соединений.



**Рис. 33.** Электрофореграмма смеси 1 – тетрагидрозолина, 2 – пиндолола, 3 – надолола, 4 – тербуталина, 5 – гидроксизина в кварцевом капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СКПХ ( $L/L_{\text{эфф}} = 38.7/29.3$  см). ФЭ – 25 мМ ЦБ (рН 6.5).  $U = 15$  кВ,  $\lambda = 235$  нм, гидродинамический ввод пробы за 30 с давлением 10 мбар.



**Таблица 11.** Разделение смеси тетрагидрозолина, пиндолола, тербуталина, надолола и гидроксизина в капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СКПХ (условия на рис. 33).

Соединение	$t_m$ , мин	$\alpha$	$R_s$	N, ТТ/м
Тетрагидрозолин	5.78	1.26	5.5	125800
Пиндолол	7.27	1.14	4.6	102900
Тербуталин	8.30	1.02	1.5	90400
Надолол	8.53	1.08	2.8	65600
Гидроксизин	9.24			28700

В капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СКПХ, исследовали влияние содержания модификатора в ФЭ на электрофоретическую подвижность азотсодержащих препаратов и эффективность капилляра. Содержание СКПХ в ФЭ варьировали от 0 до 1.08 % (табл. 12). С ростом содержания СКПХ от 0 до 0.15 % подвижность изучаемых соединений возрастает. Дальнейшее увеличение концентрации модификатора в ФЭ приводит к небольшому снижению их подвижности. Чёткой тенденции влияния модификатора в ФЭ на эффективность капилляра выделить не удаётся (табл. 13).

**Таблица 12.** Влияние содержания СКПХ в ФЭ на времена миграции азотсодержащих соединений из капилляра, модифицированного 6,10-ионеном и СКПХ.

Соединение	$t_m$ , мин			
	Содержание СКПХ в ФЭ, %			
	0	0.10	0.15	1.08
Тетрагидрозолин	5.54	3.12	2.80	3.46
Атенолол	6.71	3.52	3.59	3.86
Пиндолол	7.06	3.61	3.53	3.95
Надолол	8.06	3.70	3.69	4.00
Тербуталин	8.27	3.80	3.81	4.01
Гидроксизин	8.98	3.84	3.88	4.27
Маркер ЭОП	10.27	5.39	5.28	5.88

ФЭ: СКПХ в 25 мМ ЦБ (рН 6.5).  $U = 15$  кВ,  $\lambda = 235, 270$  нм

**Таблица 13.** Влияние содержания СКПХ в ФЭ на эффективность капилляра, модифицированного 6,10-ионеном и СКПХ.

Соединение	N, ТТ/м			
	Содержание СКПХ в ФЭ, %			
	0	0.10	0.15	1.08
Тетрагидрозолин	116900	98700	80000	141300
Атенолол	22000	34300	35300	60200
Пиндолол	91300	136300	151600	57800
Надолол	26400	80200	93900	171000
Тербуталин	85600	68700	70300	141200
Гидроксизин	59400	81200	72500	8500

ФЭ: СКПХ в 25 мМ ЦБ (рН 6.5). U = 15 кВ,  $\lambda = 235, 270$  нм

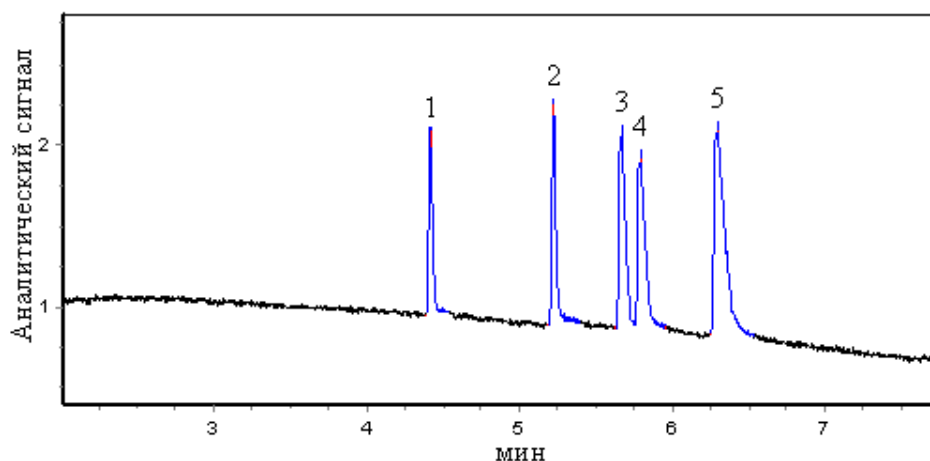
При замене в полислойном покрытии СКПХ на СД времена миграции исследуемых соединений уменьшились. Влияние добавки СД в ФЭ на миграцию веществ показано в табл. 14. Скорость миграции при использовании ФЭ с добавкой СД выше, чем без нее. Но при увеличении содержания СД в ФЭ скорость миграции фармпрепаратов снижается.

**Таблица 14.** Влияние содержания СД в ФЭ на времена миграции азотсодержащих соединений из капилляра, модифицированного 6,10-ионеном и СД.

Соединение	$t_m$ , мин									
	Содержание СД в ФЭ, %									
	0	0.10			1.08			1.5		
Тетрагидрозолин	4.54	2.63	2.70	$R_s$ 1.2	3.01	3.04	$R_s$ 0.5	3.26	3.30	$R_s$ 1.0
Пиндолол	5.22	2.87			3.19			3.34		
Атенолол	5.57	2.93	2.95	$R_s$ 0.8	3.18			3.39		
Тербуталин	5.73	2.95			3.15			3.46		
Надолол	5.80	2.97			3.20			3.49		
Гидроксизин	6.15	3.15			3.56			3.91		
Маркер ЭОП	6.41	3.83			3.67			3.98		

ФЭ: СД в 25 мМ ЦБ (рН 6.5), U = 15 кВ,  $\lambda = 235, 270$  нм

Электрофореграмма смеси 5 азотсодержащих соединений в капилляре с СД показана на рис. 34, параметры разделения приведены в табл. 15. Они свидетельствуют о лучшем разделении смеси по сравнению с капилляром с СКПХ.



**Рис. 34.** Электрофореграмма смеси 1 – тетрагидрозолина, 2 – пиндолола, 3 – тербуталина, 4 – надолола, 5 – гидроксизина в кварцевом капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СД ( $L/L_{эфф} = 38.7/29.3$  см). Условия см. на рис. 33.

**Таблица 15.** Разделение смеси тетрагидрозолина, пиндолола, тербуталина, надолола и гидроксизина в капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СД.

Соединение	$t_m$ , мин	$\alpha$	$R_s$	$N$ , ТТ/м
Тетрагидрозолин	4.32	1.22	7.4	197900
Пиндолол	5.25	1.09	3.2	166900
Тербуталин	5.70	1.02	1.5	115300
Надолол	5.79	1.09	2.1	97300
Гидроксизин	6.30			52300

Поскольку СКПХ и СД обладают хиральными центрами, было интересно оценить возможность разделения энантиомеров изучаемых соединений в капилляре, модифицированном полисахаридами. Получено разделение энантиомеров атенолола и тербуталина в капилляре, модифицированном СКПХ, но разрешение их пиков уменьшалось при повторных вводах раствора.

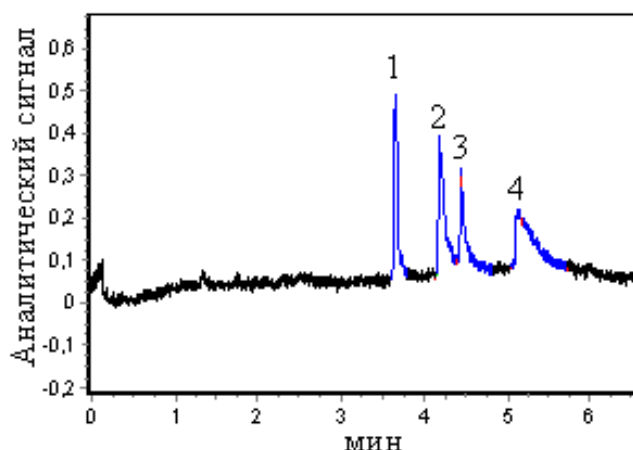
При использовании капилляра, модифицированного 6,10-ионеном и СД, для ФЭ с содержанием СД 1.5 % получено воспроизводимое разделение энантиомеров атенолола, тетрагидрозолина (табл. 14), орфенадрин ( $R_s$  0.7), доксиламина ( $R_s$  0.8) и хлорфенирамина ( $R_s$  0.5).

Капилляр, модифицированный ПЭП 6,10-ионен – СКПХ оставался стабильным в работе в течение 4 недель. В случае покрытия 6,10-ионен – СД время стабильной работы составило 6 недель. Относительное стандартное отклонение времени миграции веществ не превышало 0.05.

При использовании капилляра, модифицированного ионеном и ЛСТ, пики исследованных соединений фиксировали на электрофореграмме перед пиком маркера ЭОП, они мигрировали практически в одно и то же время, и разделить вещества не удалось. Таким образом, в КЭ ЛСТ оказался неэффективным модификатором капилляра для разделения азотсодержащих соединений.

### 6.3. Модифицирование кварцевого капилляра 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и крупными полианионами

Для оценки влияния слоя НЧЗ на полиэлектролитные капиллярные покрытия мы получили капилляры по *Методике 6* для СКПХ и СД, содержащие дополнительный слой НЧЗ. При модифицировании капилляра 6,10-ионеном, НЧЗ и СКПХ, можно наблюдать более высокую прецизионность электрофоретической подвижности маркера ЭОП (0.04), чем в случае аналога без НЧЗ. Электрофоретическая подвижность маркера ЭОП составила  $2.03 \times 10^{-4}$  см<sup>2</sup>/(В×с). Времена миграции изучаемых соединений снизились и уменьшилась селективность разделения по сравнению с капилляром без НЧЗ [249]. Была разделена только четырехкомпонентная смесь за 6 мин с эффективностью капилляра 65600 ТТ/м (рис. 35, табл. 16).



**Рис. 35.** Электрофореграмма смеси 1 – тетрагидрозолина, 2 – пиндолола, 3 – тербуталина, 4 – гидроксизина в кварцевом капилляре, модифицированном 6,10-ионеном, НЧЗ и СКПХ ( $L/L_{эфф}=38.7/29.3$  см). ФЭ – 25 мМ ЦБ (рН 6.5),  $U = 15$  кВ,  $\lambda = 235$  нм.

**Таблица 16.** Разделение тетрагидрозолина, пиндолола, тербуталина и гидроксизина в капилляре, модифицированном 6,10-ионеном, НЧЗ и СКПХ.

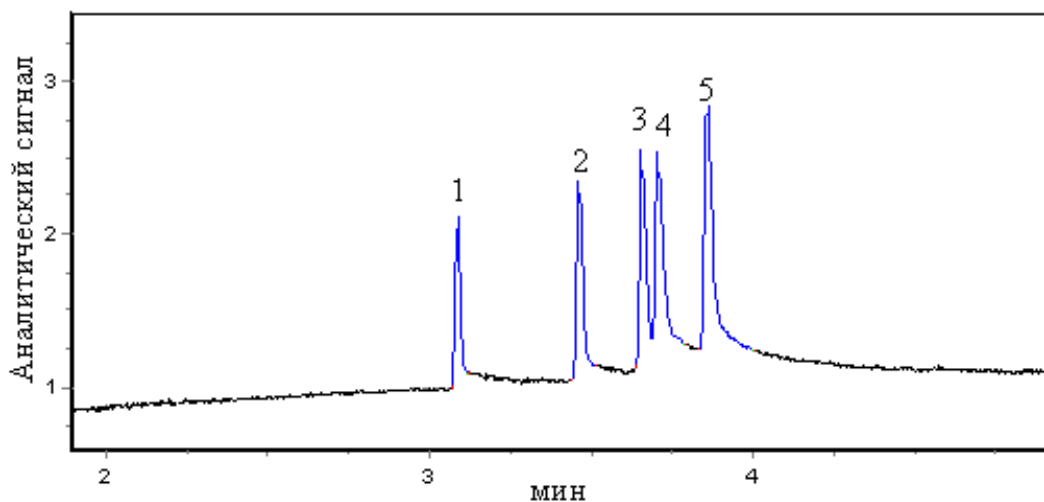
Соединение	$t_m$ , мин	$\alpha$	$R_s$	N, ТТ/м
Тетрагидрозолин	3.65	1.15	2.8	65600
Пиндолол	4.20	1.06	1.1	31800
Тербуталин	4.45	1.16	1.7	48000
Гидроксизин	5.16			

Содержание СКПХ в ФЭ варьировали от 0 до 1.08 %. Какой-либо чёткой зависимости между содержанием СКПХ в ФЭ и временами миграции азотсодержащих оснований, а также эффективностью капилляра выявить не удалось. Для большинства азотсодержащих веществ время миграции минимально при содержании СКПХ 0.1%. Такая же тенденция наблюдается для эффективности капилляра в случае этих соединений (табл. 17). К достоинствам такой системы можно отнести высокую стабильность подвижности маркера ЭОП ( $s_r = 0.04$ ).

**Таблица 17.** Влияние содержания СКПХ в ФЭ на эффективность капилляра, модифицированного 6,10-ионеном, НЧЗ и СКПХ, и миграцию азотсодержащих соединений.

Соединение	$t_m$ , мин		
	Содержание СКПХ в ФЭ, %		
	0	0.10	1.08
Тетрагидрозолин	4.02	3.45	4.66
Атенолол	5.27	4.29	4.81
Пиндолол	4.85	4.76	5.73
Надолол	4.87	4.73	5.06
Тербуталин	5.18	5.05	5.42
Гидроксизин	5.39	6.47	6.88
Соединение	N, ТТ/м		
	Содержание СКПХ в ФЭ, %		
	0	0.10	1.08
Тетрагидрозолин	71500	12200	54000
Атенолол	61700	67400	58300
Пиндолол	45400	43500	49600
Надолол	43900	12500	10700
Тербуталин	44400	47700	69800
Гидроксизин	5100	3000	7000

Аналогичное капиллярное покрытие было получено с СД. При замене СКПХ на СД соединения стали мигрировать быстрее, что было уже вполне предсказуемо. Прецизионность миграции маркера ЭОП на нём также выше, чем в случае аналога без НЧЗ ( $\mu_{ЭОП} = 2.16 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ ,  $s_r = 0.03$ ). Высокая эффективность капилляра позволила получить вполне удовлетворительное разделение пяти соединений (рис. 36, табл. 18.).



**Рис. 36.** Электрофореграмма смеси 1 – тетрагидрозолина, 2 – пиндолола, 3 – тербуталина, 4 – надолола, 5– гидроксизина в кварцевом капилляре, модифицированном 6,10-ионеном, НЧЗ и СД.

**Таблица 18.** Разделение тетрагидрозолина, пиндолола, тербуталина, надолола и гидроксизина в капилляре, модифицированном 6,10-ионеном, НЧЗ и СД.

Соединение	$t_m$ , мин	$\alpha$	$R_s$	N, ТТ/м
Тетрагидрозолин	3.09	1.12	5.9	297200
Пиндолол	3.47	1.05	3.1	198100
Тербуталин	3.66	1.01	1.2	220800
Надолол	3.71	1.05	1.9	140200
Гидроксизин	3.90			132000

Зависимость времён миграции азотсодержащих фармпрепаратов от содержания модификатора СД в диапазоне 0 – 1.08 %. проходила через минимум в точке 0.1 % (табл. 19).

При сравнении электрофоретических характеристик капилляров, модифицированных 6,10-ионеном, НЧЗ и разными анионными полимерами можно сделать вывод, что при равных условиях большее количество соединений с лучшим разрешением пиков на электрофореграммах при максимальной эффективности капилляра за меньшее время удастся разделить в капилляре, модифицированном СД.

Можно также отметить повышение срока эксплуатации капилляров при внесении слоя НЧЗ в стурктуру ПЭП: до 5 недель в случае капилляра с СКПХ и 7 недель для капилляра СД.

**Таблица 19.** Влияние содержания СД в ФЭ на время миграции азотсодержащих фармпрепаратов и эффективность капилляра, модифицированного 6,10-ионеном, НЧЗ и СД.

Соединение	t <sub>м</sub> , мин		
	Содержание СД в ФЭ, %		
	0	0.10	1.08
Тетрагидрозолин	3.32	2.46	2.98
Пиндолол	3.77	2.63	3.02
Атенолол	3.69	2.65	3.09
Тербуталин	3.84	2.66	3.12
Надолол	3.89	2.71	3.18
Гидроксизин	4.03	2.81	3.37
Соединение	N, ГТ/м		
	Содержание СД в ФЭ, %		
	0	0.10	1.08
Тетрагидрозолин	172200	226600	438000
Пиндолол	111400	193800	193600
Атенолол	60900	90100	133500
Тербуталин	39900	54900	39300
Надолол	78200	115000	178300
Гидроксизин	87000	157700	138700

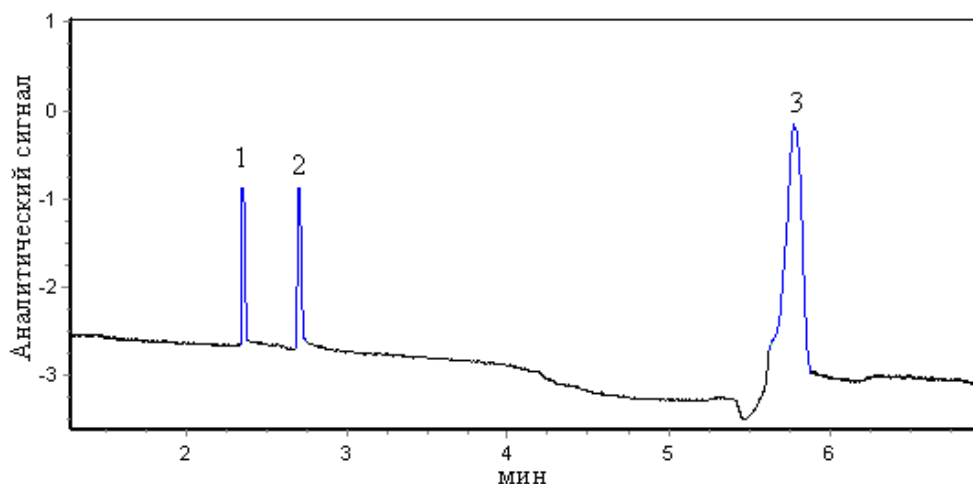
#### **6.4. Определение азотсодержащих фармпрепаратов в биологической жидкости в капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и сульфатом декстрана**

Поскольку СД зарекомендовал себя лучше, чем СКПХ в работе с азотсодержащими соединениями, мы решили оценить возможности такого полиэлектролитного капиллярного покрытия при работе с реальными объектами.

В 21 веке в связи с масштабной урбанизацией некоторые болезни стали очень распространены, а некоторые превратились в норму жизни. Среди них – аллергический ринит. Эта болезнь сильно распространена в мегаполисах. Несмотря на кажущуюся простоту названия, она может очень осложнять повседневную жизнь людей, особенно деловую. В один из распространённых курсов лечения этого заболевания входят препараты из фармакологической группы альфа-адреномиметики в сочетании с Н1-блокаторами и антисептиками. Мы решили попробовать определять тетрагидрозолин, карбиноксамин и фурацилин, которые назначаются при лечении аллергического ринита, в моче пациентов, принимающих данные препараты. Эффективно и воспроизводимо определять эти препараты в биологических жидкостях могло бы быть полезно для контроля состояния пациента.

Тетрагидрозолин, карбиноксамин и фурацилин определяли методом добавок в моче человека по *Методике 14* (биоматериал предоставлен ФГБУ Эндокринологическим научным

центром). Для этого предварительно получали градуировочные зависимости площади пика от концентрации соединения для трёх определяемых азотсодержащих соединений. Использовали водные растворы препаратов в диапазоне 0.5 – 160 мкг/мл. За 6 мин разделили смесь тетрагидрозолина, карбиноксамина и фурацилина (рис. 37, табл. 20) в подобранных электрофоретических условиях – 25 мМ ЦБ (рН 6.5), U = 15 кВ, λ = 235 нм.



**Рис. 37.** Определение 1 – тетрагидрозолина, 2 – карбиноксамина и 3 – фурацилина в моче человека в капилляре, модифицированном 6,10-ионеном и СД ( $L/L_{\text{eff}} = 38.7/29.3$  см). ФЭ – 25 мМ ЦБ (рН 6.5), U = 15 кВ, λ = 235 нм.

Правильность определения компонентов подтверждали методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Shimadzu с матричным детектором методом внешнего стандарта. В качестве НФ использовали сорбент Mightysil C-18, а ПФ – смесь (50/50) ацетонитрил / 0.1 % раствор фосфорной кислоты. Результаты согласуются с данными, полученными методом КЭ (табл. 20).

**Таблица 20.** Определение тетрагидрозолина, карбиноксамина и фурацилина в моче человека методами КЭ и ВЭЖХ (n = 5, P = 0.95).

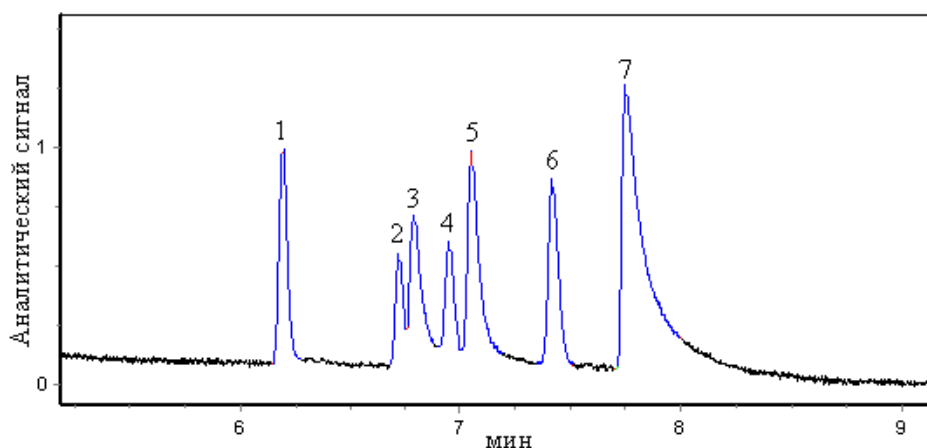
	Содержание, мкг/мл		$C_{\text{min}}$ , мкг/мл	Диапазон линейности, мкг/мл	$S_r$	Градуировочная зависимость	$R^2$
КЭ	Тетрагидрозолин	5.3±0.8	0.7	2–140	0.07	$y = (0.167 \pm 0.004)x$	0.996
	Карбиноксамин	6.6±0.5	0.8	2–140	0.03	$y = (0.256 \pm 0.008)x$	0.997
	Фурацилин	0.9±0.2	0.6	2–140	0.10	$y = (1.7 \pm 0.6)x + (12.5 \pm 0.4)$	0.997
ВЭЖХ	Тетрагидрозолин	4.9±0.7	0.5	2–100	0.08	$y = (20.6 \pm 0.9)x$	0.999
	Карбиноксамин	6.2±0.4	0.5	2–100	0.05	$y = (7.8 \pm 0.2)x$	0.999
	Фурацилин	0.6±0.1	0.5	2–100	0.08	$y = (28.5 \pm 0.6)x + (1.9 \pm 0.3)$	0.999



## 6.5. Влияние количества модифицирующих слоёв на электрофоретические характеристики полиэлектролитной системы

Данное исследование проводили на примере капилляра, модифицированного 6,10-ионеном и СД. Для многослойного модифицирования использовали *Методику 5*, повторяя её несколько раз в зависимости от количества модифицирующих капилляр слоёв.

Установлено, что двукратное нанесение на кварцевый капилляр 6,10-ионена и СД приводит к увеличению электрофоретической подвижности азотсодержащих соединений, а также эффективности капилляра по сравнению с его аналогом, модифицированным этими же соединениями один раз. Важным достоинством является и повышение срока стабильной работы у капилляра с большим количеством модифицирующих слоёв (до 8 недель). Смесь из 7 соединений удалось разделить за 8 мин с эффективностью до 225000 ТТ/м (рис. 38, табл. 21).

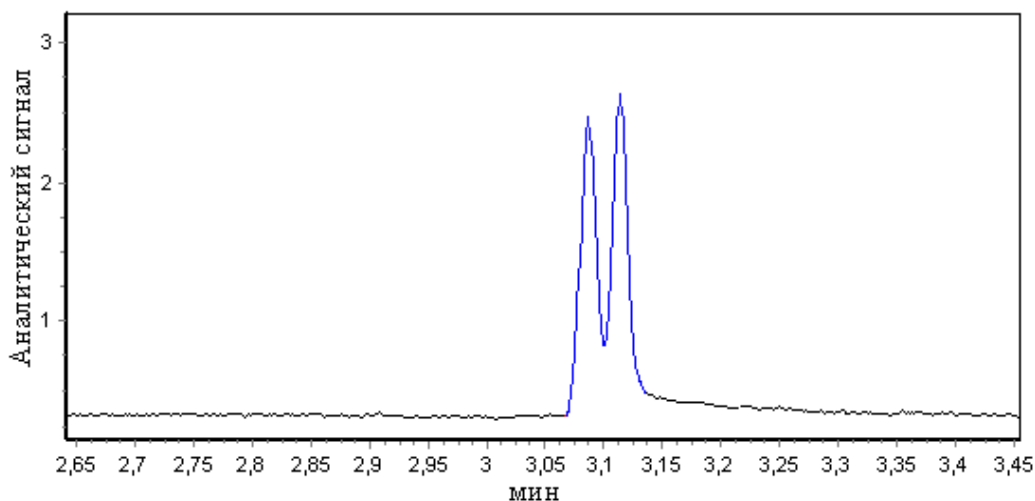


**Рис. 38.** Электрофореграмма смеси 1 – тетрагидрозолина, 2 – пиндолола, 3 – доксиламина, 4 – хлорфенирамина, 5 – орфенадрина, 6 – надолола и 7 – гидроксизина в капилляре, двукратно модифицированном 6,10-ионеном и СД. ФЭ – 25 мМ ЦБ (рН 6.5),  $U = 8$  кВ,  $\lambda = 235$ нм.

**Таблица 21.** Разделение смеси тетрагидрозолина, пиндолола, доксиламина, хлорфенирамина, орфенадрина, надолола и гидроксизина в капилляре, двукратно модифицированном 6,10-ионеном и СД.

Соединение	$t_m$ , мин	$\alpha$	$R_s$	$N$ , ТТ/м
Тетрагидрозолин	6.19	1.09	5.1	144600
Пиндолол	6.72	1.01	0.7	225200
Доксиламин	6.82	1.02	1.4	147000
Хлорфенирамин	6.95	1.02	0.7	142400
Орфенадрин	7.06	1.05	2.1	118000
Надолол	7.42	1.04	1.4	130600
Гидроксизин	7.75			52000

Система с полислойным капилляром в большинстве случаев позволяет с более высоким разрешением разделить энантиомеры большого 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). В ФЭ с содержанием СД 1.5 % разделены энантиомеры хлорфенирамина ( $R_s$  0.9), чего в случае единичного модифицирования не удавалось. При дальнейшем увеличении числа слоёв эффективность капилляра снижается и разрешение пиков ухудшается.



**Рис. 39.** Разделение энантиомеров тетрагидрозолина в капилляре, двукратно модифицированном 6,10-ионеном и СД. ФЭ: 1.08 % СД в 25 мМ ЦБ (pH 6.5).  $U = 15$  кВ,  $\lambda = 235$  нм.

### **6.6. Сравнение разделения азотсодержащих соединений в немодифицированном кварцевом капилляре и капиллярах, модифицированных 6,10-ионеном и анионными полисахаридами**

Чтобы оценить достоинства модифицированных капилляров при разделении азотсодержащих соединений, провели разделение азотсодержащих препаратов в тех же электрофоретических условиях в обычном кварцевом капилляре без нанесения полиэлектролитов. В качестве маркера ЭОП выступала вода. Соединения мигрировали в следующем порядке: тетрагидрозолин, пиндолол, атенолол, тербуталин, надолол, гидроксизин. Пики на электрофореграмме, соответствующие этим соединениям, идентифицировались до пика маркера ЭОП. Это согласуется с отрицательным зарядом поверхности кварцевого капилляра и положительным зарядом ЭОП.

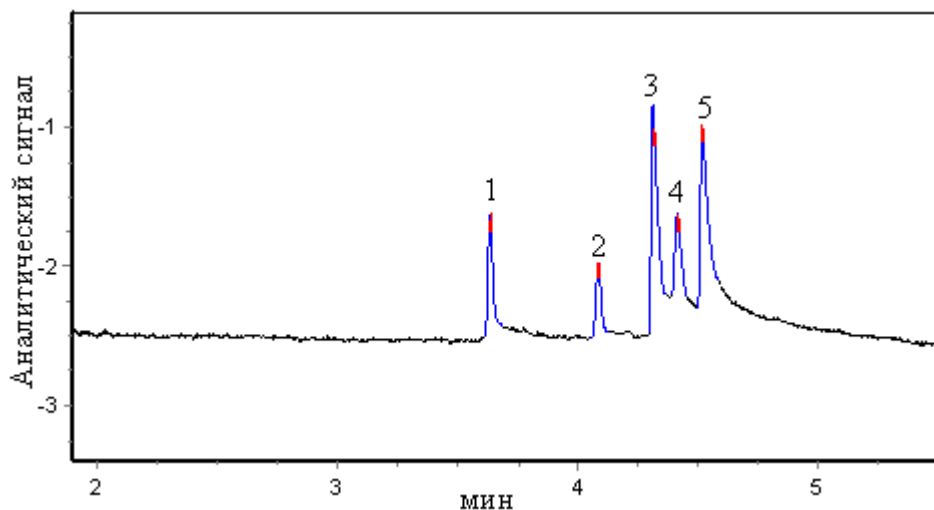
Подвижность веществ была достаточно высокой (до  $7.02 \times 10^{-4}$  см<sup>2</sup>/(В×с)), что позволяло их разделить менее, чем за 5 мин, но капилляр оказался крайне нестабильным в работе. Стандартное отклонение электрофоретической подвижности маркера ЭОП составило 0.82 при

средней её величине  $2.11 \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \times \text{с})$ . Для азотсодержащих веществ – 0.57. Нестабильность работы кварцевого капилляра в данном случае хорошо отображена в табл. 22 на примере времён миграции азотсодержащих соединений и эффективности капилляра. За три дня работы эффективность капилляра для большинства соединений снизилась на 30 и более %.

**Таблица 22.** Изменение электрофоретических свойств кварцевого капилляра с течением времени. ФЭ: 25 mM ЦБ (pH 6.5). U = 15 кВ,  $\lambda = 235$  и 270 нм.

Соединение	День работы					
	1		2		3	
	$t_m$ , мин	N, ТТ/м	$t_m$ , мин	N, ТТ/м	$t_m$ , мин	N, ТТ/м
Тетрагидрозолин	2.8	132800	3.1	131000	3.6	123500
Пиндолол	3.3	216800	3.5	188500	4.2	161300
Атенолол	3.3	62000	3.5	51400	4.3	39400
Тербуталин	3.3	33300	3.8	33000	4.5	31700
Надолол	3.5	72000	3.8	62700	4.5	53700
Гидроксизин	3.6	131800	3.9	73400	4.7	42400
Маркер ЭОП	5.0		6.2		7.4	

Разделить все соединения в какой-либо смеси из них до базовой линии не представлялось возможным. Через несколько дней работы, когда ЭОП значительно ослаб, нам удалось получить следующее разделение тетрагидрозолина, пиндолола, тербуталина, надолола и гидроксизина в кварцевом капилляре (рис. 40).



**Рис. 40.** Разделение 1 – тетрагидрозолина, 2 – пиндолола, 3 – надолола, 4 – тербуталина, 5 – гидроксизина в кварцевом капилляре ( $L/L_{\text{эфф}} = 38.7/29.3$  см) методом КЭ. ФЭ – 25 mM ЦБ (pH 6.5), U = 15 кВ,  $\lambda = 235$  нм, гидродинамический ввод пробы за 30 с давлением 10 мбар.

Если сравнить электрофоретические параметры полиэлектролитных систем с 6,10-ионеном и полианионом, можно заключить следующее. Система с ЛСТ в рамках нашего предварительного исследования не зарекомендовала себя положительно в КЭ при разделении азотсодержащих оснований. Более интересными оказались капиллярные покрытия с СД и СКПХ. Селективность капилляров с ними отличается незначительно, однако в капилляре с СД удалось добиться лучшего разрешения пиков. Сам капилляр обладает большей эффективностью, если использовать в качестве модифицирующего полианиона СД.

В обеих системах проявляется усиление аналитического сигнала по сравнению с кварцевым капилляром. Это означает, что наши полиэлектролитные покрытия позволяют снизить предел обнаружения азотсодержащих соединений (табл. 23).

**Таблица 23.** Сопоставление обычного кварцевого капилляра с капиллярами, модифицированными ПЭП. ФЭ – 25 мМ ЦБ (рН 6.5), U = 15 кВ,  $\lambda = 235$  и  $270$  нм.

Капилляр	Соединение	$t_M$ , мин	N, ТТ/м	$c_{min}$ (3S)	$\alpha$
<b>Кварцевый капилляр</b>	Тетрагидрозолин	3.08	131000	1.1	1.12
	Пиндолол	3.46	188500	3.3	1.07
	Атенолол	3.70	51400	8.1	1.01
	Тербуталин	3.76	33400	3.2	1.02
	Надолол	3.83	62700	5.1	1.02
	Гидроксизин	3.90	73400	1.5	
<b>Кварцевый капилляр, модифицированный 6,10-ионеном и N-(3-сульфо, 3-карбоксо)-пропионилхитозаном</b>	Тетрагидрозолин	5.82	116900	1.3	1.24
	Атенолол	7.21	22000	7.7	1.02
	Пиндолол	7.33	91300	2.1	1.14
	Надолол	8.38	26500	5.4	1.03
	Тербуталин	8.61	85600	5.4	1.14
	Гидроксизин	9.28	59400	3.3	
<b>Кварцевый капилляр, модифицированный 6,10-ионеном и сульфатом декстрана</b>	Тетрагидрозолин	4.60	200000	0.7	1.14
	Пиндолол	5.23	166900	1.5	1.07
	Атенолол	5.57	36800	7.4	1.03
	Тербуталин	5.72	115300	3.0	1.02
	Надолол	5.83	97300	4.7	1.05
	Гидроксизин	6.15	52300	1.7	

Таким образом, целесообразность нанесения полиэлектролитных слоёв на кварцевый капилляр очевидна. Данная процедура позволяет повысить селективность разделения азотсодержащих соединений в смеси и разрешение пиков на электрофореграмме по сравнению с

немодифицированным капилляром. Помимо этого, потенциально данные соединения можно определять в полученных системах с более низким пределом обнаружения.

На отрицательно заряженных стенках кварцевого капилляра явно происходит сильная адсорбция изучаемых соединений. В то время как в капилляре, модифицированном крупным поликатионом 6,10-ионеном и затем крупным полианионом, этот процесс происходит в гораздо меньшей степени [250].

Модифицированные капилляры имеют преимущества в стабильности работы (до 8 недель) и прецизионности результатов (стандартное отклонение времён миграции фармпрепаратов 0.02 – 0.05) по сравнению с кварцевым капилляром ( $s_f(t_m)$  до 0.2). В случае покрытий с НЧЗ, предпочтительнее нам кажется выбор СД в качестве анионного полимера. Такой модифицирующий слой повышает эффективность капилляра и позволяет проводить разделение за меньшее время. В капилляре, модифицированном СД без НЧЗ, можно воспроизводимо разделять энантиомеры азотсодержащих лекарственных препаратов с хорошим разрешением и за более чем приемлемое время.

Таким образом, полученные ПЭП на основе полисахарида СД видятся нам перспективными для создания аналогичных сорбентов для ВЭЖХ. Для хроматографических исследований мы решили расширить круг изучаемых соединений. Также было интересно попробовать получить сорбенты на основе ЛСТ и попытаться найти класс соединений, которые можно было бы разделять и определять на таких сорбентах.

## **Глава 7. Хроматографическое исследование полиэлектролитных систем**

На основании полученных данных методом КЭ для хроматографических исследований были выбраны полиэлектролитные системы, где в роли поликатиона выступал 6,10-ионен, в роли полианионов – СД и ЛСТ. Полианионы принципиально отличаются друг от друга ионогенными группами, молекулярной массой. Кроме того, СД относится к классу полисахаридов, а ЛСТ – нет.

Сорбент -1, представляющий собой, силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, был получен по *Методике 7*. Синтез такого сорбента – первая стадия модифицирования поверхности в синтезе всех последующих полиэлектролитных сорбентов, предложенных в данной работе.

По *Методике 9* был получен Сорбент-2 – силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и ЛСТ. Для оценки влияния природы используемого в синтезе поликатиона на хроматографические свойства подобной полиэлектролитной системы по *Методике 10* был получен такой же сорбент с хитозаном вместо 6,10-ионена в качестве поликатиона – Сорбент-3.

Для изучения методом ВЭЖХ полиэлектролитных систем на основе СД получены следующие сорбенты:

- Сорбент-4 – силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и СД (*Методика 11*)
- Сорбент-5 – силикагель, двукратно модифицированный 6,10-ионеном и СД (*Методика 12*)
- Сорбент-6 – силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, НЧЗ и СД (*Методика 13*)

Поверхности новых стационарных фаз могут обладать как гидрофобными свойствами (за счёт наличия гидрофобных анионов и катионов на поверхности) так и гидрофильными (за счёт наличия сульфо-групп у СД).

По данным потенциометрического титрования можно было сказать о практически полном отсутствии ионообменных свойств у сорбентов с СД, особенно в случае многослойных ПЭП. Из всех сорбентов с СД только у Сорбента-4, где полиэлектролитные покрытия содержат всего 2 слоя модификаторов, они слабо выражены. Куда более сильно ионообменные свойства характерны для аналогичного Сорбента-2 с ЛСТ. Предварительно оценили возможность электростатических взаимодействий сорбат-сорбент для наших стационарных фаз.

### 7.1. Исследование ионообменных свойств стационарных фаз

Для оценки способности наших сорбентов к ионному обмену, изучали удерживание неорганических анионов (хлорид, нитрат и сульфат) и катионов (натрий, калий, кальций) на Сорбенте-2 и Сорбентах 4–6, на Сорбенте-3 они не удерживались. Для элюирования анионов использовали гидрофталатный буферный раствор (ГФБ) с рН 4.3 в диапазоне концентраций 1.5 – 9.0 мМ. Для всех сорбентов удерживание анионов ослаблялось с ростом концентрации буферного раствора (табл. 24). Мы наблюдали стандартный порядок элюирования анионов.

**Таблица 24.** Хроматографическое поведение неорганических анионов на синтезированных сорбентах с ЛСТ (2) и СД (4 – 6). ПФ: ГФБ (рН 4.3).

с, мМ	k'											
	Сорбент-2			Сорбент-4			Сорбент-5			Сорбент-6		
	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
1.5	11.78	19.13	–	2.14	2.50	10.06	1.20	1.68	6.82	1.76	2.11	8.13
5.0	4.05	6.08	27.48	0.74	0.93	3.51	0.43	0.70	2.07	1.01	1.24	4.48
7.5	2.32	4.86	16.09	0.46	0.61	2.30	0.31	0.56	1.07	0.74	0.95	3.21
9.0	0.60	2.87	5.84	0.31	0.40	1.79	–	–	–	0.52	0.76	2.60

Уравнения зависимости логарифма фактора удерживания от логарифма концентрации ГФБ приведены в табл. 25, они линейны. Примечательно, что для всех сорбентов наблюдается отклонение величин тангенса угла наклона прямой от теоретических значений для однозарядных хлорида и нитрата (-1) и двузарядного сульфата (-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.

**Таблица 25.** Уравнения, описывающие зависимость  $\log k' - \log c(\text{электролита})$ , для полученных сорбентов.

№ Сорбента	Зависимость $\log k' - \log c(\text{электролита})$					
	Анион					
	Cl <sup>-</sup>	R <sup>2</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	R <sup>2</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	R <sup>2</sup>
2	$y = -0.67x + 0.43$	0.994	$y = -0.66x + 0.61$	0.999	$y = -1.08x + 1.17$	0.998
4	$y = -0.94x + 0.50$	0.996	$y = -0.87x + 0.56$	0.997	$y = -0.91x + 1.17$	0.998
5	$y = -0.85x + 0.23$	0.999	$y = -0.70x + 0.34$	0.997	$y = -0.89x + 0.98$	0.986
6	$y = -0.78x + 0.56$	0.999	$y = -0.73x + 0.61$	0.998	$y = -0.85x + 1.25$	0.999

Таким образом, можно говорить о наличии анионообменных свойств у наших сорбентов. Вероятно, способность к анионному обмену связана с существованием остаточных положительно заряженных центров б,10-ионена на поверхности сорбентов.

Разделение высокополярных соединений довольно сложно осуществить как в обращенно-фазовом, так и нормально-фазовом вариантах ВЭЖХ. Известно, что силикагели, модифицированные полимерными молекулами, позволяют решить эту проблему более успешно, чем традиционные сорбенты для ВЭЖХ. Поэтому синтез таких сорбентов, изучение их свойств и закономерностей удерживания полярных соединений на них – основные цели данной работы.

В связи с неоднозначной смешанной природой полученных стационарных фаз круг изучаемых соединений был расширен до двух принципиально разных классов – основные азотсодержащие соединения (фармакологически активные) и ФКК.

Поскольку при использовании ЛСТ в КЭ разделить азотсодержащие соединения не удалось, его исследовали в ВЭЖХ на примере только ФКК (рис. 41). С данным модификатором был получен силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и ЛСТ (без НЧЗ).

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

Для изучения хроматографического поведения кислот на сорбентах с ЛСТ в качестве ПФ использовали смесь ацетонитрил – раствор электролита с различным содержанием ацетонитрила и электролитов. Исследовали влияние рН и концентрации раствора электролита в ПФ, содержания органического модификатора в ПФ на факторы удерживания и селективность разделения ФКК. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при длинах волн 276, 254, 235 и 220 нм. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и ЛСТ – сорбент (Сорбент-2) – впервые предложен в нашей лаборатории.

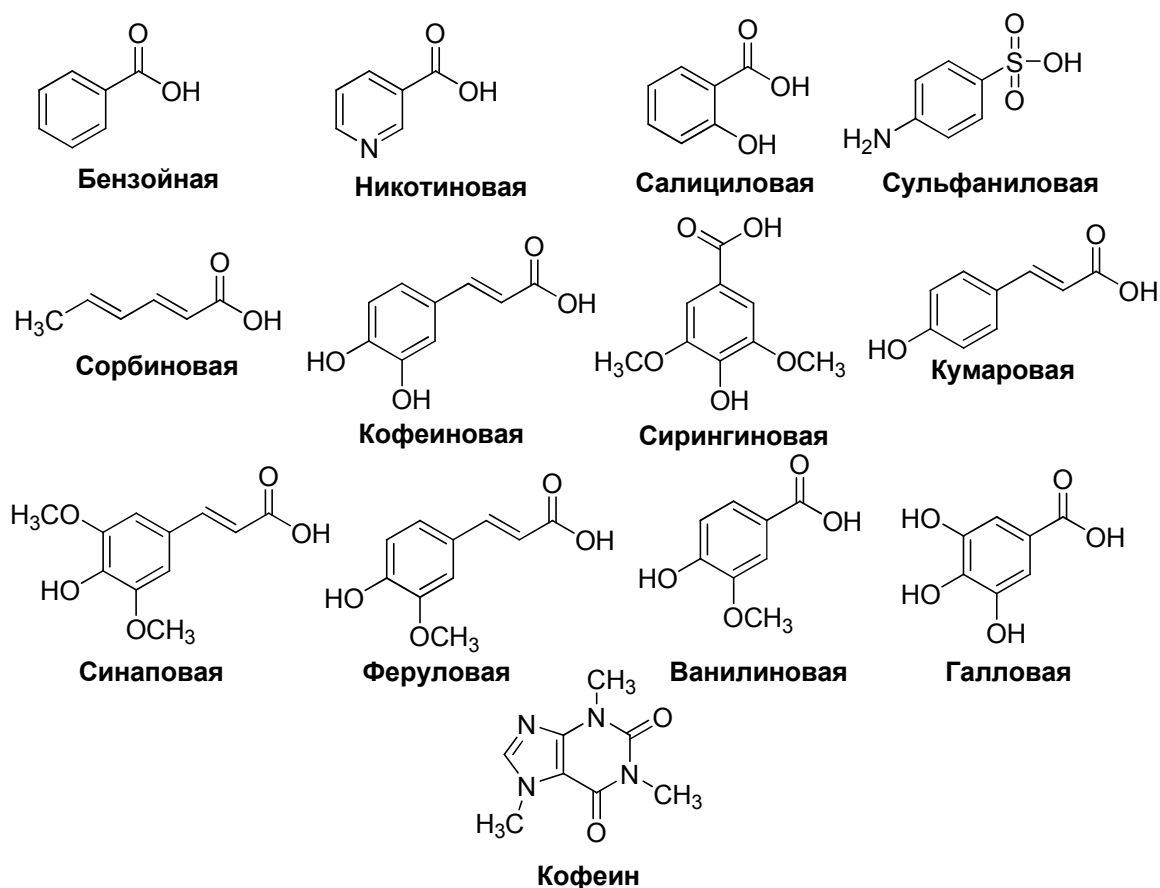


Рис. 41. Структурные формулы исследуемых фенолкарбоновых кислот и кофеина.

Предварительно изучили разделение соединений на Сорбенте-1, где силикагель покрыт только слоем 6,10-ионена. Это исследование провели на примере 6 сорбатов: кофеина,



никотиновой, галловой, сорбиновой, бензойной и салициловой кислот. Вещества элюировали смесью ацетонитрил / 5 мМ перхлорат натрия (10:90).

С поверхности Сорбента-1 изучаемые соединения элюируются в следующем порядке: кофеин, никотиновая, галловая, сорбиновая, бензойная, салициловая кислоты. Наименьший фактор удерживания получен для кофеина, который присутствует только в молекулярной форме, что подтверждает существенный вклад ионообменных взаимодействий сорбат-сорбент в механизм удерживания сорбатов.

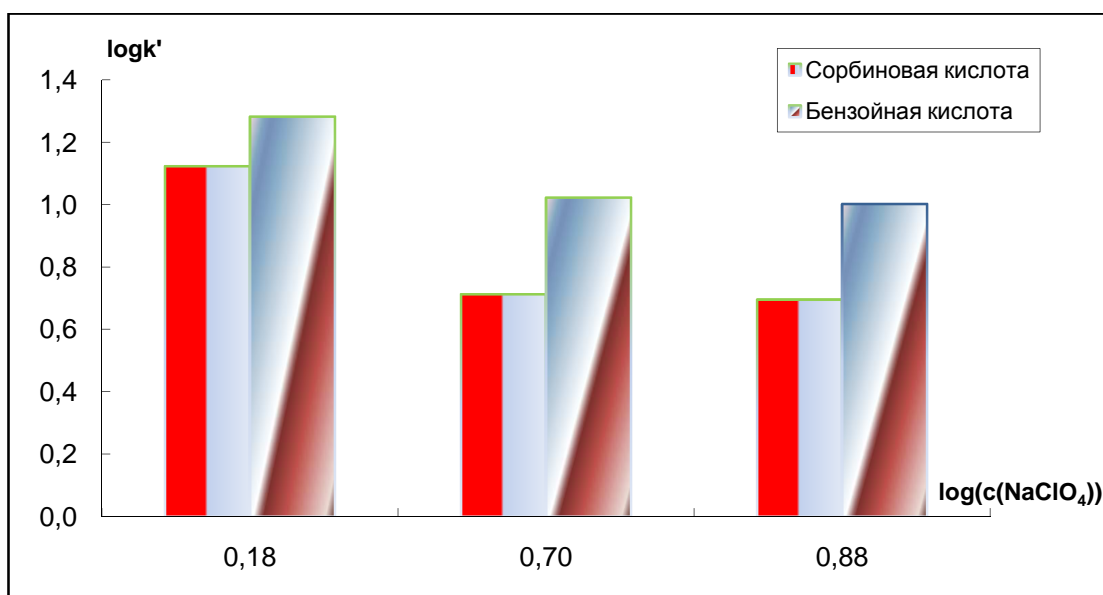
Влияние рН на фактор удерживания изученных соединений на Сорбенте-1 различно (табл. 26). Величины  $pK_a$  исследуемых кислот в водных растворах лежат в диапазоне 4.18 – 4.77 (кроме салициловой – 2.70), в присутствии ацетонитрила они будут увеличиваться из-за уменьшения степени диссоциации кислот при добавлении органического растворителя. При рН 4.20 доля нейтральной формы в растворах кислот достаточно высока. С ростом рН водного компонента ПФ кислоты переходят в анионную форму. Кофеин не заряжен ( $pK_a = 14$ ), его удерживание практически не зависит от рН. Для бензойной и салициловой кислот повышение рН от 4.20 до 6.80 приводит к значительному ослаблению удерживания, а для сорбиновой, никотиновой и галловой кислот – к усилению удерживания. Селективность разделения немного снижается с ростом рН водного компонента ПФ, а эффективность колонки резко возрастает (например, для галловой кислоты при рН 4.20  $N = 1000$  ТТ/м, а при рН 6.80 – 33000 ТТ/м, для сорбиновой – 23000 и 32000 ТТ/м соответственно).

**Таблица 26.** Влияние рН раствора электролита на удерживание и селективность разделения кислот и кофеина на Сорбенте-1. ПФ: ацетонитрил / 5.0 мМ NaClO<sub>4</sub> (10:90).

рН	Никотиновая кислота	Галловая кислота	Сорбиновая кислота	Бензойная кислота	Салициловая кислота
<b>к', мин</b>					
<b>4.20</b>	2.39	4.46	5.78	11.27	38.03
<b>6.80</b>	7.03	8.91	6.91	9.15	23.51
<b><math>\alpha^*</math></b>					
<b>4.20</b>		1.87	1.30	1.95	3.37
<b>6.80</b>		1.02	1.27	1.03	2.57

\*Коэффициент селективности рассчитывали для соседних n- и (n+1)-пиков.

При изучении влияния содержания электролита в ПФ на разделение ФКК и кофеина, в качестве неорганического компонента ПФ выбрали перхлорат натрия, обладающий средней элюирующей силой, что показано предварительно. Мы работали в диапазоне концентраций 1.5 – 15 мМ при содержании ацетонитрила в ПФ 10 %. Установлено, что с увеличением содержания перхлората натрия в ПФ снижаются времена удерживания кислот, повышается эффективность колонки (рис. 42). Зависимость между фактором удерживания аналита и концентрацией электролита в логарифмических координатах не является линейной, что не соответствует закономерностям ионообменной хроматографии. Следовательно, в удерживание сорбатов помимо ионообменных взаимодействий вносят вклад и другие (например, адсорбционные за счет образования водородных связей).

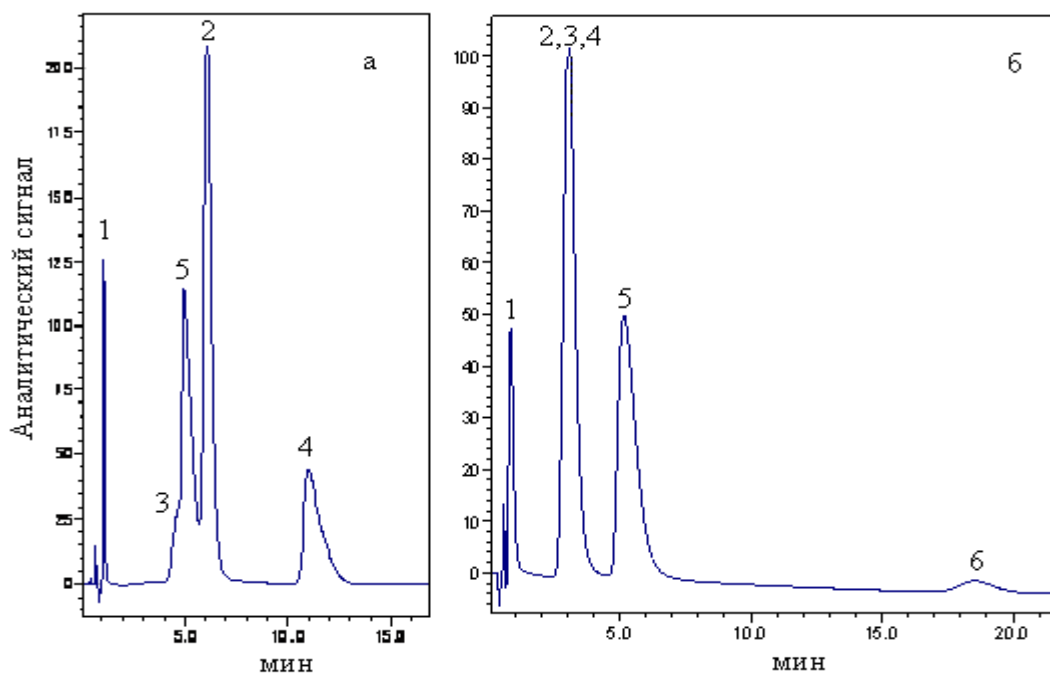


**Рис. 42.** Влияние концентрации электролита в ПФ на удерживание сорбиновой и бензойной кислот на Сорбенте-1.

Для колонки, заполненной Сорбентом-2, характерны меньшие времена удерживания, но большие факторы удерживания, чем для колонки, заполненной Сорбентом-1 из-за меньшего мёртвого объёма. На Сорбенте-2 наблюдали другой порядок элюирования изучаемых соединений: кофеин, сорбиновая, никотиновая, бензойная, галловая, салициловая кислоты. Эффективность колонки уменьшилась по сравнению с Сорбентом-1. Разделение смеси кофеина, сорбиновой, никотиновой, бензойной, галловой и салициловой кислот на двух сорбентах показано на рис. 43, в табл. 27 приведены их хроматографические параметры. Полученные данные свидетельствуют об изменении характера взаимодействий между сорбатами и стационарной фазой после образования на поверхности силикагеля ПЭЖ “ионен – ЛСТ”. Например, меньшее удерживание сорбиновой кислоты на Сорбенте-2 по сравнению с кислотами, содержащими

ароматическое кольцо, может быть связано с  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействиями ФКК с ароматическими фрагментами в структуре ЛСТ.

Гидрофильные свойства ЛСТ определяются сильноокислотными сульфо-группами, гидрофобные – фенилпропановыми структурными единицами. Более того, известно, что молекулы ЛСТ принимают не глобулярную, а линейную форму [251]. Это позволяет считать большой процент от общего числа положительно заряженных центров на атомах азота 6,10-ионена закрытым от взаимодействия с сорбатами. Можно предположить, что вклад ионообменных взаимодействий в механизм удерживания на Сорбенте-2 уменьшается по сравнению с Сорбентом-1, а вклад адсорбционных и гидрофильных растёт.



**Рис. 43.** Хроматограмма смеси 1 – кофеина, 2 – сорбиновой, 3 – никотиновой, 4 – бензойной, 5 – галловой, 6 – салициловой кислот на Сорбенте-1 (а) и Сорбенте-2 (б). Условия в табл. 27.

**Таблица 27.** Разделение смеси веществ на двух сорбентах (55 мм×4.6 мм). ПФ: (10:90) ацетонитрил / 5 мМ NaClO<sub>4</sub> (рН 4.20).  $\lambda = 276$  нм, F = 1.0 мл/мин.

Соединение	Сорбент-1				Сорбент-2			
	$t_R$	$k'$	$\alpha$	N, ТТ/м	$t_R$	$k'$	$\alpha$	N, ТТ/м
Кофеин	1.11	0.23		19000	0.80	1.12		3000
Сорбиновая кислота	6.10	5.78	4.42	23000	3.31	7.14	6.38	5000
Бензойная кислота	11.04	11.27	1.24	16000	3.83	8.68	1.22	15000
Галловая кислота	4.91	4.46	1.81	10000	5.21	11.91	1.36	5000
Салициловая кислота	35.13	38.03	3.18		18.30	44.92	3.51	19000

Для более полного изучения свойств Сорбента-2 расширили круг исследуемых ФКК. В список добавили ванилиновую, сиригиновую, феруловую, синаповую, *n*-кумаровую и кофеиновую кислоты.

Для данного сорбента характерен следующий порядок элюирования этих соединений: кофеин, сорбиновая, никотиновая, бензойная, ванилиновая, сиригиновая, галловая, салициловая, феруловая, синаповая, *n*-кумаровая, кофеиновая кислоты.

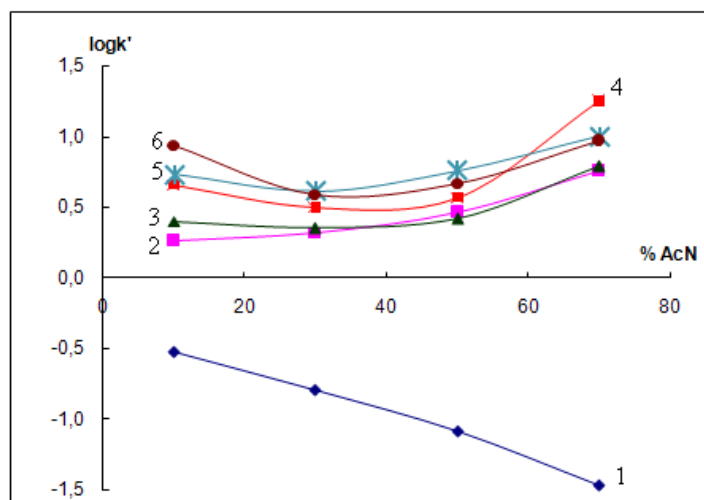
Результаты исследования влияния рН раствора перхлората натрия на хроматографические параметры Сорбента-2 показаны в табл. 28. В отличие от Сорбента-1 здесь с ростом рН наблюдали снижение времён удерживания всех сорбатов. Удерживание кофеина, который присутствует лишь в незаряженной форме, не изменяется. По мере роста величины рН немного снижалась селективность разделения веществ и возрастала эффективность колонки. Наиболее приемлемые времена удерживания при хорошей селективности и эффективности получены при рН 6.80. В этих условиях проводили дальнейшие исследования.

**Таблица 28.** Влияние рН электролита на удерживание и селективность разделения кислот в колонке (150 мм×4.6 мм), заполненной Сорбентом-2. ПФ: ацетонитрил / 5.0 мМ NaClO<sub>4</sub> (10:90).

Кислота	Сорбиновая	Бензойная	Галловая	Салициловая
<b>рН</b>	<b>к'</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

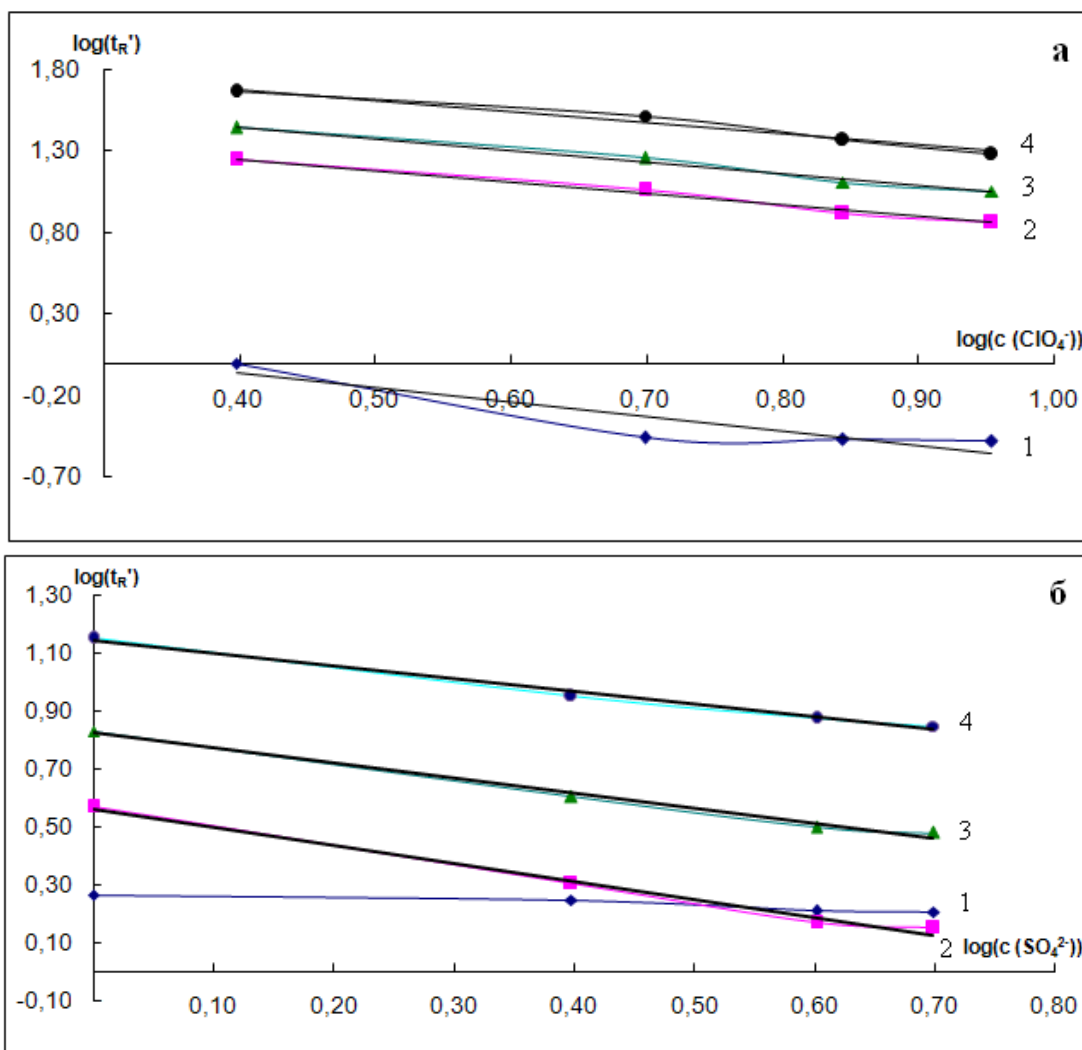
На примере кофеина, сорбиновой, бензойной, ванилиновой, галловой и феруловой кислот установлено, что с ростом содержания в ПФ органического модификатора (ацетонитрила) от 10 до 70 % величины времени удерживания кофеина уменьшаются, а для остальных соединений вначале уменьшаются, а затем растут при содержании ацетонитрила больше 40 – 50% (рис. 44). Такое изменение удерживания полярных соединений характерно для гидрофильных сорбентов. Изменение содержания органического растворителя существенно влияет на размывание хроматографического пика, а, следовательно, на эффективность колонки. 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.

Такая же тенденция наблюдается для эффективности колонки. Содержание 70% было выбрано для разделения кислот на данной НФ.



**Рис. 44.** Влияние содержания ацетонитрила в ПФ на удерживание изучаемых соединений на Сорбенте-2. 1 – кофеин, 2 – сорбиновая, 3 – бензойная, 4 – галловая, 5 – феруловая, 6 – ванилиновая кислоты.

На примере кофеина, сорбиновой, ванилиновой и галловой кислот изучали зависимость их удерживания от концентрации электролита в ПФ, в качестве элюирующих анионов использовали перхлорат и сульфат-ионы (рис. 45). Концентрацию перхлората натрия варьировали в диапазоне 2.5 – 9.0 мМ при рН 6.80. Концентрацию сульфата натрия варьировали в интервале 1.0 – 5.0 мМ. Содержание ацетонитрила в ПФ в обоих случаях составляло 70%. Времена удерживания кислот заметно снижались при переходе от перхлората натрия к сульфату натрия, а селективность разделения резко уменьшалась. Зависимость времени удерживания от концентрации элюирующего иона в логарифмических координатах для сорбиновой, ванилиновой и галловой кислот описывается линейной зависимостью с хорошими коэффициентами корреляции. Полученные уравнения приведены в табл. 29. Ввиду большего заряда, сульфат-ион обладает большей элюирующей силой. Видно, что при элюировании перхлорат-ионотангенс угла наклоны зависимостей для всех 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. Таким образом, удерживание органических кислот на Сорбенте-2 нельзя описать лишь ионообменными взаимодействиями сорбат-сорбент, хотя их вклад в механизм удерживания значителен. Способность к анионообменным свойствам, вероятно, связана с тем, что при двуслойном модифицировании силикагеля, не удаётся закрыть все положительно заряженные центры 6,10-ионена на поверхности Сорбента-2.



**Рис. 45.** Влияние содержания электролита а) перхлората натрия и б) сульфата натрия на удерживание соединений на Сорбенте-2. Соединения: 1 – кофеин, 2 – сорбиновая кислота, 3 – ванилиновая кислота, 4 – галловая кислота.

**Таблица 29.** Корреляционные уравнения  $\log t_R'$  –  $\log c(\text{электролит})$  для сорбиновой, ванилиновой и галловой кислот.

Кислота	Уравнение		$R^2$	
	перхлорат	сульфат	перхлорат	сульфат
Сорбиновая кислота	$-0.7x+1.5$	$-0.6x+0.6$	0.99	0.99
Ванилиновая кислота	$-0.7x+1.7$	$-0.5x+0.8$	0.99	0.99
Галловая кислота	$-0.7x+2.0$	$-0.4x+1.1$	0.97	0.99

Влияние природы катиона в составе ПЭК на поверхности силикагеля изучали на примере силикагеля, модифицированного хитозаном и ЛСТ (Сорбент-3). В качестве

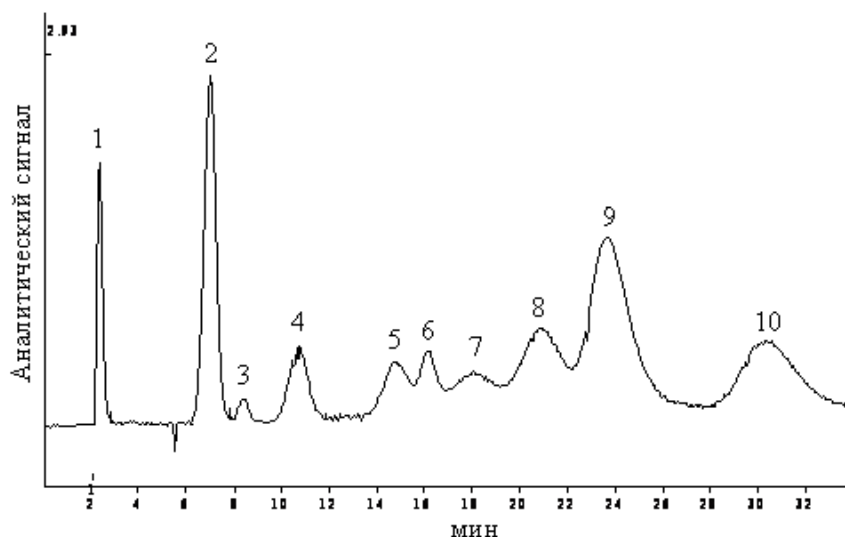
изучаемых соединений выступали кофеин, сорбиновая, бензойная, галловая, салициловая и феруловая кислоты.

Порядок элюирования ФКК и кофеина не изменился при замене поликатиона 6,10-ионена на хитозан, но их удерживание заметно ослабло. Эффективность колонки при использовании хитозана в качестве поликатиона меньше, чем при нанесении на силикагель 6,10-ионена (табл. 30). Таким образом, Сорбент-2 более перспективен для разделения ФКК, чем Сорбент-3.

**Таблица 30.** Хроматографические параметры разделения соединений на Сорбенте-2 и Сорбенте-3. ПФ – АсN / 5 мМ NaClO<sub>4</sub> (рН 6.80) (10:90).  $\lambda = 254, 276$  нм, F = 1 мл/мин.

Соединение	Сорбент-2			Сорбент-3		
	k'	$\alpha$	N, ГТ/м	k'	$\alpha$	N, ГТ/м
Кофеин	0.74	8.16	3000	0	–	2000
Сорбиновая кислота	6.04	1.34	4000	4.86	1.20	3000
Бензойная кислота	8.12	1.72	6000	5.84	1.00	3000
Ванилиновая кислота	13.96	2.31	7000	5.86	2.10	4000
Феруловая кислота	32.30		5000	12.29		3000

Пример наилучшего разделения, которого удалось добиться на силикагеле, модифицированном 6,10-ионеном и ЛСТ, приведён на рис. 46. За 33 мин разделена смесь 10 соединений при элюировании ПФ ацетонитрил / 5 мМ NaClO<sub>4</sub> (рН 6.80) (70:30). Детектировали при  $\lambda = 276$  нм, скорость подачи ПФ – 1 мл/мин. Параметры разделения представлены в табл. 31.



**Рис. 46.** Разделение 1 – кофеина и 2 – сорбиновой, 3 – бензойной, 4 – ванилиновой, 5 – галловой, 6 – салициловой, 7 – синаповой, 8 – феруловой, 9 – *n*-кумаровой, 10 – кофеиновой кислот на колонке, заполненной Сорбентом 2. Концентрации соединений 50 мкг/мл. Условия в тексте.

**Таблица 31.** Хроматографические параметры разделения смеси на колонке, заполненной Сорбентом 2. Условия в тексте.

Соединение	$t_R$ , мин	$\alpha$	$k'$	$R_s$	N, ТТ/м
Кофеин	2.32		0.16		3000
Сорбиновая кислота	6.99	15.63	2.50	6.85	6000
Бензойная кислота	8.39	1.28	3.20	1.66	12000
Ванилиновая кислота	10.68	1.36	4.34	2.04	6000
Галловая кислота	14.75	1.47	6.38	2.46	9000
Салициловая кислота	16.09	1.11	7.05	0.88	22000
Синаповая кислота	18.03	1.14	8.02	1.18	11000
Феруловая кислота	20.87	1.18	9.44	1.27	9000
<i>n</i> -Кумаровая кислота	23.59	1.14	10.80	1.04	8000
Кофеиновая кислота	30.35	1.31	14.18	1.93	9000

Таким образом, ПЭП на основе 6,10-ионена и ЛСТ позволяет получить гидрофильную стационарную фазу для ВЭЖХ, селективную по отношению к ФКК. Для колонки, заполненной таким сорбентом, отмечена низкая эффективность, что характерно для многих гидрофильных сорбентов, описанных в литературе. Сложное строение молекул ЛСТ, видимо, не позволяет получить однородное ПЭП на поверхности силикагеля [252].

Для оценки воспроизводимости синтеза ПЭП 6,10-ионен – ЛСТ Сорбент-2 синтезировали 3 раза (как и все последующие стационарные фазы). Времена удерживания кислот на повторно синтезированных Сорбентах-2 в одинаковых хроматографических условиях отличались на 5 – 8 % от первоначального.

Установлено, что полученные сорбенты постепенно изменяют свои свойства со временем, что может быть связано с медленной десорбцией модификаторов с поверхности. Через 4 месяца времена удерживания кислот снизились на 7 – 15 %.

### **7.3. Определение фенолкарбоновых кислот в реальных объектах на силикагеле, модифицированном 6,10-ионеном и лигносульфонатом натрия**

В рамках диссертационной работы мы попробовали оценить возможности данного сорбента в работе с природными объектами.

ФКК присутствуют во многих лекарственных растениях, чае, фруктах как в свободной форме, так и в виде простых или сложных эфиров. Вкусовые характеристики многих напитков растительного происхождения во многом определяются наличием в их составе этих соединений.



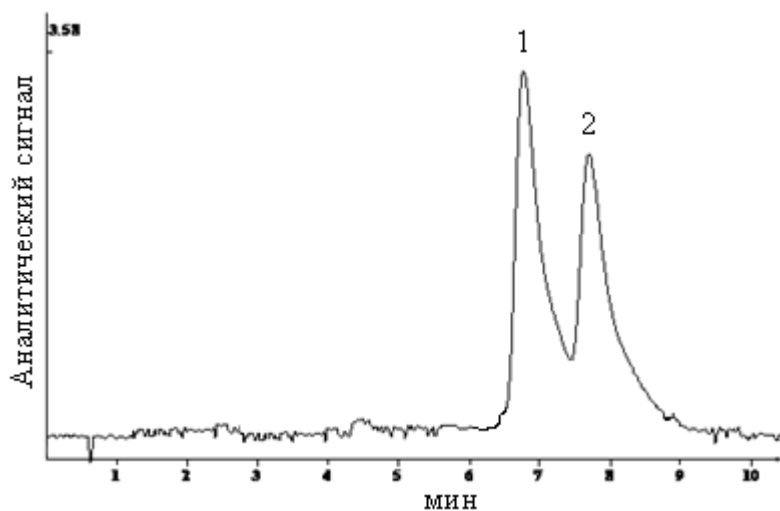
ФКК и их эфиры находят широкое применение в пищевой промышленности в качестве сильных и одновременно нетоксичных консервантов. Фенольные соединения – важные компоненты вина. Они влияют на цвет, терпкость, аромат. К тому же благодаря антиоксидантным свойствам этого класса веществ, многие сорта вина считают полезными для сердца.

Общее содержание фенольных соединений в красном выдержанном вине оставляет 3500 мг/л. Они, как правило, включают в себя ФКК, стильбены, флавоноиды, флавонолы, антоцианиды и проантоцианиды, танины. Из ФКК чаще всего встречаются галловая, сирингиновая, кофеиновая, *n*-кумаровая кислоты.

Фенольный состав вина зависит от сорта винограда и процесса приготовления. Однако в результате ферментативных реакций он меняется и в процессе выдержки вина (у красных вин – более 2 лет). Поэтому часто изучают фенольный состав вина на этом этапе. Таким образом, можно изучить и превращения, которые происходят с данными классами соединений.

На основе полученных данных о синтезированных сорбентах с ЛСТ, мы выбрали Сорбент-2 для хроматографического определения ФКК в двух реальных объектах – в минеральной воде “Архыз” и красном вине “Изабелла”.

В минеральной воде определяли сорбиновую и бензойную кислоты, которые входят туда в качестве консервантов. Кислоты определяли методом внешнего стандарта по *Методике 15* (рис. 47).

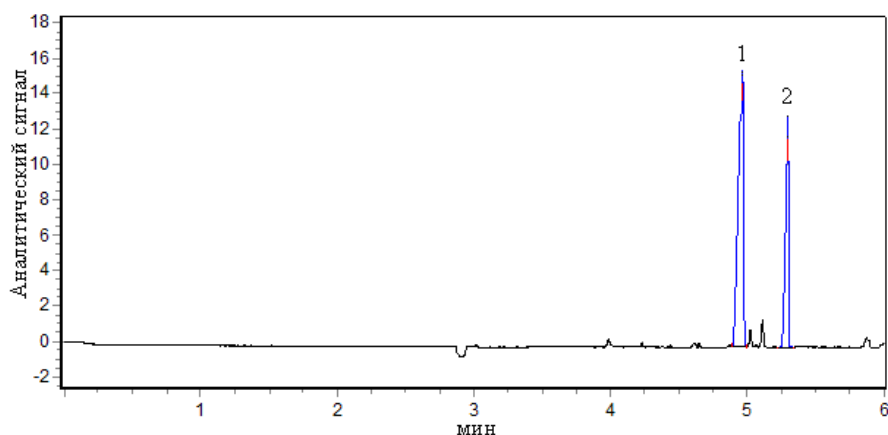


**Рис. 47.** Хроматограмма образца минеральной воды “Архыз”, полученная на Сорбенте-2. 1 – сорбиновая кислота, 2 – бензойная кислота. ПФ: ацетонитрил / 7 мМ NaClO<sub>4</sub>, (рН 6.80) (70:30). F = 1.0 мл/мин, λ = 220 нм.

Для этого строили градуировочные зависимости в координатах площадь пика – концентрация кислоты. Для построения градуировочных зависимостей использовали водные

растворы кислот в диапазоне концентраций 2 – 170 мкг/мл. Линейный диапазон определяемых концентраций составил 5 – 150 мкг/мл. Уравнения градуировочных зависимостей имеют вид  $y = (0.46 \pm 0.10)x$  и  $y = (0.40 \pm 0.10)x$  для сорбиновой ( $R^2 = 0.988$ ) и бензойной ( $R^2 = 0.987$ ) кислот соответственно. Результаты определения приведены в табл. 32.

Для проверки правильности результатов такое же определение повторили методом КЭ в кварцевом капилляре ( $L_{\text{общ}}/L_{\text{эф}}$ : 60/50 мм,  $d=75$  мкм). В качестве ФЭ использовали 10 мМ боратный буферный раствор (рН 9.20). Ввод образца осуществляли за 10 с под давлением 10 мбар. Разделение кислот проводили при напряжении  $U=25$  кВ (рис. 48).



**Рис. 48.** Электрофореграмма образца минеральной воды “Архыз”. 1 – сорбиновая кислота, 2 – бензойная кислота. Условия – в тексте.

Для исследуемых кислот так же получали градуировочные зависимости, которые описываются уравнениями  $y = (2.7 \pm 0.2)x$  ( $R^2 = 0.997$ ) и  $y = (1.9 \pm 0.2)x$  ( $R^2 = 0.998$ ) для сорбиновой и бензойной кислот соответственно. Диапазон линейности градуировочной функции составил 10 – 140 мкг/мл. Найденное содержание кислот в воде приведено в табл. 32.

**Таблица 32.** Определение сорбиновой и бензойной кислот в минеральной воде “Архыз” методом гидрофильной хроматографии и капиллярного электрофореза ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ).

Кислота	ВЭЖХ		КЭ	
	с, мкг/мл	$s_r$ , %	с, мкг/мл	$s_r$ , %
Сорбиновая кислота	140±11	3.1	136±1	0.2
Бензойная кислота	130±12	3.9	119±1	0.1

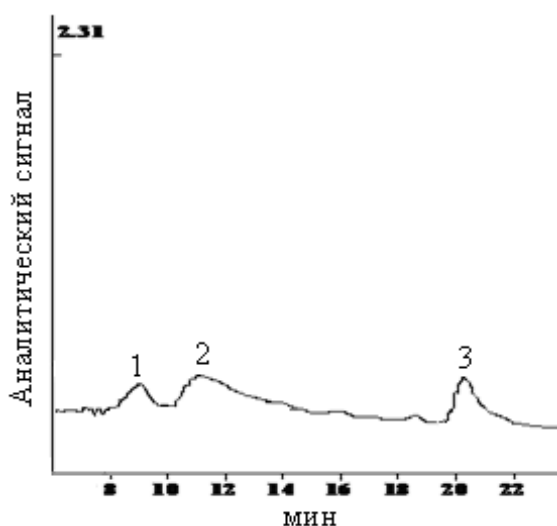
В красном вине определяли ванилиновую, галловую и бензойную кислоты.

Синтетический ванилин применяется в основном в качестве ароматизатора в пищевой, парфюмерной и фармацевтической промышленности. Природный экстракт ванили – это смесь сотен соединений, а искусственный, в основном – чистое вещество. Из-за недостатка и высокой цены природного ванилина были найдены пути его синтеза из более доступных компонентов. Ванилин используется как химический интермедиат в производстве фармакологических препаратов и других химических соединений [253].

Производные галловой кислоты (октилгаллат (E311), например) часто выступают в качестве пищевых добавок, антиоксидантов. Они защищают продукты питания от окисления, прогоркания и изменения цвета. Используются в качестве синтетического антиоксиданта в жирных продуктах питания и напитках, а также в косметике.

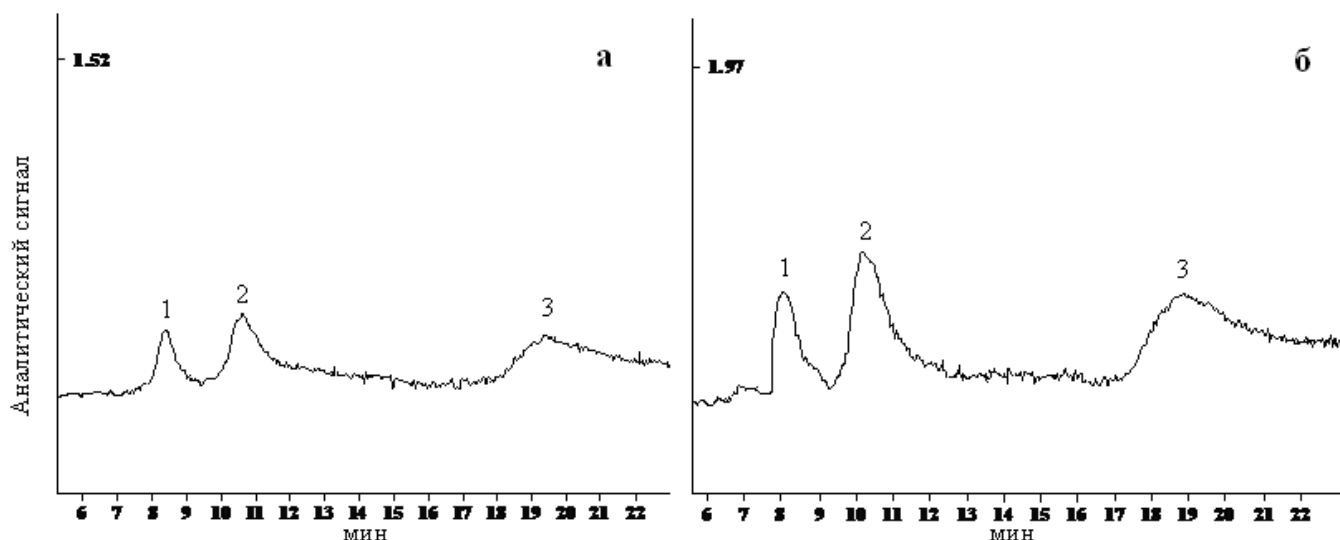
Ванилиновую, галловую и бензойную кислоту определяли методом внешнего стандарта и методом добавок по *Методике 16*. Хроматограмма красного вина представлена на рис. 49. Предварительно строили градуировочные зависимости площади пика от концентрации соответствующей кислоты. Для построения градуировочной зависимости в методе внешнего стандарта использовали растворы кислот в модельной смеси этилового спирта и винной кислоты (3 мг/мл) в соотношении 15:85. Концентрации кислот в градуировочных растворах изменяли в диапазоне 2 – 140 мкг/мл

Диапазон линейности градуировочной функции составил 10 – 100 мкг/мл. Уравнения градуировочных зависимостей имели вид:  $y = (0.4 \pm 0.1)x$  для бензойной кислоты с  $R^2 = 0.989$ ,  $y = (0.5 \pm 0.1)x$  – для ванилиновой ( $R^2 = 0.988$ ), и  $y = (0.9 \pm 0.2)x$  ( $R^2 = 0.979$ ) – для галловой кислоты. Полученные результаты приведены в табл.33.



**Рис. 49.** Хроматограмма образца красного вина, полученная на Сорбенте-2. 1 – бензойная кислота, 2 – ванилиновая кислота, 3 – галловая кислота. ПФ: ацетонитрил / 7 мМ NaClO<sub>4</sub> (рН 6.80) (70:30).  $\lambda = 220$  нм, F = 1.0 мл/мин.

Для проверки правильности результатов повторили определение вышеуказанных соединений в вине методом добавок в тех же условиях. Для этого мы получили хроматограммы вина без добавки и вина с добавками 15 и 25 мкг соответствующих кислот (рис. 50).



**Рис. 50.** Хроматограмма красного вина с добавкой а) 15 мкг б) 25 мкг ФКК. Кислоты: 1 – бензойная, 2 – ванилиновая, 3 – галловая. ПФ: ацетонитрил / 7 мМ NaClO<sub>4</sub> (рН 6.80) (70:30). λ = 220 нм, F = 1 мл/мин.

Для расчёта содержания кислот использовали следующую формулу:

$$C_x = \frac{y_x V_{доб} C_{доб}}{y_{x+доб} V_{доб} + (y_{x+доб} - y_x) V}$$

где  $C_x$  – неизвестная концентрация определяемого компонента,  $y_x$ ,  $y_{x+доб}$  – аналитические сигналы пробы анализируемого образца и образца с добавкой,  $V_{доб}$  – объём добавленного раствора определяемого компонента,  $C_{доб}$  – концентрация добавленного раствора определяемого компонента,  $V$  – аликвота анализируемой пробы.

Результаты определения приведены в табл. 33.

**Таблица 33.** Определение содержания бензойной, ванилиновой и галловой кислот в красном вине “Изабелла” методом внешнего стандарта и методом добавок (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

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

В работе было получено три сорбента, содержащих СД. Сорбент-4 – аналог сорбента с ЛСТ. Сорбент-5 содержит на поверхности 4 модифицирующих слоя (6,10-ионен – СД – 6,10-ионен – СД). На нём можно было оценить влияние количества модифицирующих полиэлектролитных слоёв на удерживание изучаемых соединений. Сорбент-6 представляет собой Сорбент-4 с дополнительным слоем НЧЗ между слоями ионена и СД. Таким образом, на нём можно оценить вклад слоя НЧЗ в свойства полиэлектролитного сорбента.

Изучали влияние рН и концентрации буферного раствора в ПФ, концентрации электролита в ПФ, природы и содержания органического растворителя в ПФ на факторы удерживания ФКК. Исследование проводили с использованием кислот, описанных в главе 7.2. В качестве ПФ использовали смесь органический модификатор – буферный раствор. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при длинах волн 254, 235 (для салициловой и синаповой кислот) и 220 (для бензойной кислоты) нм.

### **7.4.1. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и сульфатом декстрана (Сорбент-4)**

Порядок элюирования кислот с поверхности Сорбента-4 был следующим: сульфаниловая, никотиновая, салициловая, ванилиновая, галловая, сирингиновая, *n*-кумаровая, феруловая, синаповая, кофеиновая кислоты. Сорбиновая и бензойная кислоты элюировались с мёртвым временем. Сульфаниловая, никотиновая, салициловая и ванилиновая кислоты элюировались практически в одно и то же время.

На основе предварительных исследований наших систем методом КЭ мы выбрали в качестве буферных растворов ЦБ и ФБ. Величину рН буферного раствора поддерживали постоянной – 6.5. 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). Значительного влияния концентрации ЦБ на факторы удерживания кислот не наблюдали. Для дальнейшей работы выбрали концентрацию 15 мМ.

Влияние природы органического растворителя на удерживание кислот исследовали на примере ацетонитрила, метанола, изопропанола и тетрагидрофурана (ТГФ) (табл. 34). По сути только три из пригодных для гидрофильного и обращенно-фазового вариантов ВЭЖХ растворителя – ацетонитрил, метанол и ТГФ – обладают существенно различающейся селективностью. Изопропанол был добавлен в исследование в связи широкой практикой его

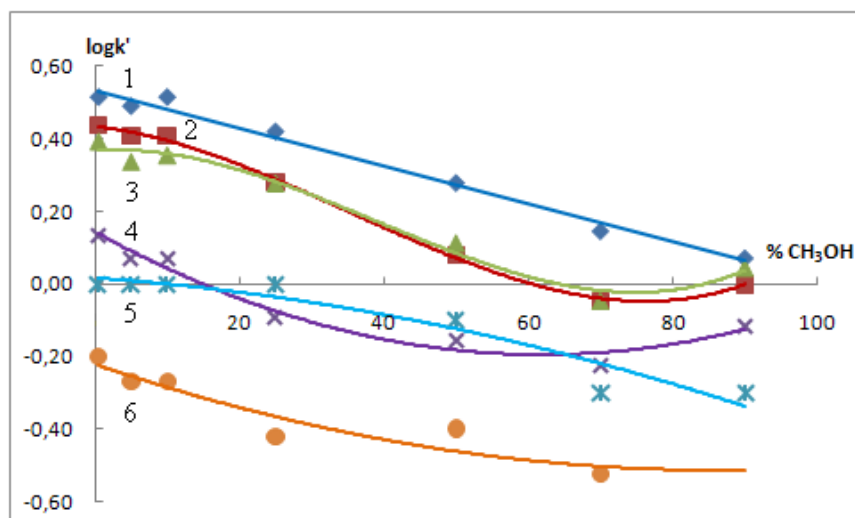
использования в различных режимах ВЭЖХ. В качестве ПФ использовали водно-органическую смесь состава: 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/органический растворитель (95:5). Порядок элюирования кислот одинаковый для всех четырех растворителей в составе ПФ. Метанол обладает наименьшей элюирующей способностью. При этом удерживание кислот невелико – факторы удерживания не превышают 3.11. При использовании метанола в составе ПФ для большинства кислот достигаются максимальные значения эффективности колонки с Сорбентом-4, а также появляется возможность разделения смесей ФКК. В связи с этим метанол был выбран для дальнейшей работы.

**Таблица 34.** Влияние природы органического растворителя в составе ПФ на удерживание ФКК и эффективность колонки с Сорбентом-4.

Кислота	Органический растворитель											
	Ацетонитрил			Метанол			ТГФ			Изопропанол		
	к'	N, ТТ/м	$\alpha$	к'	N, ТТ/м	$\alpha$	к'	N, ТТ/м	$\alpha$	к'	N, ТТ/м	$\alpha$
Кофеиновая	0.82	3000	1.15	3.11	6000	1.07	0.93	2000	1.13	0.72	2000	1.16
Синаповая	0.71	3000	1.01	2.92	8000	1.16	0.82	2000	1.11	0.62	2000	1.24
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	1000	1.86	0.63	2000	2.03	0.50	3000	3.85
Галловая	0.24	1000	1.14	1.18	7000	1.17	0.31	2000	1.00	0.13	2000	1.08
Ванилиновая	0.21	800		1.01	12000		0.30	2000		0.12	2000	

Видно, что удерживание кислот усиливается, а элюирующая способность растворителей снижается в ряду изопропанол – ацетонитрил – ТГФ – метанол. Такой ряд не коррелирует с порядком возрастания диэлектрической проницаемости растворителей. Обычно на полярных НФ элюирующая сила растворителя увеличивается по мере роста его полярности, а для неполярных НФ характерна обратная последовательность [254]. Полученный элюотропный ряд для Сорбента-4 указывает на его неоднозначную смешанную природу.

Влияние содержания метанола в ПФ на хроматографические параметры исследовали в интервале от 0.5 до 90 об.% (рис. 51). Максимальное удерживание для большинства кислот наблюдали при содержании метанола в ПФ 0.5%, минимальное – при 90% метанола. Для никотиновой, ванилиновой, салициловой и галловой кислот значения факторов удерживания мало изменяются в диапазоне от 0.5 до 10%, а в диапазоне от 25 до 90 % уменьшаются. Однако для феруловой и *n*-кумаровой кислот наблюдается небольшой минимум при 70 % (напоминает зависимость, характерную для гидрофильной хроматографии).



**Рис. 51.** Влияние содержания метанола в ПФ на удерживание ФКК на Сорбенте-4. Кислоты (100 мкг/мл): 1 – кофеиновая, 2 – феруловая, 3 – *n*-кумаровая, 4 – сирингиновая, 5 – салициловая, 6 – никотиновая. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/ CH<sub>3</sub>ОН. F = 1 мл/мин, λ = 254 и 235 нм.

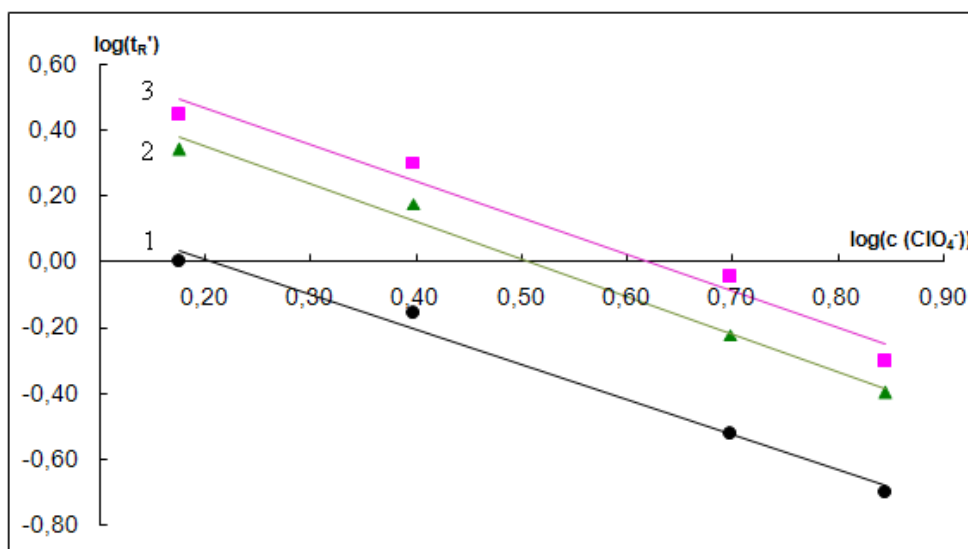
Наибольший интерес для нас представили ПФ с содержанием метанола 0,5, 5 и 10 %, поскольку кислоты в большинстве своём при использовании таких ПФ удерживаются наиболее сильно. Селективность их разделения меняется в этом интервале незначительно. Максимальные значения эффективности колонки наблюдали при содержании метанола в ПФ 10%, поэтому мы выбрали его для дальнейших исследований (табл. 35).

При оценке влияния концентрации электролита в ПФ на удерживание кислот в качестве ПФ использовали смесь метанола и водного раствора перхлората натрия с рН 4.6 в соотношении 90:10. Концентрацию перхлората натрия варьировали в диапазоне 1.5 – 7 мМ с учётом более быстрого элюирования кислот по сравнению с Сорбентом-2.

**Таблица 35.** Влияние содержания метанола на удерживание ФКК и эффективность колонки с Сорбентом-4.

Кислота	Содержание метанола, %								
	0.5			5			10		
	k'	N, ТТ/м	α	k'	N, ТТ/м	α	k'	N, ТТ/м	α
Кофеиновая	3.27	5000	1.06	3.09	6000	1.07	3.27	7000	1.16
Синаповая	3.09	1000	1.14	2.90	8000	1.14	2.81	12000	1.12
Феруловая	2.72	12000	1.25	2.54	1000	1.17	2.52	13000	1.11
<i>n</i> -Кумаровая	2.18	11000	1.60	2.18	10000	1.85	2.27	14000	1.92
Сирингиновая	1.36	14000	1.15	1.18	9000	1.00	1.18	8000	1.08
Галловая	1.18	5000	1.18	1.18	7000	1.18	1.09	14000	1.09
Ванилиновая	1.00	13000	1.00	1.00	12000	1.00	1.00	16000	1.00
Салициловая	1.00	13000	1.59	1.00	11000	1.85	1.00	16000	1.85
Никотиновая	0.63	12000	3.50	0.54	11000	3.00	0.54	16000	3.00
Сульфаниловая	0.18	15000		0.18	13000		0.18	8000	

На примере сорбиновой, ванилиновой и галловой кислот установлено, что с ростом концентрации электролита в ПФ удержание кислот ослабляется (рис. 52). Они удерживаются настолько слабо, что использование раствора перхлората натрия в качестве водного компонента ПФ в дальнейшем мы сочли нецелесообразным.



**Рис. 52.** Влияние содержания электролита перхлората натрия на удержание кислот на Сорбенте-4. Кислоты: 1 – сорбиновая, 2 – ванилиновая, 3 – галловая.

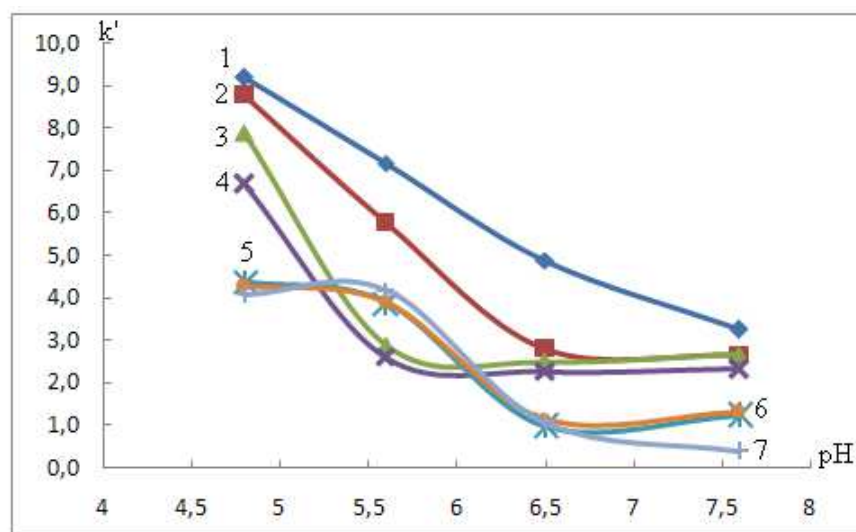
Связь удерживания кислот и концентрации электролита описывается линейной зависимостью с коэффициентами корреляции 0,987, 0,988 и 0,972 для сорбиновой, ванилиновой и галловой кислот соответственно. Однако тангенсы угла наклона этих зависимостей близки к теоретическому значению -1 (-1,07, -1,14 и -1,11 соответственно). По всей видимости, ионные взаимодействия сорбат-сорбент вносят некоторый вклад в удержание данных кислот на Сорбенте-4. Об этом же свидетельствуют данные, полученные методом потенциометрического титрования. Для Сорбента-4 наблюдается слабый перегиб на кривой титрования, однако, он выражен слабее, чем в случае Сорбента-2 с ЛСТ. Вероятно, модифицирование СД позволяет в большей степени, хоть и не полностью, закрыть положительный заряд 6,10-ионена на поверхности силикагеля.

Величину рН буферного раствора варьировали в диапазоне 4,8–7,6. Для Сорбента-4 наблюдали уменьшение факторов удерживания для большинства кислот с ростом рН буферного раствора до 6,5 (рис. 53). Сорбиновая, бензойная, сульфаниловая и никотиновая кислоты слабо удерживались во всей исследованной области рН.

Примечательно, что из общей тенденции выбиваются салициловая кислота, галловая и сиригиновая, у которых фактор удерживания изменяется мало в интервале рН 4,8 – 5,6. При

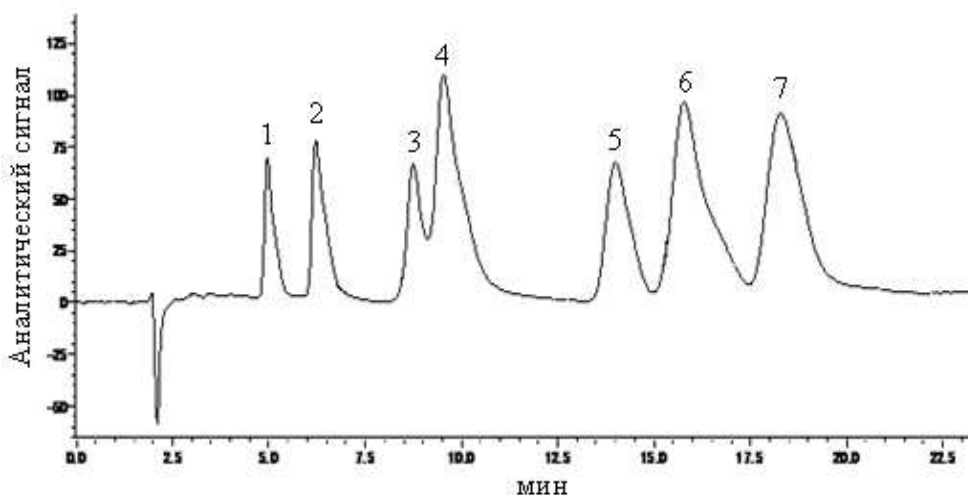


дальнейшем росте рН буферного раствора их удерживание ослабляется, как и у всех остальных кислот.



**Рис. 53.** Зависимость факторов удерживания ФКК от рН буферного раствора на Сорбенте-4. Кислоты (100 мкг/мл): 1 – кофеиновая, 2 – синаповая, 3 – феруловая, 4 – *n*-кумаровая, 5 – салициловая, 6 – сирингиновая, 7 – галловая. ПФ: 15 мМ буферный раствор/ CH<sub>3</sub>ОН (90:10).

Полученные зависимости имеют сложный характер, который зависит как от ионного состояния кислот, так и от степени протонизации сульфо-групп СД. Наилучшую селективность по отношению к большинству ФКК наблюдали при рН 4.8 (до 1.52). Для дальнейшей работы был выбран ФБ с рН 4.8. На основе проведенных исследований для разделения ФКК на Сорбенте-4 предложены следующие условия: ПФ – 15 мМ ФБ (рН 4.8)/метанол (90:10), скорость потока ПФ F = 0.5 мл/мин, λ = 254 нм. Была разделена семикомпонентная смесь кислот (рис. 54, табл. 36).



**Рис. 54.** Хроматограмма смеси ФКК на колонке с Сорбентом-4. Кислоты (15 мкг/мл): 1 – сорбиновая, 2 – никотиновая, 3 – ванилиновая, 4 – галловая, 5 – *n*-кумаровая, 6 – феруловая, 7 – кофеиновая. ПФ: 15 мМ ФБ (рН 4.8)/метанол (90:10). F = 0.5 мл/мин, λ = 254 нм.

**Таблица 36.** Хроматографические параметры разделения смеси ФКК на Сорбенте-4. Условия см. на рис. 54.

Кислота	$t_R$ , мин	$R_s$	N, ТТ/м	$k'$	$\alpha$
Сорбиновая	5.08	1.71	3000	3.54	1.31
Никотиновая	6.24	1.96	3000	4.64	1.65
Ванилиновая	8.72	0.71	4000	7.64	1.04
Галловая	9.53	2.01	3000	7.91	1.48
<i>n</i> -Кумаровая	14.00	1.49	5000	11.73	1.14
Феруловая	15.84	1.38	5000	13.36	1.24
Кофеиновая	18.36		6000	16.64	

#### 7.4.2. Силикагель, двукратно модифицированный 6,10-иононом и сульфатом декстрана (Сорбент-5)

Сорбент-5 содержит на своей поверхности 4 полиэлектролитных слоя: 6,10-ионон – СД – 6,10-ионон – СД. С поверхности Сорбента-5 в одинаковых условиях ФКК элюировались медленнее, чем с поверхности Сорбента-4. Порядок элюирования кислот с поверхности Сорбента-5 был следующим: никотиновая, сорбиновая, бензойная, салициловая, сиригиновая, галловая, ванилиновая, синаповая, *n*-кумаровая, феруловая, кофеиновая. Никотиновая и сульфаниловая кислоты элюировались с мёртвым временем и потому практически не использовались в исследованиях данного сорбента.

Установлено, что с ростом концентрации ЦБ на Сорбенте-5 усиливается удерживание ФКК, а селективность их разделения практически не изменяется (табл. 37). Концентрация 15 мМ была выбрана для дальнейшей работы.

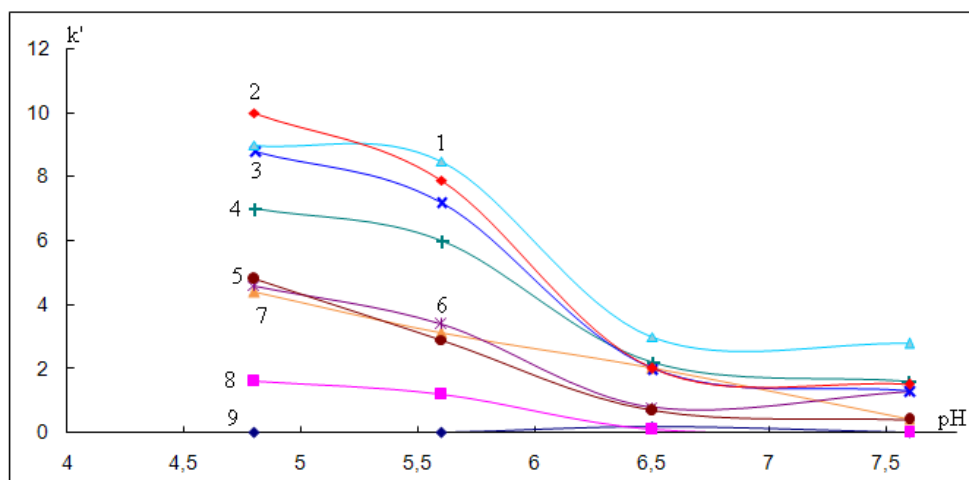
**Таблица 37.** Влияние концентрации буферного раствора на удерживание ФКК и селективность их разделения на Сорбенте-5.

Кислота	Концентрация буферного раствора, мМ					
	15	25	35	15	25	35
	$k'$			$\alpha$		
Синаповая	3.62	5.00	5.34	4.76	5.10	4.81
Галловая	0.76	0.98	1.11	1.15	1.03	1.04
Сиригиновая	0.66	0.95	1.07	4.13	4.13	3.34
Бензойная	0.16	0.23	0.32	5.33	5.33	1.45
Сорбиновая	0.03	0.14	0.22	–	–	2.75
Никотиновая	0	0	0.08			

При изменении рН в диапазоне 4.8 – 7.6 было установлено, что фактор удерживания практически для всех соединений снижается с ростом рН (рис. 55). Это наиболее выражено для

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

Таким образом, когда кислоты в большей степени диссоциированы, они слабее удерживаются на данном сорбенте. Примечательно, что в отличие от гидрофильного сорбента с ЛСТ, бензойная кислота с Сорбента-5 стала элюироваться быстрее сорбиновой, несмотря на наличие бензольного кольца. Возможно, это связано с отсутствием  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействий, которые имели место в случае ЛСТ на поверхности силикагеля.



**Рис. 55.** Влияние рН на удерживание ФКК на Сорбенте-5. Кислоты (100 мкг/мл): 1 – кофеиновая, 2 – феруловая, 3 – *n*-кумаровая, 4 – синаповая, 5 – ванилиновая, 6 – галловая, 7 – салициловая, 8 – сорбиновая, 9 – бензойная. ПФ: ацетонитрил/буферный раствор (10:90).  $\lambda = 254, 235$  и  $220$  нм.

Оценку влияния природы растворителя на удерживание кислот проводили с использованием тех же растворителей, что и в случае Сорбента-4. Чтобы сократить время исследования, мы использовали буферный раствор с рН 6,5, где  $k'$  кислот ниже 4 (табл. 38). Ацетонитрил выбрали для дальнейшей работы как компромисс между удовлетворительной селективностью разделения кислот и эффективностью колонки.

Как видно из таблицы, элюирующая сила растворителей снижается в ряду изопропанол – ацетонитрил – метанол – ТГФ. При использовании ТГФ наблюдается anomальное на первый взгляд усиление удерживания кислот по сравнению со всеми остальными растворителями. Возможно, это связано с высокой способностью молекул ТГФ быть акцепторами при образовании водородных связей с аналитами (в частности фенолов, спиртов, нитросоединений) и с молекулами модификатора на поверхности сорбента [255]. Кроме того, ТГФ очень хорошо связывается с водой. Поскольку наши ПФ содержат очень большое её количество, то в случае ТГФ мы уже имеем дело с так называемыми сольватами ТГФ в ПФ. Не исключено, что причина

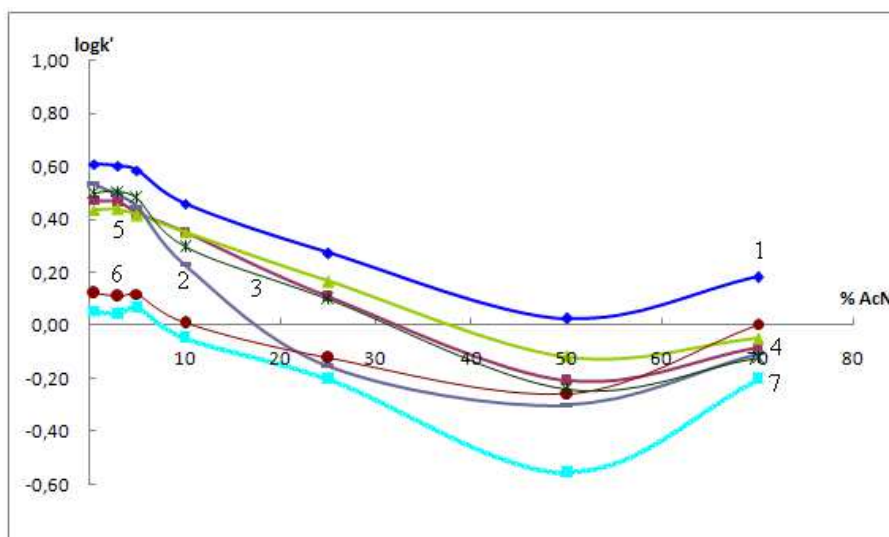
сильного удерживания наших кислот при использовании ТГФ заключается в этих вышеописанных его свойствах.

**Таблица 38.** Влияние природы органического растворителя в составе ПФ на удерживание ФКК и эффективность колонки с Сорбентом-5. ПФ: органический модификатор/ 15 мМ ЦБ (рН 6.5) (10:90).

Кислота	Органический растворитель											
	Ацетонитрил			Метанол			ТГФ			Изопропанол		
	к'	N/м	$\alpha$	к'	N/м	$\alpha$	к'	N/м	$\alpha^*$	к'	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	11000	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	

\*Коэффициент селективности считали согласно порядку элюирования, а не расположению в таблице

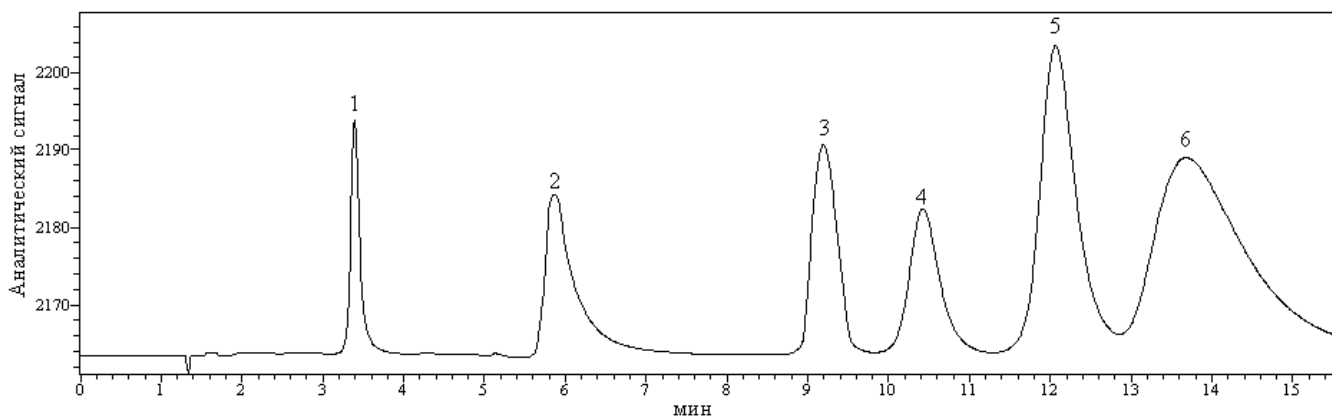
При оценке влияния содержания ацетонитрила в ПФ на поведение ФКК содержание органического модификатора варьировали в диапазоне 0.5 – 70 %. Установлено, что рост содержания ацетонитрила в диапазоне 0 – 50 % приводит к ослаблению удерживания кислот, а при дальнейшем увеличении содержания ацетонитрила факторы удерживания кислот увеличиваются (рис. 56). Наибольшая селективность разделения кислот наблюдается при содержании ацетонитрила 5 %.



**Рис. 56.** Зависимость удерживания ФКК от содержания ацетонитрила в ПФ на Сорбенте-5. Кислоты (100 мкг/мл): 1 – кофеиновая, 2 – синаповая, 3 – салициловая, 4 – феруловая, 5 – *n*-кумаровая, 6 – галловая, 7 – ванилиновая. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/ CH<sub>3</sub>OH. F = 1 мл/мин,  $\lambda$  = 254 нм.

При исследовании влияния концентрации электролита в ПФ на удерживание кислот в качестве электролита использовали перхлорат натрия, в качестве исследуемых кислот – синаповую, галловую, сиригинговую, сорбиновую, бензойную и никотиновую. Кислоты элюировали смесью ацетонитрила и водного раствора перхлората натрия в соотношении 95:5. Концентрацию перхлората натрия варьировали в диапазоне 5 – 15 мМ при рН 4.6. Значимого влияния концентрации перхлората натрия в ПФ на удерживание кислот не наблюдали. Таким образом, мы видим отсутствие ионного обмена во взаимодействиях сорбат-сорбент на Сорбенте-5.

Для разделения ФКК на Сорбенте-5 была подобрана ПФ 15 мМ ЦБ (рН 4.8)/ацетонитрил (95:5). В данных условиях была разделена шестикомпонентная смесь за 15 мин с селективностью до 1.88 и эффективностью колонки, достигающей 26000 ТТ/м (рис. 57). Хроматографические параметры разделения представлены в табл. 39.



**Рис. 57.** Разделение ФКК на Сорбенте-5. Кислоты (15 мкг/мл): 1 – сорбиновая, 2 – ванилиновая, 3 – синаповая, 4 – *n*-кумаровая, 5 – кофеиновая, 6 – феруловая. ПФ: ацетонитрил / 15 мМ ФБ (рН 4.8) (95:5). F = 1 мл/мин,  $\lambda$  = 254 нм.

**Таблица 39.** Хроматографические параметры разделения ФКК на Сорбенте-5.

Кислота	$t_R$ , мин	$R_s$	N, ТТ/м	$k'$	$\alpha$
Сорбиновая	3.42	4.79	26000	1.63	1.88
Ванилиновая	5.86	4.81	10000	3.51	1.73
Синаповая	9.20	1.97	22000	6.08	1.16
<i>n</i> -Кумаровая	10.44	2.08	21000	7.03	1.17
Кофеиновая	12.03	1.36	21000	8.25	1.16
Феруловая	13.69		5000	9.53	

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

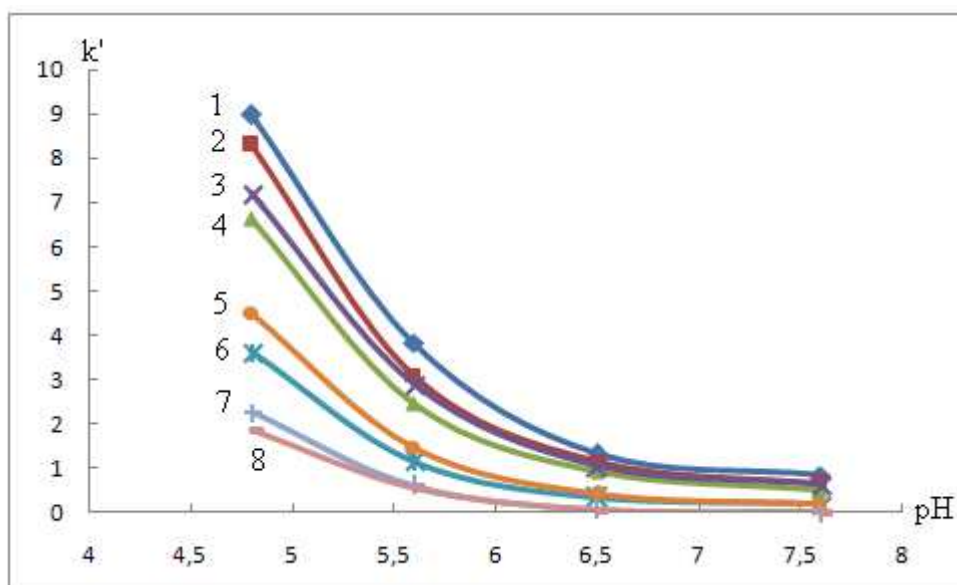
С поверхности Сорбента-6 кислоты элюировались в следующем порядке: сорбиновая, никотиновая, бензойная, салициловая, ванилиновая, сиригиновая, галловая, *n*-кумаровая, феруловая, синаповая, кофеиновая. Сульфаниловая кислота элюировалась с мёртвым временем.

При оценке влияния концентрации буферного раствора на удерживание кислот установлено, что с ростом концентрации буферного раствора возрастает фактор удерживания кислот (табл. 40), а селективность разделения кислот снижалась, и в отдельных случаях (в парах кислот феруловая – *n*-кумаровая и сиригиновая – салициловая) существенно. В связи с этим концентрацию буферного раствора 15 мМ выбрали как наиболее подходящую для разделения кислот на Сорбенте-6.

**Таблица 40.** Влияние концентрации буферного раствора на удерживание ФКК и селективность их разделения на Сорбенте-6. ПФ: ацетонитрил / ЦБ (рН 6.5) (5:95).

Кислота	Концентрация буферного раствора, мМ					
	15	25	35	15	25	35
	k'			α		
Кофеиновая	1.31	1.66	1.77	1.14	1.09	1.07
Синаповая	1.15	1.52	1.62	1.12	1.13	1.12
Феруловая	1.03	1.34	1.44	1.13	1.12	1.11
<i>n</i> -Кумаровая	0.91	1.20	1.30	2.22	1.90	1.86
Сиригиновая	0.41	0.63	0.70	1.24	1.26	1.23
Салициловая	0.33	0.50	0.57	4.71	2.50	1.73
Бензойная	0.07	0.20	0.33	1.75	1.18	1.32
Сорбиновая	0.04	0.17	0.25			

Величину рН буферного раствора варьировали в диапазоне 4.8 – 7.6. Для Сорбента-6 наблюдали чёткую тенденцию к уменьшению факторов удерживания для всех кислот с ростом рН буферного раствора (рис. 58). При высоких рН никотиновая и сульфаниловая кислоты элюировались с мёртвым временем, поэтому на рисунке не приведены зависимости для них. Для ванилиновой и галловой кислот зависимость удерживания от рН такая же, как у всех кислот. Лучшая эффективность колонки (до 18000 ТТ/м) и селективность их разделения (до 1.66) получена при рН 4.8. Поэтому в качестве водного компонента ПФ для разделения кислот выбрали фосфатный буферный раствор с рН 4.8.



**Рис. 58.** Влияние pH буферного раствора в ПФ на удерживание ФКК на Сорбенте-6. Кислоты (100 мкг/мл): 1 – кофеиновая, 2 – синаповая, 3 – феруловая, 4 – *n*-кумаровая, 5 – сирингиновая, 6 – салициловая, 7 – бензойная, 8 – сорбиновая. ПФ: ацетонитрил/буферный раствор (5:95).

При оценке влияния природы органического растворителя на поведение ФКК мы использовали ацетонитрил, метанол и изопропанол (табл. 41). Кислоты элюировали смесью 15 мМ ЦБ /органический растворитель (90:10) при pH буферного раствора 6.5. Эта величина pH была выбрана для сокращения времени данного и других последующих исследований поведения кислот на Сорбенте-6.

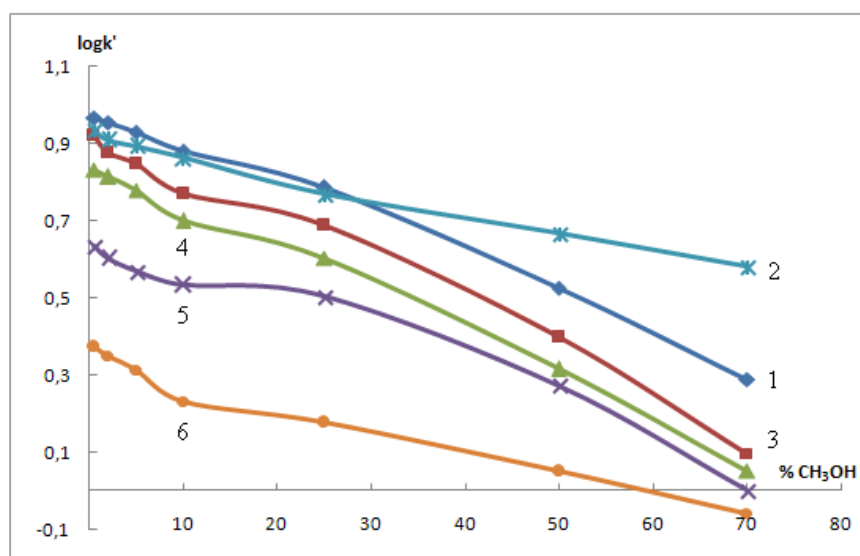
**Таблица 41.** Влияние природы органического растворителя в составе ПФ на удерживание ФКК и селективность их разделения на Сорбенте-6.

Кислота	Органический растворитель								
	Ацетонитрил			Метанол			Изопропанол		
	k'	N, ТТ/м	$\alpha$	k'	N, ТТ/м	$\alpha^*$	k'	N, ТТ/м	$\alpha^*$
Кофеиновая	1.25	2000	1.14	1.61	2000	1.22	1.59	3000	1.14
Синаповая	1.10	16000	1.20	1.32	2000	1.21	1.40	12000	1.18
Феруловая	0.91	4000	1.08	1.09	6000	1.00	1.01	10000	1.19
<i>n</i> -Кумаровая	0.84	15000	1.14	1.09	8000	1.09	1.19	13000	1.16
Галловая	0.74	2000	1.90	1.00	10000	1.30	0.87	14000	1.32
Сирингиновая	0.39	19000	1.05	0.77	2000	1.08	0.66	3000	1.10
Ванилиновая	0.37	18000	1.42	0.71	2000	1.22	0.60	16000	1.25
Салициловая	0.26	11000	4.33	0.52	13000	2.74	0.48	18000	2.67
Бензойная	0.06	11000	2.00	0.19	1000	2.11	0.18	10000	–
Сорбиновая	0.03	22000		0.09	11000		0	16000	

\*Коэффициент селективности считали согласно порядку элюирования, а не расположению в таблице

Удерживание кислот возрастает, а элюирующая сила растворителя снижается в ряду ацетонитрил – изопропанол – метанол, что практически соответствует закономерности, ранее полученной для Сорбентов-4 и -5. Видимо, механизм удерживания кислот на Сорбенте-6 имеет смешанный характер. Меньшая элюирующая способность метанола, возможно, связана с его взаимодействием с СД на поверхности. На примере метанола исследовали влияние содержания органического растворителя на удерживание кислот.

С ростом содержания метанола в ПФ факторы удерживания кислот снижались, что характерно для обращенно-фазового режима ВЭЖХ (рис. 59). Для разделения ФКК мы выбрали содержание органического модификатора ПФ 10%, поскольку в этом случае получена хорошая селективность разделения при наибольшей эффективности колонки.



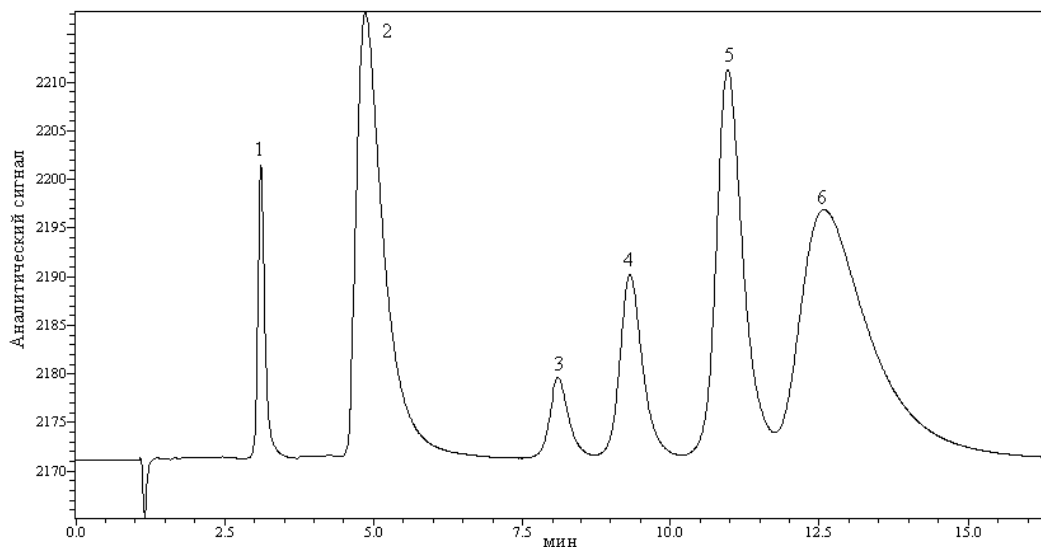
**Рис. 59.** Влияние содержания органического растворителя в ПФ на удерживание кислот на Сорбенте-6. Кислоты (100 мкг/мл): 1 – кофеиновая, 2 – синаповая, 3 – феруловая, 4 – *p*-кумаровая, 5 – салициловая, 6 – ванилиновая. ПФ: ЦБ (рН 4.8) / метанол.

Эффективность колонки возрастает, если метанол в составе ПФ заменить на ацетонитрил. Хотя удерживание ФКК с ПФ, содержащей ацетонитрил, слабее, такая ПФ позволяет лучше разделить пики большинства изучаемых кислот. Ацетонитрил предложен в качестве органического модификатора ПФ для разделения ФКК на Сорбенте-6.

При оценке влияния концентрации электролита в ПФ на удерживание кислот не удалось выявить какой-то четкой закономерности, к тому же влияние очень слабое. Исключать из механизма удерживания ФКК электростатических взаимодействий сорбат-сорбент полностью нельзя. Однако если они и вносят вклад в удерживание кислот, то очень незначительный.



На основе проделанных исследований были выбраны следующие условия для разделения кислот: ПФ – 15 мМ ЦБ (рН 4.8) /ацетонитрил (90:10), F = 1 мл/мин. В этих условиях на Сорбенте-6 разделили шестикомпонентную смесь кислот (рис. 60, табл. 42).



**Рис. 60.** Разделение смеси ФКК на Сорбенте-6. Кислоты (15 мкг/мл): 1 – сорбиновая, 2 – галловая, 3 – синаповая, 4 – феруловая, 5 – *n*-кумаровая, 6 – кофеиновая. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 4.8) /ацетонитрил (90:10). F = 1 мл/мин,  $\lambda = 254$  нм.

**Таблица 42.** Хроматографические параметры разделения ФКК на Сорбенте-6. Условия на рис. 60.

Вещество	$t_R'$ , мин	$k'$	N, ТТ/м	$\alpha$	$R_s$
Кофеиновая	11.48	9.58	4000	1.16	1.33
Синаповая	9.82	8.25	17000	1.21	2.14
Феруловая	8.22	6.83	21000	1.17	1.93
<i>n</i> -Кумаровая	7.01	5.83	20000	1.89	4.71
Галловая	3.71	3.08	4000	1.95	3.46
Сорбиновая	1.87	1.58	21000		

### 7.5. Определение фенолкарбоновых кислот в цитрусовом мёде на силикагеле, модифицированном 6,10-ионеном и СД

В качестве реального объекта для оценки практического использования силикагеля, модифицированного 6,10-ионеном и СД, мы выбрали цитрусовый мёд. Цитрусовый мед (“померанцевый”) собирают с цитрусовых деревьев: апельсинов, мандаринов, лимонов. Померанцевый мед улучшает работу пищеварительной системы, облегчает кашель, оказывает активную помощь при сердечнососудистых заболеваниях, варикозном расширении вен, гриппе.

В состав цитрусового меда входят ФКК, назначение и действие которых уже было описано в предыдущих главах работы или будет представлено ниже.

Кофеиновая, кумаровая, феруловая, ванилиновая, никотиновая и бензойная кислоты относятся к биологически активным веществам. Они обладают выраженными антибактериальными свойствами. К примеру, феруловая кислота угнетает рост бактерий. Кроме того, ФКК обладают вяжущим действием, что способствует быстрому заживлению ран и язв. Эти соединения обладают желчегонным, мочегонным и противовоспалительным действием.

В работе [213] авторы определяли содержание кумаровой, феруловой и кофеиновой кислот в цитрусовом меде, собранном в Китае. В зависимости от места сбора нектара, его состав может отличаться. Мед, исследованный в настоящей работе, собран в Абхазии.

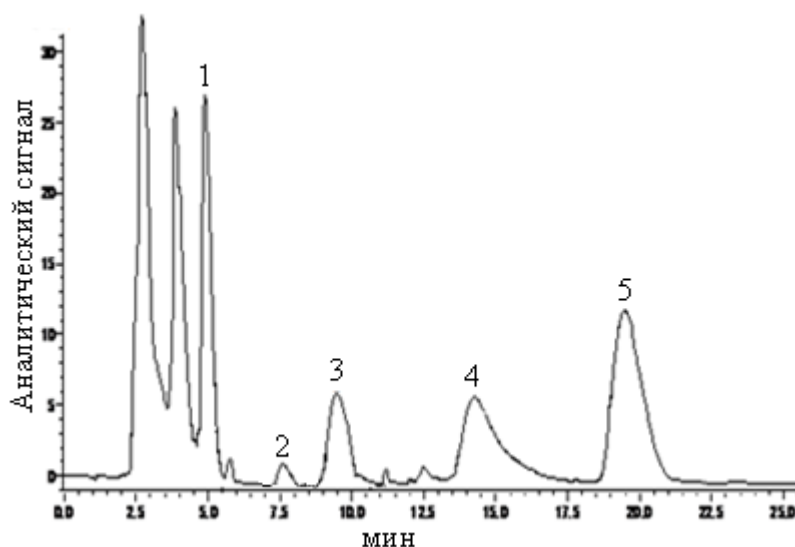
Разделить сорбиновую, галловую, *n*-кумаровую и кофеиновую кислоты можно на Сорбенте-4 и Сорбенте-6. С поверхности Сорбента-4 кислоты элюируются более быстро, что сокращает время разделения. На Сорбенте-6 пики галловой и ванилиновой кислот имеют плохую размытую форму. Для работы с цитрусовым мёдом выбрали Сорбент-4.

Нам удалось качественно идентифицировать в составе меда следующие кислоты: *n*-кумаровая, кофеиновая, галловая, сорбиновая и ванилиновая. Определение проводили по *Методике 17*. Элюировали кислоты ПФ состава 15 мМ ФБ (рН 4.8)/метанол (90:10) и детектировали их диодно-матричным детектором при 254 нм.

На рис. 61 представлена хроматограмма образца цитрусового меда после пробоподготовки, описанной в *Методике 17*. Как видно из полученной хроматограммы, ванилиновой кислоты содержится в меде очень мало, поэтому количественное определение этой кислоты не проводили.

Содержание сорбиновой, галловой, *n*-кумаровой и кофеиновой кислот определяли методом внешнего стандарта. Для этого строили градуировочные зависимости в координатах площадь пика – концентрация кислоты. Для построения зависимостей использовали водные растворы кислот с концентрациями в диапазоне 0.1 – 120 мкг/мл.

Линейный диапазон определяемых содержаний составил 0.3 – 100 мкг/мл. Уравнения градуировочных зависимостей имеют вид:  $y = (1.50 \pm 0.03)x$  ( $R^2 = 0.998$ ) для *n*-кумаровой кислоты,  $y = (2.04 \pm 0.03)x$  ( $R^2 = 0.999$ ) для галловой кислоты,  $y = (3.3 \pm 0.04)x$  ( $R^2 = 0.999$ ) для сорбиновой кислоты,  $y = (2.0 \pm 0.08)x$  ( $R^2 = 0.995$ ) для кофеиновой кислоты. Содержание кислот составило 5.10, 0.31, 0.42 и 0.70 мкг/мл для сорбиновой, галловой, *n*-кумаровой и кофеиновой кислот соответственно.



**Рис. 61.** Хроматограмма образца цитрусового меда на колонке с Сорбентом-4: 1 – сорбиновая; 2 – ванилиновая; 3 – галловая; 4 – *n*-кумаровая; 5 – кофеиновая. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 4.8)/метанол (90:10). F = 0.5 мл/мин,  $\lambda = 254$  нм.

Для проверки правильности результатов повторяли определение этих кислот в цитрусовом меде методом добавок в тех же условиях. Результаты определения ФКК методом внешнего стандарта и методом добавок представлены в табл. 43.

**Таблица 43.** Определение сорбиновой, галловой, *n*-кумаровой и кофеиновой кислот в цитрусовом меде методом внешнего стандарта и методом добавок ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ).

Кислота	Метод внешнего стандарта		Метод добавок		$c_{\min}$ , мкг/мл
	$c$ , мкг/мл	$s_r$	$c$ , мкг/мл	$s_r$	
Сорбиновая	5.10±0.50	0.10	5.80±0.80	0.12	0.08
Галловая	0.31±0.05	0.04	0.24±0.03	0.04	0.08
<i>n</i> -Кумаровая	0.42±0.17	0.30	0.40±0.15	0.31	0.10
Кофеиновая	0.70±0.04	0.03	0.71±0.09	0.04	0.10

Результаты, полученные методом добавок, подтверждают правильность определения содержания кислот в цитрусовом меде. Таким образом, предложенная методика позволяет определять ФКК с хорошей прецизионностью и правильностью.

## **7.6. Хроматографическое поведение азотсодержащих соединений на полиэлектролитных сорбентах для ВЭЖХ, содержащих сульфат декстрана**

В качестве изучаемых азотсодержащих соединений были выбраны следующие (в скобках указаны  $pK_a$  наиболее основных атомов азота): пиндолол (9.21), атенолол (9.17), надолол (9.17), тетрагидрозолин (10.42), тербуталин (9.33), гидроксизин (6.34), кофеин (14), доксиламин (8.68), карбиноксамин (8.65), хлорфенирамин (9.30) и орфенадрин (8.72). Все эти соединения, кроме кофеина, содержат неароматический атом азота. Поэтому в водных растворах при  $pH \leq 7.8$  они существуют в протонированной форме.

Для исследования хроматографического поведения азотсодержащих соединений на наших сорбентах в качестве ПФ использовали смесь органический модификатор – буферный раствор. Детектирование проводили при 270 нм (для пиндолола) и 235 нм (для всех остальных соединений).

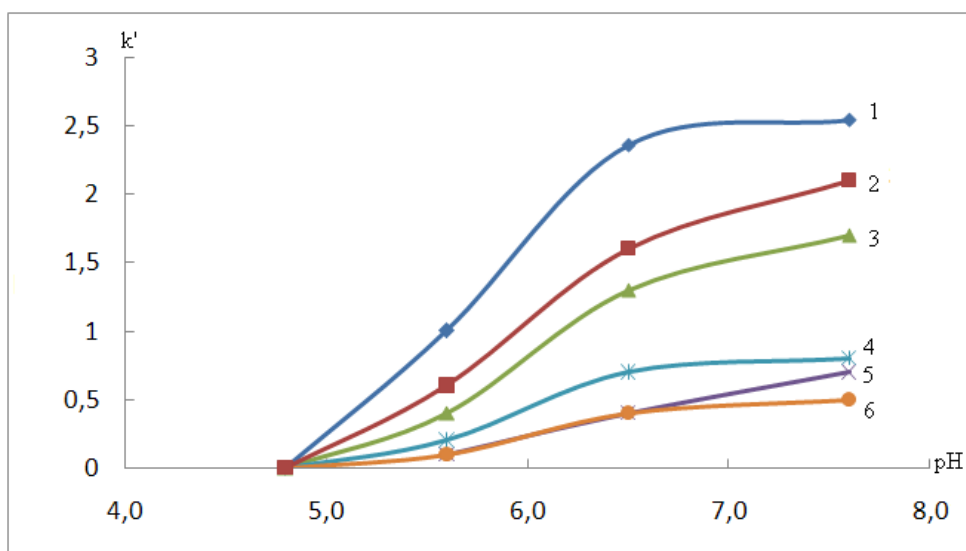
Как и для кислот, изучали влияние pH и концентрации буферного раствора в ПФ, концентрации раствора электролита в ПФ, природы и содержания органического растворителя в ПФ на факторы удерживания азотсодержащих соединений.

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

С поверхности Сорбента-4 азотсодержащие соединения элюируются в следующем порядке: кофеин, карбиноксамин, хлорфенирамин, надолол, атенолол, тербуталин, тетрагидрозолин, пиндолол, орфенадрин, гидроксизин, доксиламин. Карбиноксамин, хлорфенирамин и надолол в большинстве случаев элюируются либо с мёртвым временем, либо в одно время с атенололом. Доксиламин на хроматограмме соответствует широкий и размытый пик, он элюируется практически в одно время с гидроксизином.

При оценке влияния концентрации ЦБ на удерживание азотсодержащих соединений, значимого влияния не наблюдали. Мы выбрали концентрацию буферного раствора 15 мМ.

Влияние pH на удерживание азотсодержащих соединений изучали в интервале 4.8 – 7.6 (рис. 62). При pH 4.8 азотсодержащие соединения элюировались с мёртвым временем. При увеличении pH буферного раствора факторы удерживания сорбатов растут, лучшая эффективность колонки получена при pH 6.5 (табл. 44). Селективность разделения в большинстве случаев выше при pH буферного раствора 6.5. В этих условиях СД находится в форме аниона, что способствует удерживанию протонированных азотсодержащих соединений. В дальнейшей работе использовали 15 мМ ЦБ с pH 6.5.



**Рис. 62.** Влияние pH буферного раствора в ПФ на удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-4. Вещества (100 мкг/мл): 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.

**Таблица 44.** Влияние pH буферного раствора на удерживание и селективность разделения азотсодержащих соединений, эффективность колонки с Сорбентом-4. ПФ: 15 мМ буферный раствор/метанол (95:5).

Вещество	pH								
	5.6			6.5			7.6		
	N, ТТ/м	k'	$\alpha$	N, ТТ/м	k'	$\alpha$	N, ТТ/м	k'	$\alpha$
Гидроксизин	3000	0.86	1.79	6000	2.41	1.47	5000	2.55	1.20
Орфенадрин	6000	0.48	1.55	9000	1.64	1.25	8000	2.13	1.22
Пиндолол	7000	0.31	1.55	9000	1.31	1.90	8000	1.74	2.29
Тетрагидрозолин	8000	0.20	1.54	7000	0.69	1.41	6000	0.76	1.04
Тербуталин	8000	0.13	1.18	9000	0.49	1.26	7000	0.73	1.33
Атенолол	8000	0.11		7000	0.39		5000	0.55	

При изучении влияния природы органического растворителя на удерживание использовали те же растворители, что и для кислот. Удерживание азотсодержащих соединений убывало, а элюирующая сила растворителей возрастала в ряду ацетонитрил – ТГФ – метанол – изопропанол (табл. 45).

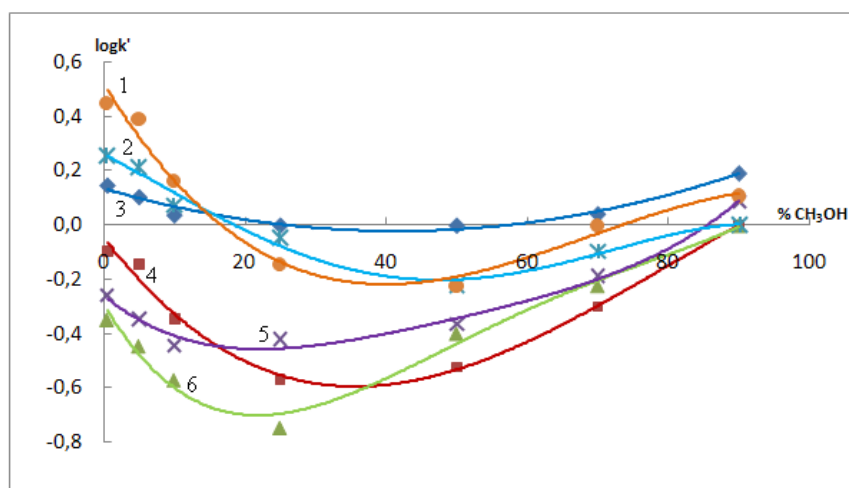
**Таблица 45.** Влияние природы органического растворителя в составе ПФ на поведение азотсодержащих соединений на Сорбенте-4. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5) / органический растворитель (95:5). F = 1 мл/мин,  $\lambda = 235, 270$  нм.

Вещество	Органический растворитель											
	Ацетонитрил			Метанол			ТГФ			Изопропанол		
	к'	N, ТТ/м	$\alpha$	к'	N, ТТ/м	$\alpha$	к'	N, ТТ/м	$\alpha$	к'	N, ТТ/м	$\alpha$
Пиндолол	2.93	7000	1.12	1.40	9000	2.00	1.76	9000	1.42	0.71	8000	1.65
Тетрагидрозолин	2.62	6000	1.97	0.70	7000	1.37	1.24	6000	1.71	0.43	5000	1.13
Тербуталин	1.33	7000	1.02	0.51	9000	1.25	0.73	9000	1.01	0.38	6000	1.23
Атенолол	1.30	6000	1.20	0.41	7000	1.28	0.72	8000	1.17	0.31	4000	1.24
Надолол	1.08	5000		0.32	6000		0.62	7000		0.25	4000	

В большинстве случаев удерживание соединений на Сорбенте-4 ослабевает с понижением полярности растворителей (ацетонитрил – метанол – изопропанол), что характерно для режима ОФ ВЭЖХ. Исключение составляет ТГФ, его элюирующая способность ниже, чем у метанола, возможно, это связано с его высокой способностью образовывать сольваты с сорбатами.

Известно, что в присутствии органических растворителей уменьшаются рK<sub>a</sub> соединений, и это может привести к тому, что некоторые из исследованных веществ (например, карбиноксамин, орфенадрин, хлорфенирамин и доксиламин) будут в меньшей степени протонированы и их удерживание изменится [256]. Селективность разделения соединений при использовании метанола в большинстве случаев наибольшая, также как и эффективность колонки, поэтому его выбрали в качестве органического модификатора ПФ, несмотря на то, что азотсодержащие соединения в присутствии метанола удерживаются на Сорбенте-4 довольно слабо.

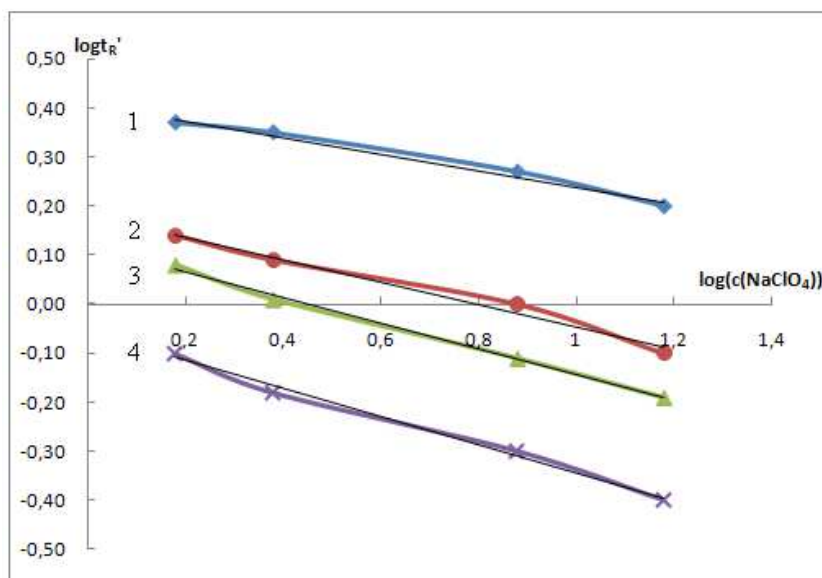
Влияние содержания органического растворителя в ПФ на удерживание исследуемых азотсодержащих соединений изучали при элюировании их смесью метанола и 15 мМ ЦБ (рН 6.5). Концентрацию метанола в ПФ варьировали в интервале 0.5 – 90 %, полученные результаты показаны на рис. 63. Факторы удерживания с ростом содержания метанола в ПФ вначале уменьшаются, а затем растут. Такой ход зависимости характерен для гидрофильной хроматографии.



**Рис. 63.** Влияние содержания метанола в ПФ на удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-4. Вещества (100 мкг/мл): 1 – доксиламин, 2 – орфенадрин, 3 – пиндолол, 4 – тетрагидрозолин, 5 – тербуталин, 6 – атенолол. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/метанол (95:5).

Наибольшую эффективность колонки наблюдали при 50 % метанола в ПФ (до 32000 ТТ/м), но селективность была мала (половина соединений элюировались в одинаковое время). При содержании 5 % метанола в ПФ эффективность достигала 11000 ТТ/м, а селективность – 1.75.

При оценке влияния концентрации электролита в ПФ на удерживание азотсодержащих соединений в качестве ПФ использовали смесь метанола и водного раствора перхлората натрия в соотношении 95:5. Концентрацию электролита варьировали в диапазоне 1.5 – 15 мМ при рН 4.6. На примере наиболее удерживаемых гидроксизина, орфенадрина, пиндолола и тетрагидрозолина установлено ослабление удерживания с ростом концентрации электролита в ПФ (рис. 64).



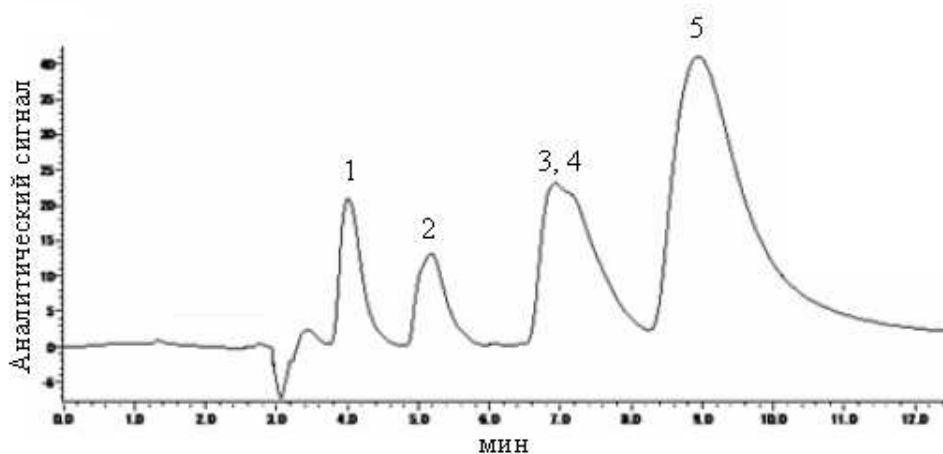
**Рис. 64.** Влияние содержания перхлората натрия в ПФ на удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-4. Соединения: 1 – гидроксизин, 2 – орфенадрин, 3 – пиндолол, 4 – тетрагидрозолин.

Связь времён удерживания азотсодержащих соединений и концентрации электролита в ПФ описывается линейной зависимостью с неплохими, а иногда достаточно высокими коэффициентами корреляции. Однако величины тангенсов углов наклона этих зависимостей отличаются от теоретических значений, характерных для ионной хроматографии (табл. 46). Можно сделать вывод о небольшом вкладе электростатических взаимодействий сорбат-сорбент в механизм удерживания данного класса соединений на Сорбенте-4.

**Таблица 46.** Корреляционные уравнения  $\log t_R' - \log c(\text{NaClO}_4)$  для гидроксизина, орфенадрина, пиндолола и тетрагидрозолина для Сорбента-4.

Соединение	Уравнение корреляции	R <sup>2</sup>
Гидроксизин	$y = -0.17x + 0.41$	0.984
Орфенадрин	$y = -0.23x + 0.18$	0.983
Пиндолол	$y = -0.26x + 0.12$	0.996
Тетрагидрозолин	$y = -0.29x - 0.06$	0.992

Для разделения азотсодержащих фармпрепаратов на Сорбенте-4 мы рекомендуем ПФ 15 мМ ЦБ (pH 6.5) / метанол (95:5). При высокой селективности сорбента по отношению к данному классу соединений низкая эффективность колонки не позволила разделить до базовой линии даже пятикомпонентную смесь (рис. 65, табл. 47).



**Рис. 65.** Хроматограмма азотсодержащих соединений на Сорбенте-4. Соединения (20 мкг/мл): 1 – надолол, 2 – тетрагидрозолин, 3 – пиндолол, 4 – орфенадрин, 5 – гидроксизин. ПФ: 15 мМ ЦБ (pH 6.5)/метанол (95:5). F = 1 мл/мин,  $\lambda = 235$  нм.



**Таблица 47.** Хроматографические параметры разделения азотсодержащих соединений на Сорбенте-4.

Вещество	$t_R$ , мин	$k'$	$\alpha$	$R_s$	N, ТТ/м
Надолол	4.02	0.29	2.34	1.78	4000
Тетрагидрозолин	5.21	0.68	1.79	2.10	5000
Пиндолол	6.95	1.22	-	-	–
Орфенадрин	6.98	1.22	1.53	1.45	–
Гидроксизин	9.06	1.87			3000

При оценке воспроизводимости синтеза ПЭП 6,10-ионен – СД и срока его стабильной работы установлено улучшение этих характеристик у Сорбента-4 по сравнению с Сорбентом-2, где в качестве полианиона выступал ЛСТ. Времена удерживания кислот и оснований на повторно синтезированных Сорбентах-4 в одинаковых хроматографических условиях отличались на 2 – 6 % от первоначального. Времена удерживания всех сорбатов значимо не изменялись ( $s_r = 3 - 5 \%$ ) в течение 4.5 месяцев работы.

#### 7.6.2. Силикагель, двукратно модифицированный 6,10-ионеном и СД (Сорбент-5)

С поверхности Сорбента-5 изучаемые соединения элюируются в следующем порядке: кофеин, надолол, атенолол, тетрагидрозолин, тербуталин, доксиламин, орфенадрин, гидроксизин, пиндолол, карбиноксамин, хлорфенирамин. Карбиноксамин и хлорфенирамин с высокими параметрами гидрофобности стали удерживаться больше других веществ на этом сорбенте.

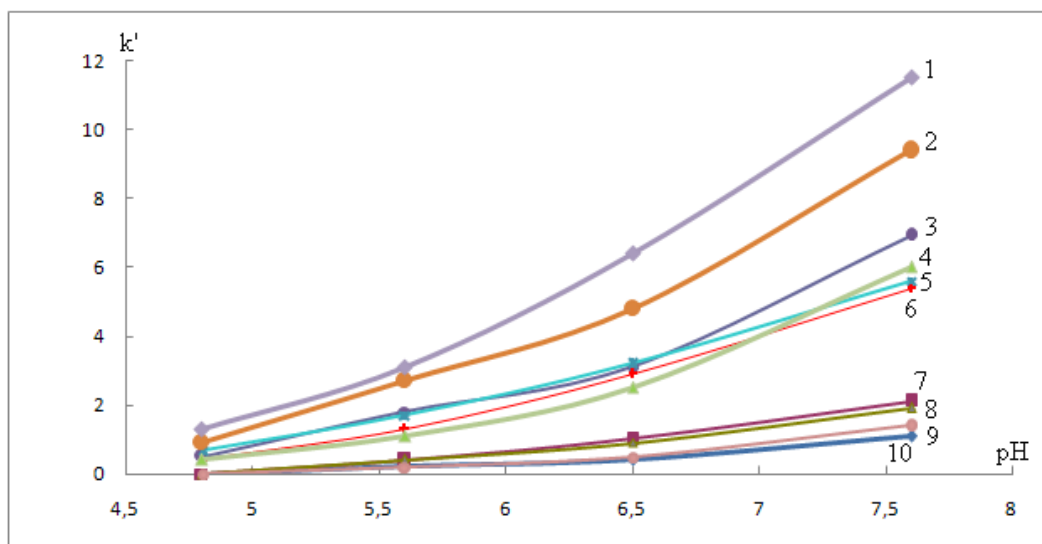
При оценке влияния концентрации буферного раствора на удерживание и селективность разделения азотсодержащих соединений на Сорбенте-5 в качестве ПФ использовали смесь ацетонитрила и ЦБ (рН 6.5) в соотношении 10:90. Концентрацию ЦБ варьировали в диапазоне 15 – 35 мМ. Для большинства соединений (кроме гидроксизина, тетрагидрозолина и атенолола) факторы удерживания снижаются при увеличении концентрации буферного раствора (табл. 48).

**Таблица 48.** Влияние концентрации буферного раствора на удерживание азотсодержащих соединений и селективность их разделения на Сорбенте-5. ПФ: ацетонитрил/ ЦБ (рН 6.5) (10:90).

Соединение	Концентрация буферного раствора, мМ					
	15	25	35	15	25	35
	$k'$			$\alpha$		
Хлорфенирамин	4.46	4.87	4.15	1.56	1.88	1.51
Пиндолол	2.86	2.39	2.30	1.02	1.05	1.19
Гидроксизин	2.81	2.59	2.74	1.13	1.03	1.07
Орфенадрин	2.49	2.47	2.15	1.98	2.21	2.69
Тербуталин	1.25	1.08	0.80	1.70	1.42	1.25
Тетрагидрозолин	0.74	0.76	0.64	2.19	1.81	1.60
Атенолол	0.34	0.42	0.40			

Селективность разделения была наибольшей при 15 мМ. Эту концентрацию буферного раствора выбрали для дальнейшей работы. Концентрация перхлората натрия в ПФ не оказывает значимого влияния на удерживание большинства веществ. Небольшое ослабление удерживания с ростом концентрации электролита в ПФ наблюдали только для тербуталина и тетрагидрозолина

При варьировании величины рН буферного раствора в диапазоне 4.8 – 7.6 установлено усиление удерживания азотсодержащих фармпрепаратов с ростом рН (рис. 66).



**Рис. 66.** Влияние рН буферного раствора в ПФ на удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-5. Вещества (100 мкг/мл): 1 – хлорфенирамин, 2 – карбиноксамин, 3 – гидроксизин, 4 – орфенадрин, 5 – доксиламин, 6 – пиндолол, 7 – тетрагидрозолин, 8 – тербуталин, 9 – атенолол, 10 – надолол. ПФ: 15 мМ буферный раствор/ацетонитрил (90:10). F = 1 мл/мин,  $\lambda = 235, 270$  нм.

Отмечено неоднозначное влияние природы органического растворителя на удерживание азотсодержащих соединений (табл. 49). Удерживание надолола, атенолола, тербуталина, орфенадрина и пиндолола возрастает, а элюирующая сила снижается в ряду растворителей ТГФ – изопропанол – метанол – ацетонитрил, что соответствует ряду увеличения полярности этих растворителей. Для наиболее удерживаемых и достаточно гидрофобных (в скобках указаны  $\log P$ ) хлорфенирамина (3.39), карбиноксамина (2.76), гидроксизина (2.03) и доксиламина (4.01) элюирующая сила ацетонитрила больше, чем метанола, что характерно для ОФ ВЭЖХ. Факторы удерживания тетрагидрозолина и орфенадрина при элюировании ПФ, содержащими метанол или ацетонитрил близки.

Как показало исследование влияния рН буферного раствора на удерживание азотсодержащих соединений, последние удерживаются дольше, если находятся хотя бы частично в непротонированной форме (т.е. при высоких рН). Можно сделать вывод о существенном вкладе

гидрофобных взаимодействий сорбат-сорбент в механизм удерживания этого класса соединений на Сорбенте-5.

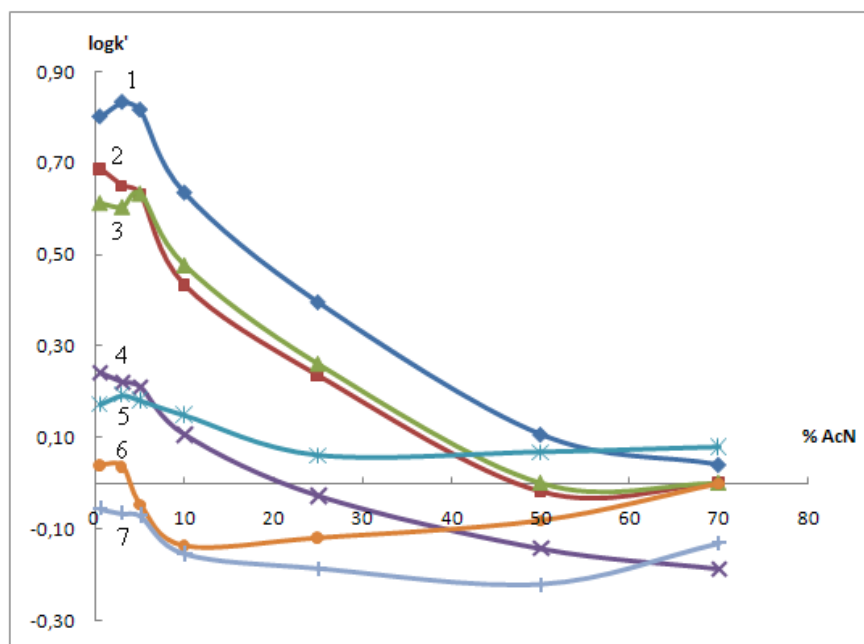
Для разумного времени хроматографического разделения с учётом компромисса между хорошей селективностью разделения и высокой эффективностью колонки для дальнейшей работы был выбран ацетонитрил.

**Таблица 49.** Влияние природы органического растворителя в составе ПФ на поведение азотсодержащих соединений на Сорбенте-5. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5) / растворитель (90:10).

Вещество	Органический растворитель											
	Ацетонитрил			Метанол			ТГФ			Изопропанол		
	к'	N, ТТ/м	$\alpha$	к'	N, ТТ/м	$\alpha^*$	к'	N, ТТ/м	$\alpha$	к'	N, ТТ/м	$\alpha^*$
Хлорфенирамин	4.52	6000	1.40	5.72	4000	1.48	3.46	7000	1.54	5.02	4000	1.59
Карбинксамин	3.22	13000	1.11	3.86	7000	1.30	2.24	12000	1.09	3.15	7000	1.18
Пиндолол	2.91	20000	1.02	2.63	13000	1.12	2.06	17000	1.03	2.43	15000	1.10
Гидроксизин	2.85	15000	1.13	2.96	8000	1.13	2.01	10000	1.15	2.68	17000	1.11
Орфенадрин	2.53	19000	1.44	2.33	14000	1.07	1.74	16000	1.44	2.19	13000	1.25
Доксиламин	1.76	20000	1.37	2.18	6000	2.06	1.21	12000	1.48	1.75	9000	1.86
Тербуталин	1.28	19000	1.72	1.06	14000	1.39	0.82	15000	1.83	0.94	15000	1.58
Тетрагидрозолин	0.75	24000	1.23	0.76	12000	2.00	0.45	17000	1.71	0.60	17000	1.83
Атенолол	0.61	20000	1.60	0.38	13000	1.03	0.26	15000	1.30	0.33	15000	1.21
Надолол	0.38	17000		0.37	14000		0.20	13000		0.27	17000	

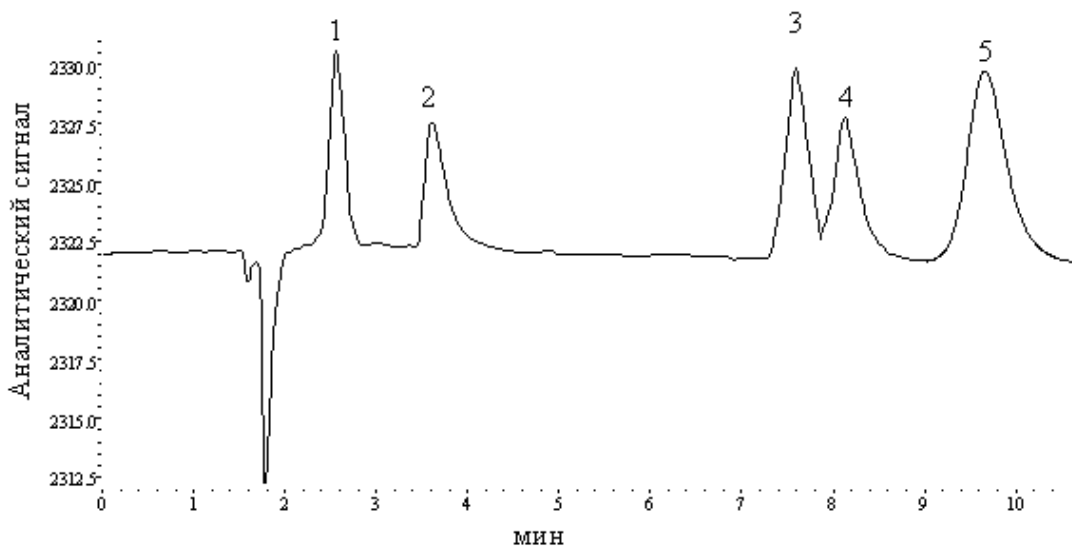
\*Коэффициент селективности рассчитывали согласно порядку элюирования (не расположению в таблице)

Влияние содержания органического растворителя в ПФ на удерживание всех изучаемых азотсодержащих соединений имеет сложный характер (рис. 67), особенно при малых содержаниях (0 – 5 %) органического растворителя. Факторы удерживания соединений за исключением атенолола и доксиламина уменьшаются при содержания ацетонитрила в ПФ от 10 до 70%, что характерно для ОФ ВЭЖХ. Для доксиламина и атенолола зависимость факторов удерживания от содержания ацетонитрила описывается кривой с небольшим минимумом, характерной для гидрофильной хроматографии.



**Рис. 67.** Влияние содержания органического растворителя в ПФ на удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-5. Вещества (100 мкг/мл): 1 – карбиноксамин, 2 – доксиламин, 3 – орфенадрин, 4 – тетрагидрозолин; 5 – тербуталин; 6 – атенолол, 7 – надолол. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/ацетонитрил.

На основании проведенных исследований для разделения азотсодержащих соединений на Сорбенте-5 мы рекомендуем ПФ состава 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/ацетонитрил (90:10). В таких условиях за 10 мин была разделена пятикомпонентная смесь (рис. 68, табл. 50).



**Рис. 68.** Хроматограмма смеси азотсодержащих соединений на Сорбенте-5. Соединения (20 мкг/мл): 1 – надолол, 2 – атенолол, 3 – доксиламин, 4 – орфенадрин, 5 – пиндолол. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5) / ацетонитрил (90:10). F = 1 мл/мин,  $\lambda = 254$  нм.

**Таблица 50.** Хроматографические параметры разделения азотсодержащих соединений на Сорбенте-5.

Соединение	$t_R$ , мин	$k'$	$\alpha$	$R_s$	N, ТТ/м
Надолол	2.67	0.50	2.04	2.69	15000
Атенолол	3.60	1.02	3.24	8.36	17000
Доксиламин	7.65	3.30	1.10	1.26	19000
Орфенадрин	8.24	3.63	1.24	1.91	16000
Пиндолол	9.76	4.48			16000

Стоит отметить длительность эксплуатации Сорбента-5 и удовлетворительную воспроизводимость его синтеза. Времена удерживания кислот и оснований на повторно синтезированных Сорбентах-5 в одинаковых хроматографических условиях отличались на 2 – 5 % от первоначального. Времена удерживания всех сорбатов значимо не изменялись ( $s_r = 0.03 - 0.05$ ) в течение 6 месяцев работы.

### **7.6.3. Силикагель, модифицированный 6,10-иононом, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и сульфатом декстрана (Сорбент-6)**

С поверхности Сорбента-6 азотсодержащие соединения элюируются в следующем порядке: кофеин, надолол, атенолол, тербуталин, тетрагидрозолин, пиндолол, орфенадрин, гидроксизин, доксиламин, карбиноксамин, хлорфенирамин. Первые четыре соединения элюируются практически в одно и то же время. В некоторых условиях, например, при 5 % органического модификатора в ПФ и pH водного её компонента 7.6, кофеин элюируется с мёртвым временем.

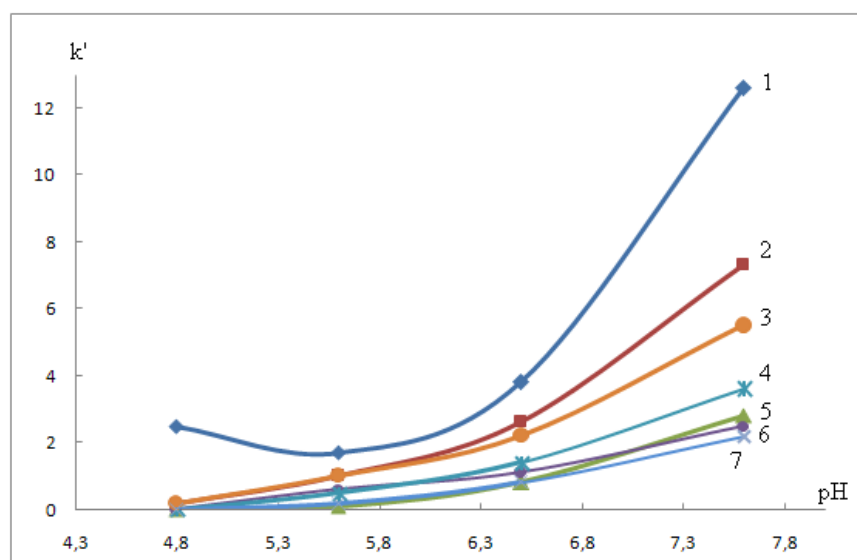
При оценке влияния концентрации буферного раствора на удерживание препаратов использовали смесь ацетонитрил – ЦБ (pH 6.5) в соотношении 90:10. Концентрацию буферного раствора варьировали в диапазоне 15 – 35 мМ. Установлено, что при повышении концентрации ЦБ с 15 до 25 мМ ослабляется удерживание азотсодержащих соединений. Для большей части из них снижается и селективность разделения (табл. 51). Дальнейшее повышение концентрации ЦБ не приводит к значительным изменениям в удерживании и, как правило, селективности разделения веществ. Для работы выбрали концентрацию ЦБ 15 мМ.

При оценке влияния pH буферного раствора на удерживание азотсодержащих соединений установлено, что с ростом pH их удерживание усиливается (рис. 69). Наибольшую эффективность

колонки (до 52000 ТТ/м) и селективность разделения (до 1.86) наблюдали при рН 6.5. Эта величина рН буферного раствора была выбрана для дальнейшей работы.

**Таблица 51.** Влияние концентрации ЦБ на удерживание азотсодержащих соединений и селективность их разделения на Сорбенте-6.

Соединение	Концентрация буферного раствора, мМ					
	15	25	35	15	25	35
	k'			α		
Хлорфенирамин	3.77	2.80	2.80	1.43	1.38	1.38
Карбиноксамин	2.63	2.03	2.06	1.24	1.23	1.23
Доксиламин	2.12	1.64	1.65	1.31	1.26	1.20
Гидроксилин	1.66	1.30	1.37	1.15	1.31	1.27
Орфенадрин	1.44	0.99	1.08	1.45	1.37	1.33
Пиндолол	0.99	0.73	0.81	1.27	1.64	2.08
Тетрагидрозолин	0.78	0.44	0.34	1.77	1.43	1.00
Тербуталин	0.44	0.31	0.39			



**Рис. 69.** Влияние pH буферного раствора в ПФ на удерживание препаратов на Сорбенте-6. Вещества (100 мкг/мл): 1 – хлорфенирамин, 2 – карбиноксамин, 3 – доксиламин, 4 – орфенадрин, 5 – гидроксилин, 6 – пиндолол, 7 – тетрагидрозолин. ПФ: 15 мМ буферный раствор/ацетонитрил (95:5).

Влияние природы органического растворителя на удерживание азотсодержащих соединений на Сорбенте-6 оценивали на примере ацетонитрила, метанола и изопропанола. В качестве ПФ использовали смесь 15 мМ ЦБ (рН 6.5) и органического растворителя в соотношении 90:10. Удерживание азотсодержащих соединений ослабляется, а элюирующая сила

растворителей растёт в ряду метанол – изопропанол – ацетонитрил. В ОФ ВЭЖХ ацетонитрил является более слабым растворителем, чем изопропанол. Возросшая его сила в случае нашего сорбента указывает на присутствие каких-либо других взаимодействий сорбат-сорбент, кроме гидрофобных.

**Таблица 52.** Влияние природы органического растворителя в составе ПФ на удерживание и разделение фармпрепаратов на Сорбенте-6. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/органический растворитель (90:10).

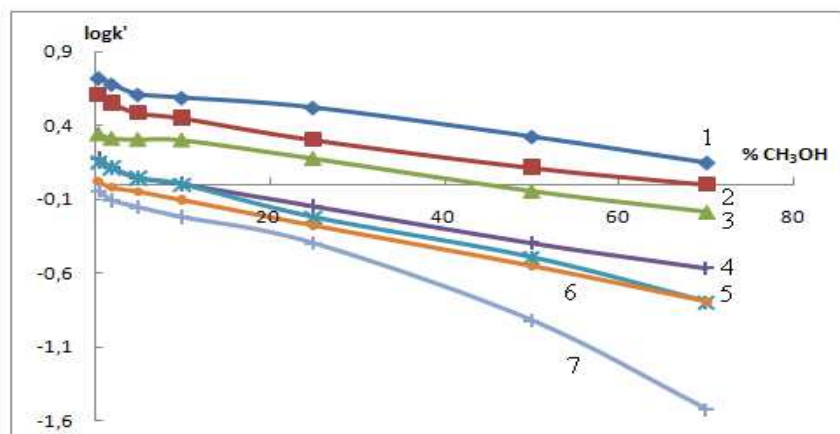
Соединение	Органический растворитель								
	Ацетонитрил			Метанол			Изопропанол		
	к'	N, ТТ/м	$\alpha^*$	к'	N, ТТ/м	$\alpha$	к'	N, ТТ/м	$\alpha$
Хлорфенирамин	3.77	8400	1.43	4.93	4400	1.28	4.01	5200	1.11
Карбиноксамин	2.63	14600	1.24	3.85	10300	1.26	3.60	14300	1.71
Доксиламин	2.12	11700	1.31	3.05	6600	1.16	2.10	10300	1.01
Гидроксизин	1.66	52300	1.15	2.63	20500	1.50	2.08	48400	1.38
Орфенадрин	1.44	23100	1.45	1.75	12000	1.22	1.51	23100	1.36
Пиндолол	0.99	15800	1.27	1.43	9300	1.44	1.11	17200	2.58
Тетрагидрозолин	0.78	36500	1.77	0.99	10300	1.30	0.43	35200	1.13
Тербугалин	0.44	34600	1.07	0.76	23800	1.08	0.38	35700	1.19
Атенолол	0.41	33600	1.08	0.70	20500	1.30	0.32	35400	1.07
Надолол	0.38	44300	3.45	0.54	32700	3.00	0.30	19100	1.89
Кофеин	0.11	34500		0.18	31600		0.16		

\*Коэффициент селективности рассчитывали согласно порядку элюирования (не расположению в таблице)

Поскольку при использовании метанола факторы удерживания соединений были выше, для оценки влияния содержания органического модификатора в ПФ на удерживание фармпрепаратов использовали метанол. Установлено, что факторы удерживания азотсодержащих соединений снижаются при увеличении добавки органического модификатора в ПФ, что характерно для ОФ ВЭЖХ (рис. 70). Соединения элюировались довольно быстро – факторы удерживания не превышали 5.24 при 0.5 % метанола в ПФ и 1.40 при 70 %. Содержание 5 % было выбрано для разделения как компромисс между хорошей селективностью разделения (до 1.54, не считая пары надолол – кофеин) и высокой эффективностью колонки (до 32000 ТТ/м).

Концентрация перхлората натрия в ПФ значимого влияния на удерживание большинства модельных веществ не оказывает. Таким образом, электростатические взаимодействия сорбат-

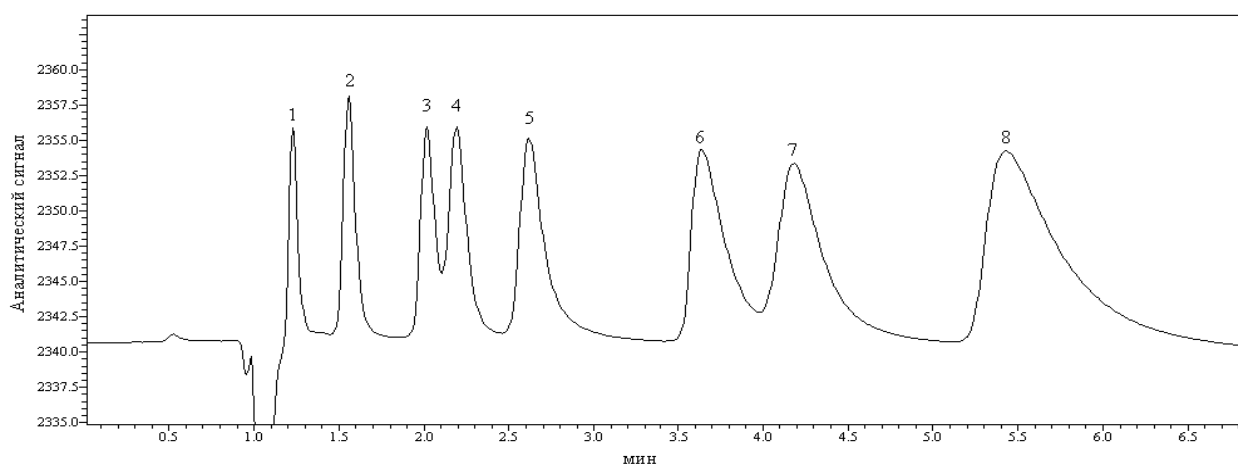
сорбент из механизма удерживания азотсодержащих соединений на Сорбенте-6 можно практически полностью исключить. Видимо, наибольший вклад в механизм их удерживания вносят гидрофобные взаимодействия.



**Рис. 70.** Влияние содержания метанола в ПФ на удерживание фармпрепаратов на Сорбенте-6. Соединения (100 мкг/мл): 1 – хлорфенирамин, 2 – карбиноксамин, 3 – доксиламин, 4 – гидроксизин, 5 – орфенадрин, 6 – пиндолол, 7 – тетрагидрозолин. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/метанол.

При наличии ацетонитрила в ПФ соединения удерживаются наиболее слабо, но селективность разделения большинства из них и эффективность колонки выше по сравнению с метанолом и изопропанолом. Поэтому для разделения исследуемых веществ использовали ПФ, содержащую ацетонитрил.

Для разделения азотсодержащих соединений рекомендуем ПФ 15 мМ ЦБ (рН 6.5) / ацетонитрил (95:5). На Сорбенте-6 разделена восьмикомпонентная смесь за 6.5 мин (рис. 71, табл. 53).



**Рис. 71.** Хроматограмма азотсодержащих соединений на Сорбенте-6 (100×4.6 мм). Соединения (10–20 мкг/мл): 1–кофеин, 2 – надолол, 3 – атенолол, 4 – тетрагидрозолин, 5 – орфенадрин, 6 – доксиламин, 7 – карбиноксамин, 8 – хлорфенирамин. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5)/ацетонитрил (95:5).



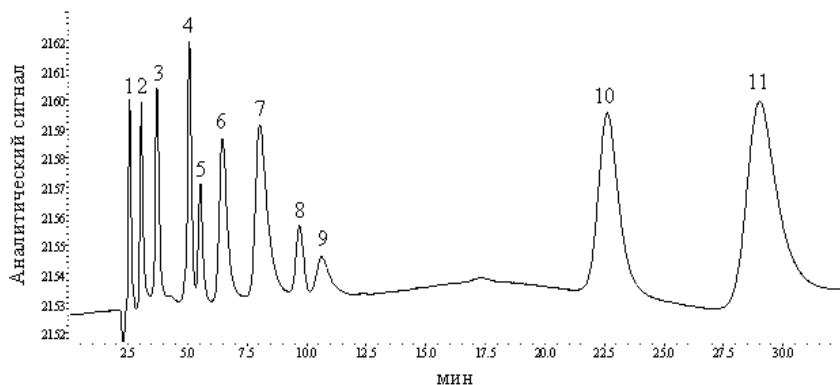
Стоит отметить хорошую воспроизводимость времен удерживания сорбатов на Сорбенте-6. Однако воспроизводимость синтеза сорбента с НЧЗ невысока по сравнению с полислойным Сорбентом-5. Времена удерживания кислот и оснований на повторно синтезированных Сорбентах-6 в одинаковых хроматографических условиях отличались на 5 – 9 %. Времена удерживания всех сорбатов значимо не изменялись ( $s_r = 0.03 - 0.05$ ) в течение 4.5 – 5 месяцев работы.

**Таблица 53.** Параметры разделения азотсодержащих соединений на Сорбенте-6.

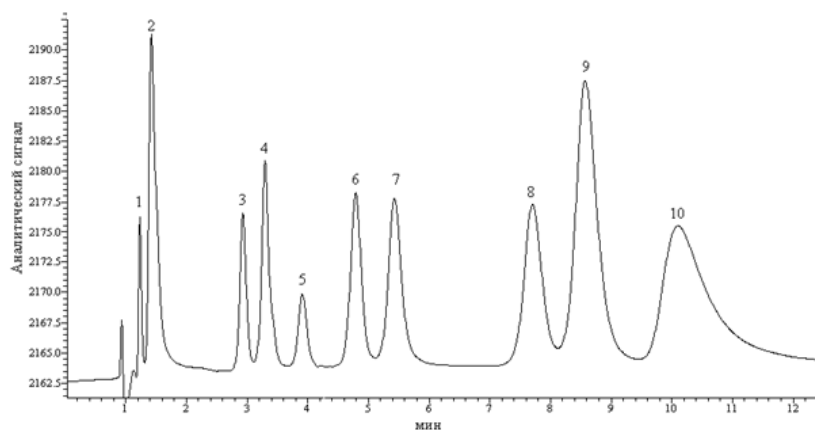
Соединение	$t_R$ , мин	$k'$	$\alpha$	$R_s$	$N$ , ТТ/м
Кофеин	1.22	0.15	3.13	2.26	15000
Надолол	1.55	0.48	1.95	3.20	14000
Атенолол	2.01	0.94	1.18	0.88	12000
Тетрагидрозолин	2.19	1.12	1.38	1.76	13000
Орфенадрин	2.61	1.59	1.66	3.2.32	13000
Доксиламин	3.64	2.57	1.21	1.22	9000
Карбиноксамин	4.18	3.11	1.34	1.58	8000
Хлорфенирамин	5.42	4.18			5000

### 7.7. Разделение смеси кислот и оснований

Одним из достоинств полученных сорбентов является возможность разделения смесей, содержащих как ФКК, так и азотсодержащие соединения на Сорбенте-5 и Сорбенте-6 (рис. 72, табл. 54, табл. 55). На Сорбенте-5 разделение требует больше времени, однако селективность и разрешение пиков на хроматограмме, в большинстве случаев выше, чем при использовании Сорбента-6. Таким образом, для определения большого числа компонентов в различных объектах, особенно, со сложной матрицей лучше использовать Сорбент-5.



**Рис. 72а.** Разделение ФКК и азотсодержащих соединений на Сорбенте-5 (150×4.6 мм). Соединения (0.32 – 15 мкг/мл): 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. 726.** Разделение ФКК и азотсодержащих соединений на Сорбенте-6 (100×4.6 мм). Соединения: (0.7 – 25.6 мкг/мл): 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.

**Таблица 54.** Хроматографические параметры разделения смеси ФКК и азотсодержащих соединений на Сорбенте-5.

Соединение	$t_R$ , мин	$k'$	$\alpha$	$R_s$	N, ТТ/м
Надолол	2.57	0.12	2.75	1.60	54000
Тетрагидрозолин	3.07	0.33	1.88	1.47	21000
Атенолол	3.72	0.62	1.95	4.67	18000
Сорбиновая кислота	5.07	1.21	1.17	1.43	33000
Бензойная кислота	5.54	1.41	1.28	2.01	28000
Карбиноксамин	6.47	1.81	1.38	1.82	14000
Хлорфенирамин	8.04	2.49	1.29	1.91	9000
Ванилиновая кислота	9.70	3.22	1.12	1.17	28000
Галловая кислота	10.63	3.62	2.44	9.00	12000
Синаповая кислота	22.63	8.84	1.31	3.18	20000
Кофеиновая кислота	29.00	11.61			16000

**Таблица 55.** Хроматографические параметры разделения смеси ФКК и азотсодержащих соединений на Сорбенте-6.

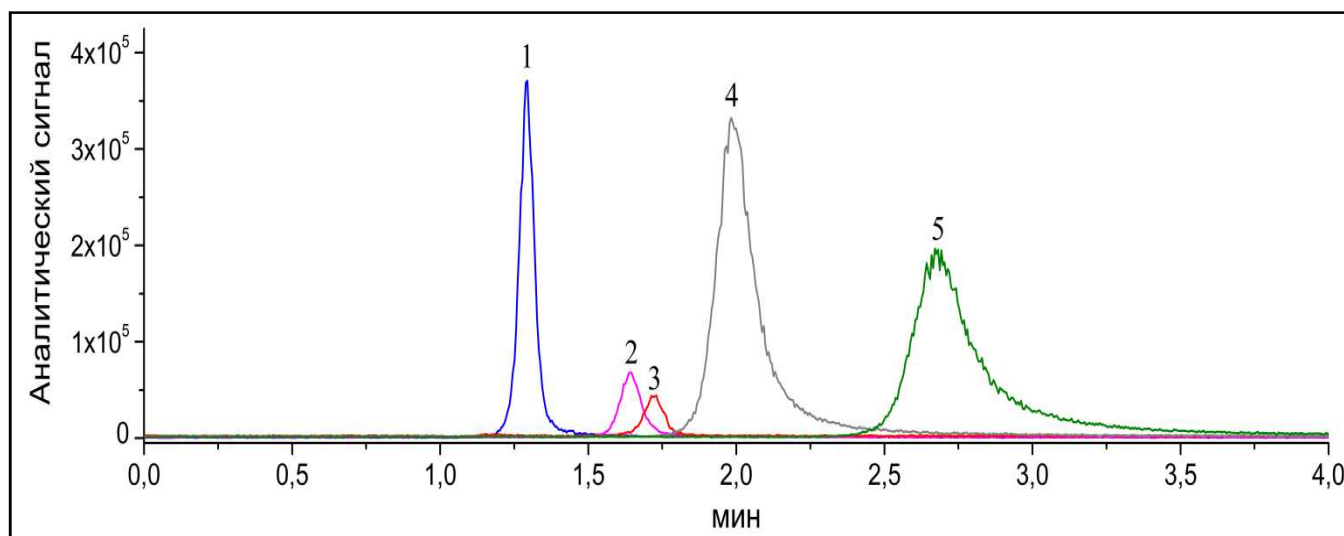
Соединение	$t_R$ , мин	$k'$	$\alpha$	$R_s$	N, ТТ/м
Тетрагидрозолин	1.23	0.23	1.83	1.16	34000
Атенолол	1.42	0.42	4.57	6.64	5000
Сорбиновая кислота	2.93	1.93	1.19	1.65	31000
Бензойная кислота	3.29	2.29	1.19	2.46	33000
Хлорфенирамин	3.91	2.91	1.30	2.80	34000
Ванилиновая кислота	4.79	3.79	1.17	1.65	29000
Сиригиновая кислота	5.43	4.43	1.51	4.61	27000
<i>n</i> -Кумаровая кислота	7.70	6.70	1.13	1.41	29000
Феруловая кислота	8.57	7.57	1.20	1.52	27000
Кофеиновая кислота	10.10	9.10			9000

## 7.8. Хроматографическое определение азотсодержащих соединений на силикагеле, двукратно модифицированном 6,10-ионеном и сульфатом декстрана

Сорбент-5 использовали для определения следовых концентраций лекарственных препаратов в сложном объекте – сыворотке крови (сыворотка предоставлена ФГБУ Эндокринологическим научным центром министерства здравоохранения Российской Федерации). Для определения малых содержаний без предварительного концентрирования необходимо очень чувствительно детектирование. Важно было подтвердить совместимость новых полиэлектролитных сорбентов с чувствительным масс-спектрометрическим детектированием.

В сыворотке крове определяли кофеин, парацетамол и хлорфенирамин, входящие в состав препарата “Гриппостад С”, и доксиламин в составе препарата “Донормил”. Они назначаются в курсе лечения при простуде. После пробоподготовки сыворотки крови по *Методике 18* определение данных соединений проводили методом внутреннего стандарта (рис. 73, табл. 56). В качестве внутреннего стандарта использовали фенацетин.

Растворы для построения градуировочной зависимости готовили в сыворотке крови (после пробоподготовки), не содержащей определяемые соединения. Концентрации градуировочных растворов лежали в диапазоне 0.05 – 250 нг/мл.



**Рис. 73.** Определение азотсодержащих фармпрепаратов в сыворотке крови человека на Сорбенте-5. Соединения: 1 – кофеин, 2 – фенацетин (внутренний стандарт), 3 – парацетамол, 4 – доксиламин, 5 – хлорфенирамин. ПФ: ацетонитрил/15 мМ ацетатный буферный раствор (рН 5.55) (10:90). F = 1 мл/мин.

Линейный диапазон градуировочного графика составил 0.5 – 200 нг/мл. Уравнения градуировочных зависимостей имеют вид:  $y = (141 \pm 6)10^{-4}x + 80 \cdot 10^{-4}$  ( $R^2 = 0.999$ ) для кофеина,  $y = (299 \pm 9)10^{-4}x + 22 \cdot 10^{-4}$  ( $R^2 = 0.999$ ) для парацетамола,  $y = (908 \pm 13)10^{-3}x$  ( $R^2 = 0.998$ ) для доксиламина,  $y = (215 \pm 11)10^{-3}x$  ( $R^2 = 0.999$ ) для хлорфенирамина. Содержание фармпрепаратов в сыворотке крови составило 164.5, 18.5, 10.4, 36.4 нг/мл для кофеина, парацетамола, доксиламина и хлорфенирамина соответственно (табл. 56).

**Таблица 56.** Определение кофеина, парацетамола, доксиламина и хлорфенирамина в сыворотке крови человека методом внутреннего стандарта ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ).

Фармпрепарат	$\bar{c}$ , нг/мл	$s_r$	$c_n$ , нг/мл	$c_{min}$ , 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

## Глава 8. Обсуждение закономерностей удерживания полярных соединений на полученных полиэлектролитных сорбентах

### 8.1. Анализ полученных данных

В заключение попытаемся сформулировать основные закономерности удерживания полярных соединений кислотной и основной природы на синтезированных полиэлектролитных сорбентах. Для этого помимо изучения влияния состава ПФ на факторы удерживание веществ (природы и содержания электролитов, состава, концентрации и pH буферного раствора, природы и содержания органического модификатора), которое описано выше, сопоставим факторы удерживания с параметрами гидрофобности Ханша и строением веществ.

#### 8.1.1. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном и лигносульфонатом натрия

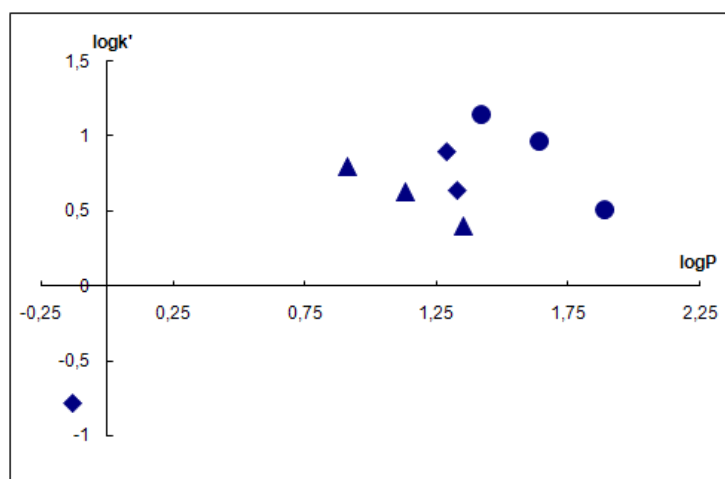
Как мы отмечали в разделе 7.2, для силикагеля, модифицированного 6,10-ионеном и лигносульфонатом натрия (Сорбент-2), характер зависимости факторов удерживания кислот от содержания органического модификатора в ПФ соответствует закономерностям гидрофильной хроматографии.

В гидрофильной хроматографии факторы удерживания обычно уменьшаются с ростом параметра гидрофобности, что соответствует уменьшению гидрофильности соединений. На

исследованном сорбенте такая закономерность соблюдается лишь в отдельных случаях (рис. 74). Так, салициловая кислота удерживается слабее, чем более полярные галловая, синаповая, феруловая и кофеиновая кислоты (табл. 57).

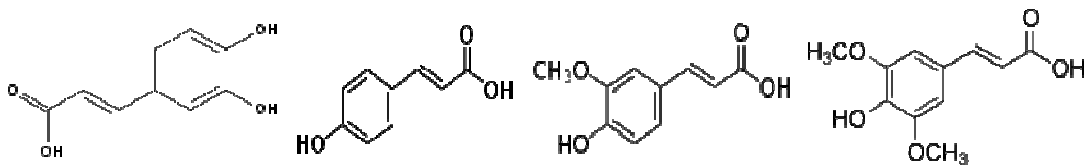
**Таблица 57.** Влияние параметра гидрофобности Ханша на факторы удерживания кофеина и ФКК. ПФ – 5мМ NaClO<sub>4</sub> (рН 6.80) / ацетонитрил (30:70).

Соединение	k'	logk'	logP
Кофеин	0.16	-0.79	-0.13
Сорбиновая кислота	2.50	0.40	1.35
Бензойная кислота	3.20	0.51	1.89
Сирингиновая кислота	4.28	0.63	1.13
Ванилиновая кислота	4.34	0.64	1.33
Галловая кислота	6.38	0.80	0.91
Салициловая кислота	7.05	0.85	2.10
Синаповая кислота	8.02	0.90	1.29
Феруловая кислота	9.44	0.97	1.64
Кофеиновая кислота	14.18	1.15	1.42



**Рис. 74.** Связь удерживания соединений на Сорбенте-2 и их параметров гидрофобности Ханша (зависимости, характерные для гидрофильной хроматографии, обозначены маркерами треугольной и круглой формы).

Определенный вклад в удерживание в гидрофильной хроматографии вносят адсорбционные взаимодействия за счет образования водородных связей между полярной поверхностью и гидроксильными группами в молекуле кислот. Так удерживание ослабляется в ряду кислот:



Кофеиновая > *n*-кумаровая > феруловая > синаповая

В данном ряду уменьшается число гидроксильных групп и их доступность.

Некоторую роль играют взаимодействия между ароматическими фрагментами в структурах ЛСТ и кислот. Мы полагаем, об этом свидетельствует тот факт, что наименьшим удерживанием обладает сорбиновая кислота, которая единственная не содержит ароматического кольца.

Исследования по изучению влияния концентрации раствора электролита на удерживание ФКК, описанные в главе 7.2, позволяют говорить также об электростатических взаимодействиях сорбат-сорбент в механизме удерживания кислот на Сорбенте-2.

Таким образом, на гидрофильном Сорбенте-2 разделение кислот происходит в результате ряда взаимодействий: основной вклад вносят гидрофильные и электростатические взаимодействия, но влияют также адсорбционные взаимодействия.

### 8.1.2. Силикагель, модифицированный 6,10-иононом и сульфатом декстрана

Анализируя результаты исследования удерживания ФКК на силикагеле, модифицированном 6,10-иононом и сульфатом декстрана (Сорбент-4), можно отметить его неоднозначную природу. Например, вклад в механизм удерживания гидрофобных взаимодействий подтверждается тем, что удерживание кислот заметно ослабляется при увеличении содержания метанола в ПФ (рис. 51). Однако зависимость удерживания ФКК на данной НФ от содержания органического растворителя не для всех кислот имеет вид, характерный для обращенно-фазового режима хроматографии. Похоже, гидрофильные взаимодействия сорбат-сорбент тоже вносят определенный вклад в удерживание сорбатов. Об этом свидетельствует и неоднозначный характер влияния природы органического растворителя на удерживание веществ. Удерживание на сорбенте анионов (хлорида, нитрата и сульфата), ослабление удерживания ФКК с ростом концентрации перхлората натрия в ПФ говорит о том, что и электростатические взаимодействия сорбат-сорбент тоже имеют место

$pK_a$  исследованных ФКК лежат в диапазоне 4.18 – 4.77 (кроме салициловой кислоты – 2.70). Таким образом, в водных растворах в области pH 4.8 – 7.6 они находятся как в недиссоциированной форме, так и в форме анионов, причем с ростом pH суммарный отрицательный заряд увеличивается. Кроме того с ростом pH меняется ионное состояние СД, растет доля заряженной формы. Для Сорбента-4 максимальное удерживание кислот наблюдается

при рН 4.8, минимальное – при рН 7.6. Это может быть связано с уменьшением гидрофобных и адсорбционных взаимодействий и усилением отталкивающих электростатических взаимодействий при увеличении рН.

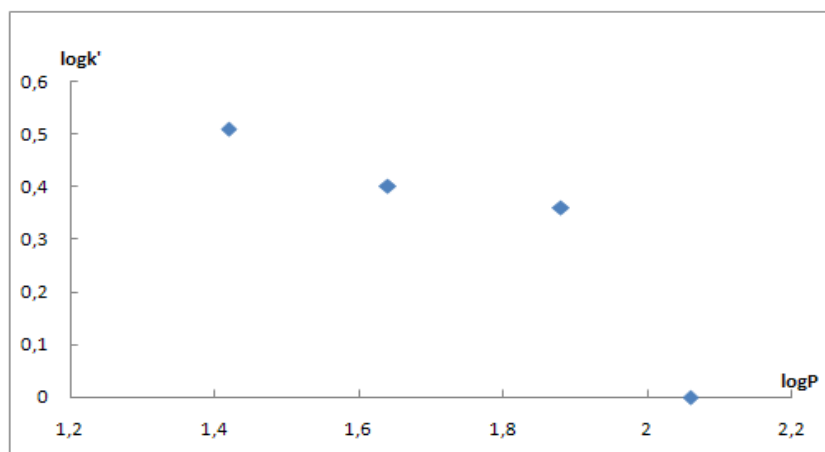
Обратим внимание на обратную тенденцию у Сорбента-2, где с ростом рН удерживание некоторых кислот ослабляется. Видимо, в нейтральной форме они сильно удерживаются на Сорбенте-2 за счёт распределительного механизма – между ПФ и тонким слоем воды на поверхности гидрофильного сорбента.

В подтверждение неоднозначной гидрофильно-гидрофобной природы Сорбента-4 сопоставили порядок элюирования ФКК с их параметрами гидрофобности Ханша, которые приведены в табл. 58. Кислоты расположены в порядке уменьшения их гидрофильности. Из таблицы видно, что нет определенной взаимосвязи между удерживанием ФКК и  $\log P$  для них.

**Таблица 58.** Параметры гидрофобности Ханша и факторы удерживания ФКК на Сорбенте-4. ПФ: 15 мМ ЦБ (рН 6.5) / метанол (90:10).

<b>Кислота</b>	<b><math>\log k'</math></b>	<b><math>\log P</math></b>
Никотиновая	-0.27	0.15
Галловая	0.04	0.91
Сирингиновая	0.07	1.13
Синаповая	0.45	1.29
Ванилиновая	0	1.33
Сорбиновая	–	1.35
Кофеиновая	0.51	1.42
Феруловая	0.40	1.64
<i>n</i> -Кумаровая	0.36	1.88
Бензойная	–	1.89
Салициловая	0	2.06

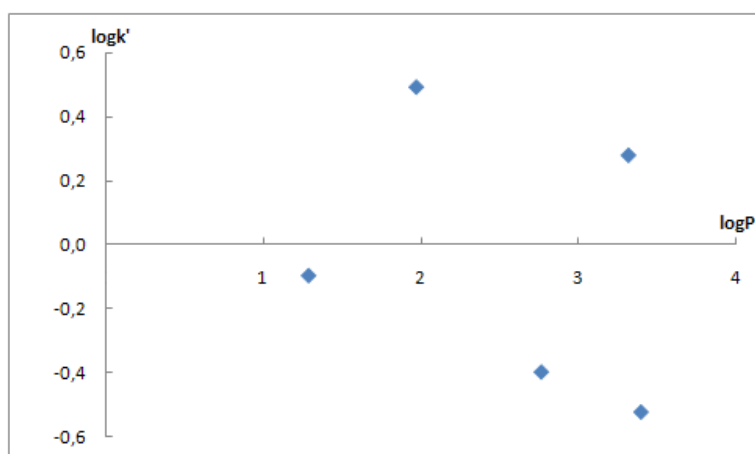
Время удерживания возрастает в ряду кислот салициловая < *n*-кумаровая < феруловая < кофеиновая, в этом же ряду уменьшается параметр гидрофобности Ханша и растёт гидрофильность соединений (рис. 75). Но удерживание возрастает в ряду никотиновая < галловая < сирингиновая < синаповая < кофеиновая, что хорошо коррелирует с ростом их гидрофобности. Все полученные закономерности подтверждают сложный гидрофильно-гидрофобный характер синтезированного сорбента с СД.



**Рис. 75.** Связь удерживания салициловой, *n*-кумаровой, феруловой и кофеиновой кислот на Сорбенте-4 с их параметрами гидрофобности Ханша.

Что касается азотсодержащих соединений, описанные закономерности удерживания в некоторой степени отмечены и для них. Зависимость влияния концентрации электролита на их удерживание аналогична таковой для ФКК. Влияние же содержания органического растворителя на удерживание азотсодержащих соединений в большей степени описывается закономерностями гидрофильной хроматографии, чем в случае ФКК. Это хорошо подтверждает и U-образная зависимость удерживания исследуемых азотсодержащих фармпрепаратов от содержания метанола в ПФ (рис. 63).

Определённой связи параметра гидрофобности и удерживания азотсодержащих оснований для всех изучаемых соединений не наблюдали. Однако в целом с ростом гидрофобности азотсодержащие соединения удерживаются на Сорбенте-4 слабее (рис. 76). Таким образом, при очевидно сложной природе Сорбента-4 удерживание полярных соединений описывается преимущественно закономерностями гидрофильной хроматографии.



**Рис. 76.** Связь факторов удерживания азотсодержащих соединений и их параметров гидрофобности на Сорбенте-4.



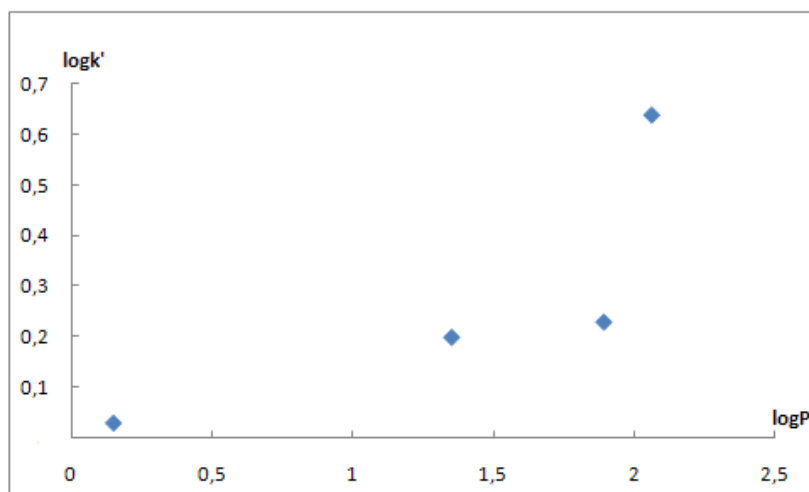
### 8.1.3. Силикагель, двукратно модифицированный 6,10-иононом и сульфатом декстрана

Удерживание азотсодержащих соединений и кислот, селективность их разделения и эффективность колонки увеличиваются при переходе от Сорбента-4 к Сорбенту-5 (силикагель, двукратно модифицированный 6,10-иононом и сульфатом декстрана) или Сорбенту-6 (силикагель, модифицированный 6,10-иононом, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и сульфатом декстрана). Таким образом, увеличение числа слоев в полислоном покрытии улучшает хроматографические параметры системы.

Характер зависимости удерживания ФКК от содержания органического растворителя на Сорбенте-5 соответствует закономерностям гидрофильной хроматографии. Влияние природы органического модификатора и его концентрации в подвижной фазе на факторы удерживания азотсодержащих соединений указывают на неоднозначную природу сорбента. Для оценки вклада в механизм удерживания гидрофобных и адсорбционных взаимодействий мы сопоставили факторы удерживания исследуемых соединений с их полярностью (параметры гидрофобности) (табл. 59). Кислоты в таблице расположены в порядке возрастания их факторов удерживания. Видно, что не всегда увеличение гидрофобности приводит к усилению удерживания. Но такая зависимость прослеживается, если выделить схожие по структуре молекулы. В ряду никотиновая – сорбиновая – бензойная – салициловая кислоты фактор удерживания возрастает с ростом гидрофобности (рис. 77). Ванилиновая кислота удерживается дольше, чем сирингиновая и кофеиновая – дольше, чем синаповая, что также соответствует росту их  $\log P$ .

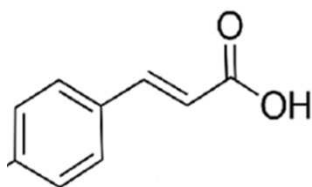
**Таблица 59.** Связь факторов удерживания ФКК на Сорбенте-5 и их параметрами гидрофобности. ПФ: 15 mM ФБ (pH 4.8)/ацетонитрил (90:10).

Кислота	$\log k'$	$\log P$
Никотиновая	0.03	0.15
Сорбиновая	0.20	1.35
Бензойная	0.23	1.89
Салициловая	0.64	2.06
Сирингиновая	0.65	1.13
Галловая	0.66	0.91
Ванилиновая	0.68	1.33
Синаповая	0.85	1.29
<i>n</i> -Кумаровая	0.94	1.88
Феруловая	0.95	1.64
Кофеиновая	1.06	1.42



**Рис. 77.** Связь факторов удерживания никотиновой, сорбиновой, бензойной и салициловой кислот на Сорбенте-5 и их параметров гидрофобности.

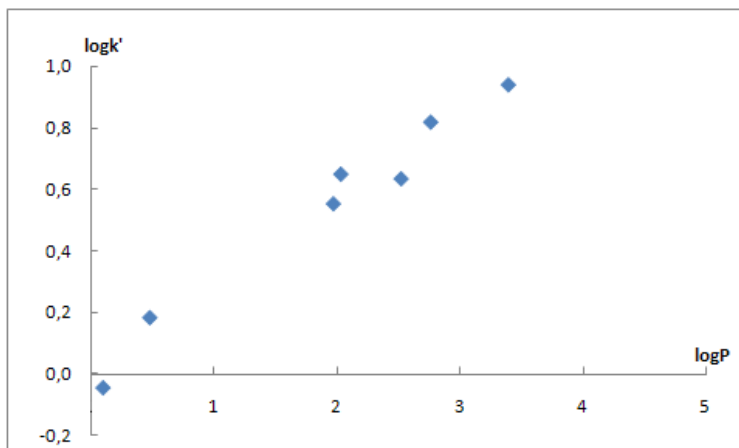
Больше, чем другие кислоты, на Сорбенте-5 удерживались синаповая, *n*-кумаровая, феруловая и кофеиновая кислота, в структуре которых есть фрагмент:



Порядок элюирования этих кислот зависит от числа и природы заместителей в бензольном кольце. Максимальный фактор удерживания у кофеиновой кислоты с двумя ОН-группами, он меньше у *n*-кумаровой кислоты с одной ОН- группой и феруловой, где дополнительно в *o*-положении расположена группа -ОСН<sub>3</sub>. Более заметно ослабление удерживания для синаповой кислоты, когда гидроксил экранирован двумя группами -ОСН<sub>3</sub>. Вероятно, для этих кислот удерживание в заметной степени определяется диполь-дипольными взаимодействиями сорбат-сорбент и за счет образования водородных связей с молекулами модификатора (СД) на поверхности.

Удерживание изучаемых азотсодержащих соединений (если исключить из ряда орфенадрин, тетрагидрозолин и надолол) на Сорбенте-5 увеличивается с ростом их гидрофобности (рис. 78), т.е. при разделении азотсодержащих соединений вклад гидрофобных взаимодействий в механизм удерживания увеличивается по сравнению с ФКК. Вклад диполь-дипольных взаимодействий в удерживание также играет важную роль, поскольку сильнее на сорбенте удерживаются вещества, в структуре которых либо два бензольных кольца, либо индольное кольцо.

Таким образом, Сорбент-5 представляется нам сорбентом смешанного типа (mix-mode), где в механизм удерживания вносят весомый вклад гидрофобные и гидрофильные взаимодействия сорбат-сорбент.

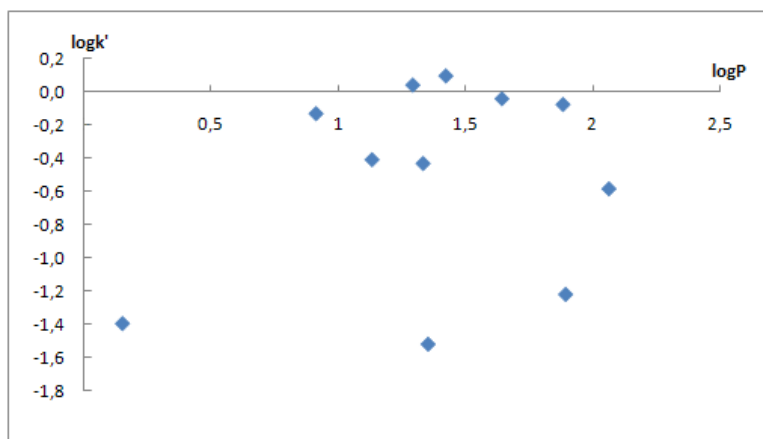


**Рис. 78.** Связь факторов удерживания на Сорбенте-5 азотсодержащих соединений и их параметров гидрофобности.

#### 8.1.4. Силикагель, модифицированный 6,10-ионеном, наночастицами золота, стабилизированными цитратом натрия, и сульфатом декстрана

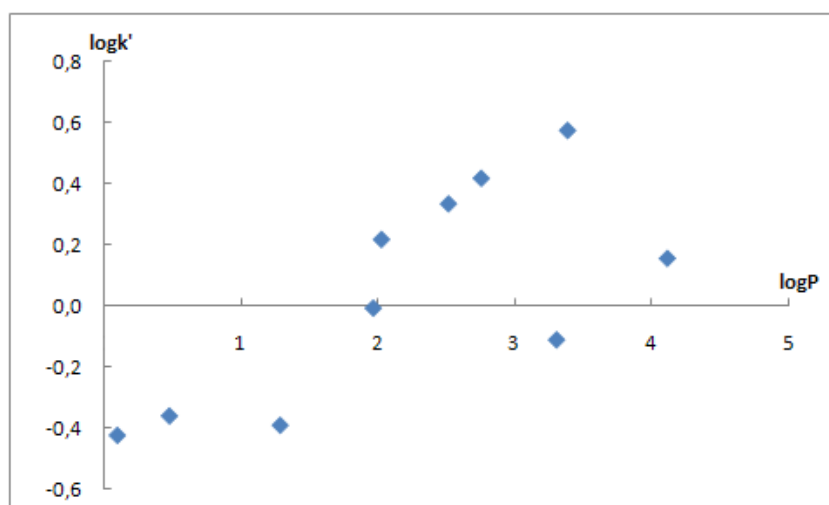
Важной особенностью Сорбента-6 является наличие в модифицирующем слое атомов золота. Как известно, золото обладает большим сродством к взаимодействию с серой и азотом. Возможно, именно этим объясняется изменившийся порядок элюирования фармпрепаратов.

На Сорбенте-6 изучаемые вещества, особенно, ФКК удерживаются слабее, чем на Сорбенте-5. Связь удерживания ФКК и их гидрофобности аналогична Сорбенту-5 (рис. 79): с ростом гидрофобности в большинстве своём они удерживаются сильнее, но можно аналогично Сорбенту-5 выделить группы с обратной зависимостью удерживания от logP. Следовательно, вклад гидрофобных взаимодействий сорбат-сорбент в механизм удерживания ФКК на Сорбенте-6 является существенным, но гидрофильные взаимодействия также имеют место.



**Рис. 79.** Связь факторов удерживания ФКК на Сорбенте-6 и их параметров гидрофобности.

Похожую связь удерживания на Сорбенте-6 и гидрофобности можно наблюдать и для азотсодержащих соединений (рис. 80):



**Рис. 80.** Связь факторов удерживания азотсодержащих соединений на Сорбенте-6 и их параметров гидрофобности.

Обобщая полученные результаты, можно сделать следующие предположения относительно природы синтезированных стационарных фаз.

При неоднозначном механизме удерживания полярных кислот и оснований на Сорбенте-4 можно предположить, что разделение этого класса соединений проходит преимущественно по механизму гидрофильной хроматографии.

Добавка НЧЗ между слоями 6,10-ионена и СД в ПЭП на силикагеле приводит к ослаблению удерживания ФКК и иногда снижению селективности их разделения (рис. 54, 60). Кроме того, колонка, заполненная сорбентом с НЧЗ в 2 – 4 раза эффективнее, чем колонка, заполненная Сорбентом-4 без НЧЗ. В случае азотсодержащих соединений мы наблюдаем несколько иную картину: они начинают удерживаться сильнее, чем на Сорбенте-4, и селективность их разделения возрастает. Вероятно, присутствие связи золото – азот играет здесь не последнюю роль. Сорбент-6 принадлежит к сорбенту смешанного типа, где обращено-фазовый механизм удерживания превалирует над гидрофильным.

Несколько иное ПЭП получается при дублировании слоёв ионена и СД на поверхности силикагеля. Сорбент-5 также можно отнести к стационарным фазам смешанного типа. Однако в механизм удерживания ФКК и азотсодержащих соединений на Сорбенте-5 уже в большей степени вносят вклад гидрофильные и адсорбционные взаимодействия сорбат-сорбент.

## 8.2. Тестирование Сорбента-5 и Сорбента-6 на остаточные силанольные группы и гидрофобность

Из практики полиэлектролитных покрытий капилляров для КЭ и немногочисленных полиэлектролитных сорбентов для ВЭЖХ известно, что полностью экранировать силанольные группы силикагеля при его модифицировании 1 – 2 полиэлектролитами не удаётся. Нам было интересно проверить, насколько закрыты эти остаточные силанольные группы в случае модифицирования 3 – 4 слоями модификатора (Сорбент-6 и Сорбент-5). Для этого мы использовали тест на остаточные силанольные группы, описанный в работе [52].

Тест заключается в исследовании элюирования с НФ смеси пиридина ( $pK_a$  8.8) и фенола ( $pK_a$  10.0) смесями воды и органического растворителя при их различном соотношении. С хорошо деактивированной НФ (без остаточных силанольных групп на поверхности либо с небольшим их содержанием) пиридин элюируется раньше фенола.

Результаты, полученные для наших полислойных сорбентов, представлены в табл. 60. Описанная выше закономерность для сорбентов, лишённых остаточных силанольных групп, наблюдается только в случае Сорбента-5.

**Таблица 60.** Тест на остаточные силанольные группы на поверхности полислойных Сорбента-5 и Сорбента-6.

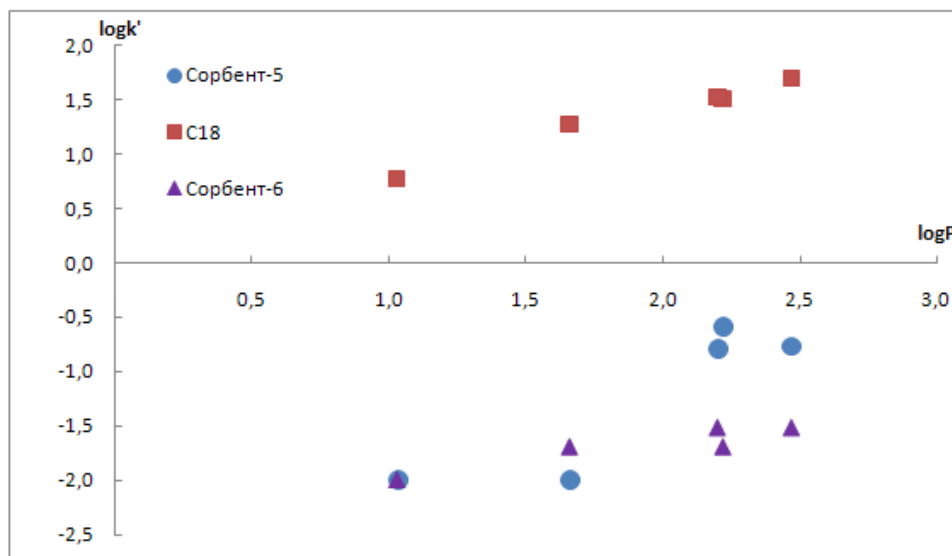
Подвижная фаза AcN/H <sub>2</sub> O	Сорбент-5		Сорбент-6	
	k'			
	Пиридин	Фенол	Пиридин	Фенол
15:85	0.37	0.44	0.68	0.40
25:75	0.25	0.32	0.63	0.38
40:60	0.03	0.24	0.49	0.33

На Сорбенте-6 увеличивается удерживание пиридина, он элюировался позже фенола, что мы связываем с наличием в полиэлектролитном модифицирующем слое атома золота и образованием связи азот–золото, вследствие чего пиридин сильнее взаимодействует с поверхностью.

Было интересно сравнить гидрофобность этих сорбентов между собой и с коммерческим обращенно-фазовым сорбентом, например, Gemini-C18, позволяющим успешно разделять и полярные вещества. Для этого использовали описанный в литературе тест на гидрофобность [52].

Способность стационарной фазы функционировать в обращенно-фазовом режиме изучали при разделении смеси бензилового спирта, бензола, ацетофенона, метилбензоата и диметилтерефталата. Их параметры гидрофобности составляют 1.03, 2.22, 1.66, 2.20 и 2.47 соответственно. Тест на гидрофобность заключается в исследовании зависимости факторов удерживания этих соединений от содержания органического растворителя в ПФ. Удерживание тестовых компонентов на Сорбенте-5 и Сорбенте-6 было значительно слабее, чем на гидрофобном сорбенте C18. Также для всех трёх сорбентов наблюдалось снижение факторов удерживания веществ с ростом содержания органического растворителя в ПФ, что характерно для ОФ ВЭЖХ.

Корреляция логарифма факторов удерживания и параметров гидрофобности Ханша для соединений тестовой смеси проиллюстрирована на рис. 81. Если связь гидрофобности и удерживания на сорбенте C18 можно описать линейной зависимостью с хорошим коэффициентом корреляции, то в случае наших сорбентов  $R^2$  составляет 0.793 для Сорбента-5 и 0.848 – для Сорбента-6. Важно, что порядок элюирования соединений на наших сорбентах отличен от такового на сорбенте C18.



**Рис. 81.** Зависимость фактора удерживания бензилового спирта, ацетофенона, бензола, метилбензоата и диметилтерефталата от их параметров гидрофобности Ханша 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.

Таким образом, мы ещё раз подтвердили смешанную гидрофильно-гидрофобную природу Сорбента-5 и Сорбента-6, возникшую вследствие образования ПЭК на поверхности силикагеля (так называемые “mixed-mode” сорбенты).

\*\*\*

Полученные сорбенты для ВЭЖХ имеют различную природу и могут быть применены для решения соответствующих каждому из них задач. Смешанный тип сорбентов открывает возможности для более широкого круга полярных разделяемых и определяемых соединений помимо фенолкарбоновых кислот и азотсодержащих соединений.

Покрытие силикагеля полиэлектролитами 6,10-ионеном и сульфатом декстрана в различных вариациях видится нам наиболее перспективным для работы с полярными соединениями по сравнению с хитозаном в качестве поликатиона и лигносульфонатом натрия, N-(3-сульфо, 3-карбокси)-пропионилхитозаном в качестве полианионов. Использование такого полиэлектролитного покрытия позволило нам получить достаточно селективный по отношению к фенолкарбоновым кислотам и азотсодержащим соединениям сорбент, а в случае полислоного покрытия – также более эффективную хроматографическую колонку. Важным достоинством сорбентов является возможность их применения в методе ВЭЖХ-МС, что позволяет работать с широким кругом природных объектов. Для повышения эффективности колонки (капилляра) с предложенными полиэлектролитными покрытиями и экспрессности анализа можно вносить слой наночастиц золота, стабилизированными цитратом натрия, между слоями пликатиона и полианиона. Однако методика синтеза таких материалов, как и всех предложенных в работе, нуждается в дополнительном более детальном исследовании. Необходимо повышение стабильности цитратных наночастиц, интересно исследовать влияние температуры в ходе синтеза на характеристики силикагеля, модифицированного ПЭП.

## ВЫВОДЫ

1. Предложены новые полислоные покрытия: 6,10-ионен – N-(3-сульфо, 3-карбокси)-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 ( $s_r$  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  $s_r$  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.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Koetz J., Kosmella S.* Polyelectrolytes and nanoparticles // Berlin: Springer. 2007. P. 105.
2. *Desnoyers J.E., Arel M., Perron E., Jolicœur C.* Apparent molal volumes of alkali halides in water at 25 deg.. Influence of structural hydration interactions on the concentration dependence // J. Phys. Chem. 1969. V. 73. P. 3346–3351.
3. *Howard K.A., Dash P.R., Read M.L., Ward K., Tomkins L.M., Nazarova O., Ulbrich K., Seymour L.W.* Influence of hydrophilicity of cationic polymers on the biophysical properties of polyelectrolyte complexes formed by self-assembly with DNA // Biochim. Bio-phys. Acta. 2000. V. 1475. №. 3. P. 245–255.
4. *Arguelles-Monal W., Cabrera G., Peniche C., Rinaudo M.* Conductimetric study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and polygalacturonic acid // Polymer. 2000. V. 41. №. 7. P. 2373–2378.
5. *Скорикова Е.Е., Калюжная Р.И., Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С., Котова С.Л., Агеев Е.П., Зезин А.Б., Кабанов В.А.* Свойства полиэлектролитных комплексов хитозана и полиакриловой кислоты // Высокомолек. соед. А. 1996. Т. 38. № 1. С. 61–65.
6. *Nermin A., Tulun T.* Investigation of interaction between poly(sodium phosphate) and p-aminobenzoic acid, hydrochloride // Eur. Polym. J. 2001. V. 37. № 4. P. 651–657.
7. *Webster L., Huglin M.B.* Complex formation between polyelectrolytes in dilute aqueous solution // Polymer. V. 38. № 6. P. 1373–1380.
8. *Beyer P., Nordmeier E.* Ultracentrifugation, viscosity, pH, and dynamic light scattering studies of complexation of ionene with poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) // Eur. Polym. J. 1999. V. 35. № 7. P. 1351–1365.
9. *Dragan S., Cristea M.* Influence of low-molecular-weight salts on the formation of polyelectrolyte complexes based on polycations with quaternary ammonium salt groups in the main chain and poly(sodium acrylate) // Eur. Polym. J. 2001. V. 37. P. 1571–1575.
10. *Зезин А.Б., Рудман А.Р., Венгерова Н.А., Калюжная Р.И., Валуева С.П., Копылова Е.М., Чепуров А.К., Ефимов В.С., Кабанов В.А.* Интерполимерные комплексы – биосовместимые полимерные материалы и проблема тромборезистентности // Журн. хим. физ. 1986. Т. 8. № 7. С. 788–801.
11. *Ouyang W.* Dispersed and deposited polyelectrolyte complexes and their interactions to chiral compounds and proteins. Doctoral dissertation. D.: Dresden University of Technology. 2009. P. 133.

12. *Вихорева Г.А., Бабак В.Г., Галич Е.Ф., Гальбрайт Л.С.* Комплексообразование в системе додецилсульфат натрия – хитозан // *Высокомолек. соед. А.* 1997. Т. 39. № 6. С. 947–952.
13. *Скоринова Е.Е., Вихорева Г.А., Калюжная Р.И., Зезин А.Б., Гальбрайт Л.С., Кабанов В.А.* Полиэлектролитные комплексы на основе хитозана // *Высокомолек. соед. А.* 1988. Т. 30. № 1. С. 44–49.
14. *Decher G., Hong J.D., Schmitt J.* Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively altering adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces // *Thin Solid Films.* 1992. V. 210–211. P. 831–835.
15. *Jaber, J., Schlenoff J.B.* Mechanical properties of reversibly cross-linked ultrathin polyelectrolyte complexes // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. № 9. P. 2940–2947.
16. *McShane M.J., Lvov Yu.M.* Layer-by-layer electrostatic self-assembly and biomaterial applications. *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology* // New York: American Scientific Publishers. 2004. P. 1–26.
17. *Arys X., Laschewsky A., Jonas A.M.* Ordered Polyelectrolyte “Multilayers”. 1. Mechanisms of growth and structure formation: a comparison with classical fuzzy “Multilayers” // *Macromolecules.* 2001. V. 34, P. 3318–3330.
18. *Mashl R. J., Grønbech-Jensen N.* Theoretical and experimental adsorption studies of polyelectrolytes on an oppositely charged surface // *J. Chem. Phys.* 1999. V. 110. № 4. P. 7627–7634.
19. *Schlenoff J. B., Dubas S.T.* Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution // *Macromolecules.* 2001, V. 34. P. 592–598.
20. *Castelnovo M., Joanny J.* Formation of Polyelectrolyte Multilayers // *Langmuir.* 2000. V. 16. P. 7524–7532.
21. *Berndt P., Kurihara K., Kunitake T.* Adsorption of poly(styrenesulfonate) onto ammonium monolayers on mica: a surface forces study // *Langmuir.* 1992. V. 8. № 10. P. 2486–2495.
22. *Kovacetic D., Burgh S., Keizer A., Cohen Stuart M.A.* Kinetics of formation and dissolution of weak polyelectrolyte multilayers: role of salt and free polyions // *Langmuir.* 2002. V. 18. № 14. P. 5607–5612.
23. *Собанов А.А., Бурнаева Л.М., Черкасов Р.А.* Полиэлектролиты. Методические указания к курсу Высокомолекулярные соединения. Казань: Казанский государственный университет. 2007. 35 с.
24. *Jandera P.* Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review // *Anal. Chim. Acta.* 2011. V. 692. P. 1–25.

25. *Ikegami T., Tomomatsu K., Takubo H., Horie K., Tanaka N.* Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1184. P. 474–503.
26. *Zhao G., Dong X., Sun Y.* Ligands for mixed-mode protein chromatography: Principles, characteristics and design // *J. Biotechnol.* 2009. V. 144. P. 3–11.
27. *Dong X., Wu R., Dong J., Wu M., Zhu Y., Zou H.* Recent progress of polar stationary phases in CEC and capillary liquid chromatography // *Electrophoresis.* 2009. V. 30. P. 141–154.
28. *Cheong W., Ali F., Kim Y.S., Lee J.W.* Comprehensive overview of recent preparation and application trends of various open tubular capillary columns in separation science // *J. Chromatogr. A.* 2013. V.1308.P. 1– 24.
29. *Miller M.D., Baker G.L., Bruening M.L.* Polymer-brush stationary phases for open-tubular capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1044. P. 323–330.
30. *Zhang X., Lin X., Chen Z., Wang X., Wu X., Xie Z.* Triamine-bonded stationary phase for open tubular capillary electrochromatography // *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33. P. 3184–3193.
31. *Lin X., Tan J., Xu S., Xie Z.* Phenylaminopropyl-functionalized stationary phase for open-tubular capillary electrochromatography of alkaloids and aromatic acids // *J. Sep. Sci.* 2011. V. 34. P. 2337–2344.
32. *Qiao J., Qi L., Ma H.* Open tubular CEC with novel block copolymer coatings for separation of aromatic amines // *J. Sep. Sci.* 2009. V. 32. P. 3936–3944.
33. *Jiang W., Fischer G., Girmay Y., Irgum K.* Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1127. P. 82–91.
34. *Lopes N.P., Collins K.E., Jardim I.C.S.F.* Microwave-immobilized polybutadiene stationary phase for reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1030.P. 225–229.
35. *Begnini F.R., Jardim I.C.S.F.* Preparation and characterization of a new microwave immobilized poly(2-phenylpropyl)methylsiloxane stationary phase for reversed phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1297. P. 113– 122.
36. *Faria A.M., Collins K.E., Collins C.H.* Preparation and characterization of poly(methyltetradecylsiloxane) stationary phases immobilized by gamma radiation onto zirconized silica // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1156. P. 51–59.
37. *Silva C.G.A., Collins C.H.* Stationary phases based on poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto titanized silica for high-performance liquid chromatography // *Microchem. J.* 2013. V.109. P. 150–157.

38. *Yun L., Xin X., Milton L., Jiping C.* Preparation and evaluation of hydrophilic C18 monolith sorbents for enhanced polar compound retention in liquid chromatography and solid phase extraction // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 8608–8616.
39. *Núñez O., Nakanishi K., Tanaka N.* Preparation of monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1191. P. 231–252.
40. *Svec F.* CEC: Selected developments that caught my eye since the year 2000 // *Electrophoresis.* 2009. V. 30. P. S68–S82.
41. *Jandera P.* Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis—A review // *J. Chromatogr. A.* 2013. V. 1313. P. 37–53.
42. *Jaeger W., Bohrisch J., Laschewsky A.* Synthetic polymers with quaternary nitrogen atoms—Synthesis and structure of the most used type of cationic polyelectrolytes // *Prog. Polym. Sci.* 2010. V. 35. P. 511–577.
43. *Williams S.R., Long T.E.* Recent advances in the synthesis and structure–property relationships of ammonium ionenes // *Prog. Polym. Sci.* 2009. V. 34. P. 762–782.
44. *Burmistr M.V., Sukhyy K.M., Shilov V.V., Pissis P., Spanoudaki A., Sukha I.V.* Synthesis, structure, thermal and mechanical properties of nanocomposites based on linear polymers and layered silicates modified by polymeric quaternary ammoniumsalts (ionenes) // *Polymer.* 2005. V. 46. P. 12226–12232.
45. *Chen L., Yu S., Kagami Y., Gong J., Osada Y.* Surfactant binding of polycations carrying charges on the chain backbone: cooperativity, stoichiometry and crystallinity // *Macromolecules.* 1998. V.31. P. 787–794.
46. *Pirogov A.V., Platonov M.M., Shpigun O.A.* Polyelectrolyte sorbents based on aliphatic ionenes for ion chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 850. P. 53–63.
47. *Pirogov A.V., Krokhin O.V., Platonov M.M., Deryugina Ya.I., Shpigun O.A.* Ion-chromatographic selectivity of polyelectrolyte sorbents based on some aliphatic and aromatic ionenes // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 884. P. 31–39.
48. *Krokhin O.V., Pirogov A.V., Shpigun O.A.* New high-performance techniques for ion-exchange separation // *J. Anal. Chem.* 2002. V. 57, № 10. P. 920–927.
49. *Krokhin O.V., Hoshino H., Shpigun O.A., Yotsuyanagi T.* Use of cationic polymers for the simultaneous determination of inorganic anions and metal-4-(2-pyridylazo)resorcinolato chelates in kinetic differentiation-mode capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* 1997. V. 776. P. 329–336.

50. *Raskop M.P., Grimm A., Seubert A.* Polystyrene immobilized ionenes as novel stationary phase for ion chromatography // *Microchim. Acta.* 2007. V. 158. P. 85–94.
51. *Nesterenko E.P., Nesterenko P.N., Paull B.* Zwitterionic ion-exchangers in ion chromatography: A review of recent developments // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 652. P. 3–21.
52. *Suzuki Y., Quina F.H., Berthod A., Williams R.W., Culha M., Mohammadzai I.U., Hinze W.L.* Covalently bound ionene polyelectrolyte-silica gel stationary phases for HPLC // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 1754–1765.
53. *Pirogov A.V., Buchberger W.* Ionene-coated sulfonated silica as a packing material in the packed-capillary mode of electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* 2001. V.916. P. 51–59.
54. *Znaleziiona J., Petr J., Knob R., Maier V., Svěcík J.* Dynamic Coating Agents in CE // *Chromatographia.* 2008. V. 67. P. S5–S12.
55. *Bendahl L., Hansen S.H., Gammelgaard B.* Capillaries modified by noncovalent anionic polymer adsorption for capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic capillary chromatography and capillary electrophoresis mass spectrometry // *Electrophoresis.* 2001. V. 22. P. 2565–2573.
56. *Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N.* Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 2254–2260.
57. *Liu C., Kang J.* Improved capillary electrophoresis frontal analysis by dynamically coating the capillary with polyelectrolyte multilayers // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1238. P. 146–151.
58. *Stalcup A.M., Agyei N.M.* Heparin: a chiral mobile-phase additive for capillary zone electrophoresis // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 3054–3059.
59. *Tachibana K., Ohnishi A.* Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 906. P. 127–154.
60. *Shen, J., Tomoyuki, I., Okamoto, Y.* Synthesis and application of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparation by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1363. P. 51–61.
61. *Ikai, T., Okamoto, Y.* Structure control of polysaccharide derivatives for efficient separation of enantiomers by chromatography // *Chem. Rev.* 2009. V. 109. P. 6077–6101.
62. *Wang Z., Liu J., Chen W., Bai Z.* Enantioseparation characteristics of bisector chiral stationary phases based on derivatives of cellulose and amylase // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1346. P. 57–68.
63. *Потехина Е.В., Шаповалова Е.Н., Лопатин С.А., Шнигун О.А.* Изучение удерживающей и разделяющей способности силикагеля, модифицированного хиральным селектором N-(3-

- сульфо, 3-карбоксо)-пропионилхитозаном // Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия. 2007. Т. 48. № 1. С. 43–48.
64. *Matsushita Y., Yasuda S.* Preparation of anion-exchange resins from pine sulfuric acid lignin, one of the acid hydrolysis lignins // *J. Wood Sci.* 2003. V. 49. P. 423–429.
65. *Chopabaeva N.N.* Modified lignin with ion-exchange properties // *Chemistry of Natural Compounds.* 2007. V. 43. №. 5. P. 598–602.
66. *Anirudhan T.S., Jalajamony S., Suchithra P.S.* Improved performance of a cellulose-based anion exchanger with tertiary amine functionality for the adsorption of chromium(VI) from aqueous solutions // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2009. V. 335. P. 107–113.
67. *Takayanagi T., Motomizu S.* Chitosan as cationic polyelectrolyte for the modification of electroosmotic flow and its utilization for the separation of inorganic anions by capillary zone electrophoresis // *Anal. Sci.* 2006. V.22. P. 1241–1244.
68. *Буданова Н.Ю., Шаповалова Е.Н., Штигун О.А.* Изучение возможности использования хитозана в капиллярном электрофорезе // Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия. 2006. Т.47. №3. С. 177–181.
69. *Huang D., Yang Q., Jin S., Deng Q., Zhou P.* Self-assembly of cellulose nanoparticles as electrolyte additive for capillary electrophoresis separation // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1367. P. 148–153.
70. *M. Lämmerhofer, A. Gargano.* Monoliths with chiral surface functionalization for enantioselective capillary electrochromatography // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. V. 53. P. 1091–1123.
71. *Geryk R., Kalíková K., Vozka J., Plecítá D., Schmid M.G., Tesárov E.* Enantioselective potential of chiral stationary phases based on immobilized polysaccharides in reversed phase mode // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1363. P. 155–161.
72. *Amin N.C., Blanche M.-D., Aké M., Fabre H.* Capillary electrophoresis methods for the analysis of antimalarials. Part I. Chiral separation methods // *J. Chromatogr. A.* 2012, V. 1264, P. 1–12.
73. *Lucy C.A., MacDonald A.M., Gulcev M.D.* Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1184. P. 81–105.
74. *Du Y., Taga A., Suzuki S., Liu W., Honda S.* Colominic acid: a novel chiral selector for capillary electrophoresis of basic drugs // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 962. P. 221–231.
75. *García-Cañas V., Simó C., Castro-Puyana M., Cifuentes A.* Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and foodomics // *Electrophoresis.* 2014. V. 35. № 1. P. 147–169.

76. *Kihm Z.D., Veen E.M., Bergen-Hartigan J.D., Zhang Y., Li Y.* Modification of electroosmotic flow for a polydimethylsiloxane electrophoresis microchip via polyelectrolyte coating // *Anal. Sci.* 2012. V.28. P. 183–186.
77. *Budanova N., Shapovalova E., Lopatin S., Varlamov V., Shpigun. O.* N-(3-Sulfo, 3-carboxy)-propionylchitosan as new chiral selector for enantioresolution of basic drugs by capillary electrophoresis // *Chromatographia.* 2004. V. 59. P. 709–713.
78. *Буданова Н., Шамиурин Д., Шаповалова Е.* Высокомолекулярный сульфат декстрана как хиральный селектор в капиллярном электрофорезе // *Материалы X Международной Конференции “Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбции и хроматографии”.* 2006. С.386–390.
79. *Nishi H., Kuwahara Y.* Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing noncyclic mono-, oligo- and polysaccharides as chiral selectors // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2001. V. 48. P. 89–102.
80. *Yang G.S., Chen D.M., Yang Y., Tang B., Gao J.J., Aboul-Enein H.Y., Koppenhoefer B.* Enantioseparation of some clinically used drugs by capillary electrophoresis using sulfated  $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector // *Chromatographia.* 2005. V. 62. P. 441–445.
81. *Yokoyama S., Hayashi R., Kikkawa T., Tani N., Takada S., Hatanaka K., Yamamoto A.* Specific sorbent of apolipoprotein B-containing lipoproteins for plasmapheresis. Characterization and experimental use in hypercholesterolemic rabbits // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1984.V. 4. P. 276–282.
82. *Suzuki N., Otuka I., Harada T., Mizushima Y., Sakane T.* Preferential adsorption of cationic anti-Dna antibodies with immobilized polyanionic compounds, dextran sulfate // *Autoimmunity.* 1994. V. 19. P. 105–112.
83. *Padivitage N.L.T., Armstrong D.W.* Sulfonated cyclofructan 6 based stationary phase for hydrophilic interaction chromatography // *J.Sep. Sci.* 2011. V. 34. P. 1636–1647.
84. *Kozlik P., Simova V., Kalikova K., Bosakova Z., Armstrong D., Tesarova E.* Effect of silica gel modification with cyclofructants on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases // *J. Chromatogr. A.* 2012. V.1257. P. 58–65.
85. *Guo Z., Jina Y., Liang T., Liu Y., Xu Q., Liang X., Lei A.* Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed mode of a “Click  $\beta$ -cyclodextrin” stationary phase // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 257–263.
86. *Takeuchi T., Safni, Miwa T.* Ion chromatography of anions on stationary phases modified with chondroitin sulfate // *J. Chromatogr. A.* 1997. V.789. P. 201–206.

87. *Safni, Ito N., Takeuchi T., Miwa T.* Separation of enantiomers on anion exchangers modified with heparin in liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 864. P. 25–30.
88. *Takeuchi T., Safni, Miwa T., Hashimoto Y., Moriyama H.* Ion chromatography on anion exchangers modified with mucopolysaccharides. // *J. Chromatogr. A* 1998, 804, 79–86.
89. *Takeuchi T., Safni, Miwa T., Hashimoto Y., Moriyama H.* Ion chromatography using anion-exchangers modified with dextran sulfate // *Chromatographia.* 1999. V. 50. № 1/2. P. 70–74.
90. *Safni, Takeuchi T., Miwa T., Hashimoto Y., Moriyama H.* Effect of eluent composition on retention behavior of anions in ion chromatography on anion-exchangers modified with heparin // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 850. P. 65–72.
91. *Изумрудов В.А.* Растворимые полиэлектролитные комплексы биополимеров // *Высокомолек. соед. Серия А.* 2012. Т. 54. № 7. С. 1086–1094.
92. *Dios A.S., Díaz-García M.E.* Multifunctional nanoparticles: analytical prospects // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 666. P. 1–22.
93. *Navarro-Pascual-Ahuir M., Lerma- García M.J., Ramis-Ramos G., Simó-Alfonso E.F., Herrero-Martínez J.M.* Preparation and evaluation of lauryl methacrylate monoliths with embedded silver nanoparticles for capillary electrochromatography // *Electrophoresis.* 2013. V. 34. № 6. P. 925–934.
94. *Sun Y., He K., Zhang Z., Zhou A., Duan H.* Real-time electrochemical detection of hydrogen peroxide secretion in live cells by Pt nanoparticles decorated graphene–carbon nanotube hybrid paper electrode // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 68. P. 358–364.
95. *Ma Z., Wang J., Li J., Wang N., An C., Sun L.* Propane dehydrogenation over Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported Pt nanoparticles: effect of cerium addition // *Fuel Process. Technol.* 2014. V. 128. P. 283–288.
96. *Jeevitha D., Amarnath K.* Chitosan/PLA nanoparticles as a novel carrier for the delivery of anthraquinone: Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2013. V.10. P. 126–134.
97. *Dobrovolskaia M.A., Patri A.K., Zheng J., Clogston J.D., Ayub N., Aggarwal P., Neun B.W., Hall J.B., McNeil S.E.* Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles // *Nanomedicine: N.B.M.* 2009. V. 5. P. 106–117.
98. *Wu C., Liu F., Ko F.* Potential role of gold nanoparticles for improved analytical methods: an introduction to characterizations and applications // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 399. P. 103–118.
99. *Schmid G., Chi L.F.* Metal clusters and colloids // *Adv. Mater.* 1998. V. 10. P. 515–526.



100. *Pham T., Jackson J.B., Halas N.J., Lee T.R.* Preparation and characterization of gold nanoshells coated with self-assembled monolayers // *Langmuir*. 2002. V. 18. P. 4915–4920.
101. *Daniel M.-C., Astruc D.* Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology // *Chem. Rev.* 2004. V. 104. № 1. P. 293–346.
102. *Westerlund F., Bjørnholm T.* Directed assembly of gold nanoparticles // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2009. V. 14. P. 126–134.
103. *Shan C., Li F., Yuan F., Yang G., Niu L., Zhang Q.* Size-controlled synthesis of monodispersed gold nanoparticles stabilized by polyelectrolyte-functionalized ionic liquid // *Nanotechnology*. 2008. V. 19. P. 1–6.
104. *Kuo P.L., Chen C.C., Jao M.W.* Effects of polymer micelles of alkylated polyethylenimines on generation of gold nanoparticles // *J. Phys. Chem. B.* 2005. V. 109. № 19. P. 9445–9450.
105. *Ishii T., Otsuka H., Kataoka K., Nagasaki Y.* Preparation of functionally PEGylated gold nanoparticles with narrow distribution through autoreduction of auric cation by  $\alpha$ -biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate)] // *Langmuir*. 2004. V. 20. P. 561–564.
106. *Esumi K., Takei N., Yoshimura T.* Antioxidant-potentiality of gold-chitosan nanocomposites // *Colloids Surf. B.* 2003. V. 32. P. 117–123.
107. *Mahouche-Chergui S., Guerrouache M., Carbonnier B., Chehimi M.M.* Polymer-immobilized nanoparticles // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2013. V. 439. P. 43–68.
108. *Nesterenko E.P., Nesterenko P.N., Connolly D., He X., Floris P., Duffyc E., Paull B.* Nano-particle modified stationary phases for high-performance liquid chromatography // *Analyst*. 2013. V. 138. P. 4229–4254.
109. Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии // Под ред. Лисичкина Г.В. М.: Химия. 1986. 286 с.
110. *Pena-Pereira F., Duarte R.M.B.O., Duarte A.C.* Immobilization strategies and analytical applications for metallic and metal-oxide nanomaterials on surfaces // *Trend. Anal. Chem.* 2012, V. 40. P. 90–105.
111. *Fenga J., Suna M., Liua H., Li J., Liu X., Jiang S.* Au nanoparticles as a novel coating for solid-phase microextraction // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. P. 8079–8086.
112. *Cao Q., Xu Y., Liu F., Svec F., Fréchet J.M.J.* Polymer monoliths with exchangeable chemistries: use of gold nanoparticles as intermediate ligands for capillary columns with varying surface functionalities // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 7416–7421.

113. *Inuta M., Arakawa R., Kawasaki H.* Use of thermally annealed multilayer gold nanoparticle films in combination analysis of localized surface plasmon resonance sensing and MALDI mass spectrometry // *Analyst*. 2011. V. 136. P. 1167–1176.
114. *Krenkova J., Foret F.* Iron oxide nanoparticle coating of organic polymer-based monolithic columns for phosphopeptide enrichment // *J. Sep. Sci.* 2011. V. 34. P. 2106–2112.
115. *Hilder E.F., Svec F., Fréchet J.M.J.* Latex-functionalized monolithic columns for the separation of carbohydrates by micro anion-exchange chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2004. V.1053. № 1–2, P. 101–106.
116. *Byrappa K., Adschiri T.* Hydrothermal technology for nanotechnology // *Prog. Cryst. Grow. Ch. Mater.* 2007. V. 53. № 2. P. 117–166.
117. *Liu F.* Analysis and applications of nanoparticles in the separation sciences: a case of gold nanoparticles // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. P. 9034–9047.
118. *Sykora D., Kasicka V., Miksik I., Režanka P., Zaruba K., Matejka P., Kral V.* Application of gold nanoparticles in separation sciences // *J. Sep. Sci.* 2010. V. 33. P. 372–387.
119. *Neiman B., Grushka E., LevO.* Use of gold nanoparticles to enhance capillary electrophoresis // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 5220–5227.
120. *Zhang Z., Li X., Ge A., Zhang F., Sun X., Li X.* High selective and sensitive capillary electrophoresis-based electrochemical Immunoassay enhanced by gold nanoparticles // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 41. P. 452–458.
121. *Wanga J., Yanga Z., Wang X., Yang N.* Capillary electrophoresis with gold nanoparticles enhanced electrochemiluminescence for the detection of roxithromycin // *Talanta*. 2008. V. 76. P. 85–90.
122. *Chiou S.H., Huang M.F., Chang H.T.* Separation of double-stranded DNA fragments by capillary electrophoresis: Impacts of poly(ethylene oxide), gold nanoparticles, ethidium bromide, and pH // *Electrophoresis*. 2004. V. 25. P. 2186–2192.
123. *Poinsot V., Carpené M., Bouajila J., Gavard P., Feurer B., Couderc F.* Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2012. V. 33. P. 14–35.
124. *Yang L., Chen C., Liu X., Shi J., Wang G., Zhu L., Guo L., Glennon J.D., Scully N.M., Doherty B.E.* Use of cyclodextrin-modified gold nanoparticles for enantioseparations of drugs and amino acids based on pseudostationary phase-capillary electrochromatography // *Electrophoresis*. 2010. V. 31. P. 1697–1705.
125. *Poinsot V., Ong-Meang V., Gavard P., Couderc F.* Recent advances in amino acid analysis by capillary electromigration methods, 2011-2013// *Electrophoresis*. 2014. V. 35. P. 50–68.

126. *Fana D., Yuana S., Shen Y.* Surface modification with BSA blocking based on in situ synthesized gold nanoparticles in poly(dimethylsiloxane) microchip // *Colloids and Surf. B: Biointerfaces*. 2010. V. 75. P. 608–611.
127. *Wang A., Xu J., Zhang Q., Chen H.* The use of poly(dimethylsiloxane) surface modification with gold nanoparticles for the microchip electrophoresis // *Talanta*. 2006. V. 69. P. 210–215.
128. *Hu W., Hong T., Gao X., Ji Y.* Applications of nanoparticle-modified stationary phases in capillary electrochromatography // *Trend. Anal. Chem.* 2014. V. 61. P. 29–39.
129. *Guihen E., Glennon J.D.* Nanoparticles in Separation Science—Recent Developments // *Anal. Let.* 2003. V. 36 № 15. P. 3309–3336.
130. *Ivanov M.R., Bednar H.R., Haes A.J.* Investigations of the mechanism of gold nanoparticle stability and surface functionalization in capillary electrophoresis // *ACS Nano*. 2009. V. 3. № 2. P. 386–394.
131. *Li M., Liu X., Jiang F., Guo L., Yang L.* Enantioselective open-tubular capillary electrochromatography using cyclodextrin-modified gold nanoparticles as stationary phase // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. P. 3725–3729.
132. *Ye F.G., Lu J.U., Wang Y., Zhang A.Z., Tian J.N., Zhao S.L.* Preparation and characterization of gold nanoparticle-modified silica monolith for capillary electrochromatography // *Chin. J. Anal. Chem.* 2011. V. 39. P. 341–345.
133. *Nilsson C., Birnbaum S., Nilsson S.* Use of nanoparticles in capillary and microchip electrochromatography // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1168. P. 212–224.
134. *Gross G.M., Nelson D.A., Grate J.W., Synovec R.E.* Monolayer-protected gold nanoparticles as a stationary phase for open tubular gas chromatography // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. P. 4558–4564.
135. *Gross G.M., Grate J.W., Synovec R.E.* Development and evaluation of gold-centered monolayer protected nanoparticle stationary phases for gas chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1060. P. 225–236.
136. *Gross G.M., Grate, J.W., Synovec R.E.* Monolayer-protected gold nanoparticles as an efficient stationary phase for open tubular gas chromatography using a square capillary model for chip-based gas chromatography in square cornered microfabricated channels // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1029. P. 185–192.
137. *Qu Q.S., Shen F., Shen M., Hu X., Yang G., Wang C., Yan C., Zhang Y.* Open-tubular gas chromatography using capillary coated with octadecylamine-capped gold nanoparticles // *Anal. Chim. Acta*. 2008. V. 609. № 1. P. 76–81.

138. *Ortiz Y., Cintron J.M., Colon L.A.* Gold coated SiO<sub>2</sub> modified with self-assembled monolayers as a potential stationary phase for liquid chromatography // *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 221. № 1–2. P. U74–U80.
139. *Kobayashi K., Kitagawa S., Ohtani H.* Development of capillary column packed with thiol-modified gold-coated polystyrene particles and its selectivity for aromatic compounds // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1110. P. 95–101.
140. *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 // *J. Chin. Chem. Soc.* 2003. V. 50. P. 931–937.
141. *Qu Q.S., Peng S.W., Mangelings D., Hu X.Y., Yan C.* Silica spheres coated with C18-modified gold nanoparticles for capillary LC and pressurized CEC separations // *Electrophoresis.* 2010. V. 31. P. 556–562.
142. *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. V. 1198. P. 95–100.
143. *Lv Y., Alejandro F.M., J. Frechet J.M., Svec F.* Preparation of porous polymer monoliths featuring enhanced surface coverage with gold nanoparticles. *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1261. P. 121–128.
144. *Walsh Z., Paull B., Macka M.* Inorganic monoliths in separation science: a review // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 750. P. 28–47.
145. *Arrua R.D., Talebi M., Causon T.J., Hilder E.F.* Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 738. № 13. P. 1–12.
146. *Lv Y., Lin Z., Svec F.* “Thiol–ene” click chemistry: a facile and versatile route for the functionalization of porous polymer monoliths // *Analyst.* 2012. V. 137. P. 4114–4118.
147. *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, V. 84. P. 8457–8460.
148. *Jiang B., Liang Y., Wu Q., Jiang H., Yang K., Zhang L., Liang Z., Peng X., Zhang Y.* New GO–PEI–Au–L–Cys ZIC–HILIC composites: synthesis and selective enrichment of glycopeptides // *Nanoscale.* 2014. V. 6. P. 5616–5619.
149. *Полякова Я.А.* Новые наногибридные функциональные материалы для ВЭЖХ на основе наночастиц золота. Диссертация на соискание ученой степени к.х.н. Москва. 2012. 190 с.

150. *Shapovalova E.N., Ananieva I.A., Majouga A.G., Zik N.V., Shpigun O.A.* Use of gold nanoparticles for immobilization of L-cysteine on TLC plates // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2009. V. 64. P. 159–164.
151. *Elfimova Y.A., Pichugina D.A., Anan'eva I.A., Mazhuga A.G., Shpigun O.A.* Regularities of the retention of aminopyridines by silica gel modified with gold nanoparticles // *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2012. V. 86. P.1623–1629.
152. *Majouga A., Pichugina D., Ananieva I., Kurilova S., Shpigun O., Kuz'menko N., Zyk N.* New separation materials based on gold nanoparticles // *J. Manuf. Tech. Manag.* 2010. V. 21. № . P. 950–955.
153. *Шаповалова Е.Н., Ананьева И.А., Елфимова Я.А., Л.А. Гринева, Мажуга А.Г., Шпигун О.А.* Разделение азотсодержащих соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на силикагеле, модифицированном наночастицами золота, стабилизированными хитозаном // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия.* 2012. Т.53. №2. С. 108–114.
154. *Hing-Biu L., Kurtis S., Peart T.E.* Determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta_2$  agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1148. P. 158–167.
155. *Marko V.* Determination of beta-blockers in biological material // Elsevire science publishers B.V., Amsterdam, 1989. P. 333.
156. *Pujos E., Olive-Cren C., Paisse O., Waton-Flament M.M., Loustalot-Grenier M.F.* Comparison of the analysis of  $\beta$ -blockers by different techniques // *J. Chromatogr. B.* 2009. V. 877. P. 4007–4014.
157. *Baciu T., Borrull F., Aguilar C., Calull M.* Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 856. P. 1–26.
158. *Suntornsuk L.* Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 398. P. 29–52.
159. *Kitagawa F., Otsuka K.* Recent progress in capillary electrophoretic analysis of amino acid enantiomers // *J. Chromatogr. B.* 2011. V. 879. P. 3078– 3095.
160. *Schappeler J., Staub A., Veuthey J., Rudaz S.* Highly sensitive detection of pharmaceutical compounds in biological fluids using capillary electrophoresis coupled with laser-induced native fluorescence // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1204. P. 183–190.
161. *Kumar A.P., Park J.H.* Azithromycin as a new chiral selector in capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 9. P. 1314–1317.

162. *Lu M., Zhang L., Qiu B., Feng Q., Xia S., Chen G.* Rapid separation and sensitive detection method for  $\beta$ -blockers by pressure-assisted capillary electrochromatography-electrospray ionization mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1193. P. 156–163.
163. *Zaidi S.A., Han K.M., Hwang D.G., Cheong W.J.* Preparation of open tubular molecule imprinted polymer capillary columns with various templates by a generalized procedure and their chiral and non-chiral separation performance in CEC // *Electrophoresis.* 2010. V. 31. P. 1019–1028.
164. *Aranas A.T., Guidote A.M., Haddada P.R., Quirino J.P.* Sweeping–micellar electrokinetic chromatography for the simultaneous analysis of tricyclic antidepressant and  $\beta$ -blocker drugs in wastewater // *Talanta.* 2011. V. 85. P. 86–90.
165. *Wang Y., Wu Q., Cheng M., Cai C.* Determination of  $\beta$ -blockers in pharmaceutical and human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection and studies on the pharmacokinetics // *J. Chromatogr. B.* 2011. V. 879. P. 871–877.
166. *Zhu F., Chen Y.J., Chen B., Zhu Y., Zhai X., Xu S., Zhou W.* Enantioselective separation of basic drugs by CE with polygalacturonic acid as a novel chiral selector // *Chromatographia.* 2009. V. 69. P. 1315–1320.
167. *Xu G., Du Y., Chen B., Chen J.* Investigation of the enantioseparation of basic drugs with erythromycin lactobionate as a chiral selector in CE // *Chromatographia.* 2010. V. 72. P. 289–295.
168. *Albero B., Sánchez-Brunete C., Miguel E., Aznar R., Tadeo J.L.* Determination of selected pharmaceutical compounds in biosolids by supported liquid extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1336. P. 52–58.
169. *Schwaninger A.E., Meyer M.R., Maurer H.H.* Chiral drug analysis using mass spectrometric detection relevant to research and practice in clinical and forensic toxicology // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1269. P. 122–135.
170. *Angel-Ruiz M.J., Lapasio-Torres J.R., Broch-Carda S., Coque-Alvarez-Garcia M.C.* Performance of short-chain alcohols versus acetonitrile in the surfactant-mediated reversed-phase liquid chromatography separation of  $\beta$ -blockers // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. P. 7090–7099.
171. *Tonga S., Zhenga Y., Yana J., Guan Y., Wua C., Lei W.* Preparative enantioseparation of  $\beta$ -blocker drugs by counter-current chromatography using dialkyl l-tartrate as chiral selector based on borate coordination complex // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1263. P. 74–83.
172. *Dubbelman A., Cuyckens F., Dillen L., Gross G., Hankemeier T., Vreeken R.J.* Systematic evaluation of commercially available ultra-high performance liquid chromatography columns for drug metabolite profiling: optimization of chromatographic peak capacity // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1374. P. 122–133.

173. *Perrenoud A.G., Veuthey J.L., Guillarme D.* Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1266. P. 158–167.
174. *Perrenoud A.G., Farrell W.P., Aurigemma C.M., Aurigemma N.C., Fekete S., Guillarme D.* Evaluation of stationary phases packed with superficially porous particles for the analysis of pharmaceutical compounds using supercritical fluid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1360. P. 275–287.
175. *Desfontaine V., Guillarme D., Francotte E., Nováková L.* Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 113. P. 56–71.
176. *Caban M., Stepnowski P., Kwiatkowski M., Migowska N., Kumirska J.* Determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta$ -agonists using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry – a comparative study of the derivatization step // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 8110–8122.
177. *Magiera S., Uhlschmied C., Rainer M., Huck Ch. W., Baranowska I., Bonn G.K.* GC-MS method for the simultaneous determination of  $\beta$ -blockers, flavonoids, isoflavonoids and their metabolites in human urine // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 56. P. 93–102.
178. *Lee C.H., Shin Y., Nam M.W., K.M. Jeong, Lee J.* A new analytical method to determine non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water using in situ derivatization combined with ultrasound-assisted emulsification microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry // *Talanta.* 2014. V. 129. P. 552–559.
179. *Yu Y., Wu L.* Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry // *Talanta.* 2012. V. 89. P. 258–263.
180. *Lacina P., Mravcova L., Vavrova M.* Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection for the analysis of selected drug residues in wastewater and surface water // *J. Environ. Sci.* 2013. V. 25. P. 204–212.
181. *Vazquez P.P., Galera M.M., Guirado A.S., Vazquez M.M.* Determination of five beta-blockers in wastewaters by coupled-column liquid chromatography and fluorescence detection // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 666. P. 38–44.
182. *Lee H., Sarafin K., Peart T.E.* Determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta_2$ -agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1148. P. 158–167.
183. *Evans S.E., Davie S.P., Lubben A., Kasprzyk-Hordern B.* Determination of chiral pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and sludge using microwave assisted extraction, solid-phase

- extraction and chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta*. 2015. V. 882. P. 112–126.
184. *Mitrowska K., Posyniak A., Zmudzki J.* Rapid method for determination of tranquilizers and  $\beta$ -blockers in porcine and bovine kidney by liquid chromatography with tandem mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta*. 2009. V. 637. P. 185–192.
185. *Flores J.R., Salcedo A.M.C., Fernández L.M.* Rapid HPLC Method for monitoring relevant residues of pharmaceuticals products in environmental samples // *Am. J. Anal. Chem.* 2011. V. 2. P. 18–26.
186. *Biswas A.K., Rao G.S., Kondaiah N., Anjaneyulu A.S.R., Malik J.K.* Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprim and sulfonamide residues in buffalo meat by high-performance liquid chromatography // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. P. 8845–8850.
187. *Akla M.A., Ahmed M.A., Ramadan A.* Validation of an HPLC-UV method for the determination of ceftriaxone sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 55. P. 247–252.
188. *Milenović D.M., Todorović Z.B.* Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for analysis of nimesulide residues on manufacturing equipment surfaces // *Acta Chromatographica*. 2009. V. 21. № 4. P. 603–618.
189. *Baranowska I., Magiera S., Baranowski J.* UPLC method for the determination of  $\beta$ -blockers, isoflavones and their metabolites in human urine // *J. Chromatogr. B*. 2011. V. 879. P. 615–626.
190. *Guo C., Shi F., Gong L., Tan H., Hu D., Zhang J.* Ultra-trace analysis of 12  $\beta_2$ -agonists in pork, beef, mutton and chicken by ultrahigh-performance liquid chromatography–quadrupole-orbitrap tandem mass spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 107. P. 526–534.
191. *Amundsen I., Øiestad M.L., Ekeberg D., Kristoffersen L.* Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B*. 2013. V. 927. P. 112–123.
192. *Bottoni P., Caroli S.* Detection and quantification of residues and metabolites of medicinal products in environmental compartments, food commodities and workplaces. A review // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 106. P. 3–24.
193. *Pereira D.M., Valentão P., Pereir J.A., Andrade P.B.* Phenolics: from chemistry to biology, molecules. 2009. V. 14. P. 2202–2211.



194. *Castellano G.* Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *Posidonia Oceanica* (L.) Delile // *MATCH Commun. Math. Comput. Chem.* 2012. 67. P. 231–250.
195. *Tatiana S.F., Fernando G.T., Marina F.M.* Optimization of a method of determination of phenolic acids in exotic fruits by capillary electrophoresis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. V. 51. P. 430–438.
196. *Медведева О.М.* Определение фенолкарбоновых кислот методом капиллярного зонного электрофореза и спектроскопии диффузного отражения после сорбционного концентрирования. Дисс. канд. хим. наук. Москва. 2004 г. 180 с.
197. *Pomaynt M.* Анализ пищевых продуктов. Введение и способы решения прикладных задач // Фирма «ХьюлеттПаккард», Германия, 1994. Публ. 5963–2317Е. Пер. Б.П. Лапина, 2000. С. 99.
198. *Iris L.S.L., Boyce M.C., Breadmore M.C.* A rapid quantitative determination of phenolic acids in *Brassica oleracea* by capillary zone electrophoresis // *Food Chem.* 2011. V. 127. P. 797–801.
199. *Abu Bakar N.B., Makahleh A., Saad B.* In-vial liquid-liquid microextraction-capillary electrophoresis method for the determination of phenolic acids in vegetable oils // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 742. P. 59–66.
200. *Liu F.J, Ding G.S., Tang A.N.* Simultaneous separation and determination of five organic acids in beverages and fruits by capillary electrophoresis using diamino moiety functionalized silica nanoparticles as pseudostationary phase // *Food Chem.* 2014. V. 145. P. 109–114.
201. *Hurtado-Fernandez E., Contreras-Gutierrez P., Cuadros-Rodriguez L., Carrasco-Pancorbo A., Fernandez-Gutierrez A.* Merging a sensitive capillary electrophoresis-ultraviolet detection method with chemometric exploratory data analysis for the determination of phenolic acids and subsequent characterization of avocado fruit // *Food Chem.* 2013. V. 141. P. 3492–350.
202. *Verardo V., Gomez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Caboni M.F., Fernández-Gutiérrez A.* Development of a CE-ESI-microTOF-MS method for a rapid identification of phenolic compounds in buckwheat // *Electrophoresis.* 2011. V. 32. P. 669–673.
203. *Fonseca F.N., Tavares M.F.M., Horváth C.* Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita* // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1154. P. 390–399.
204. *Aturki Z., Fanali S., D'Orazio G., Rocco A., Rosati C.* Analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oil by using reversed-phase capillary electrochromatography // *Electrophoresis.* 2008. V. 29. P. 1643–1650.

205. *Lei W., Zhanga L., Wana L., Shib B., Wang Y., Zhang W.* Hybrid monolithic columns with nanoparticles incorporated for capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1239. P. 64–71.
206. *Risso E.M., Pe´res R.G., Amaya-Farfan J.* Determination of phenolic acids in coffee by micellar electrokinetic chromatography // *Food Chem.* 2007. V. 105. P. 1578–1582.
207. *Ganzera M., Egger C., Zidorn C., Stuppner H.* Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana L.* by micellar electrokinetic capillary chromatography // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 614. P. 196–200.
208. *Porgali E., Buyuktuncel E.* Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods // *Food Res. Int.* 2012. V. 45. P. 145–154.
209. *Nardini M., Ghiselli A.* Determination of free and bound phenolic acids in beer // *Food Chem.* 2004. V. 84. P. 137–143.
210. *Saraji M., Mousavi F.* Use of hollow fibre-based liquid-liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of phenolic acids in fruit juices // *Food Chem.* 2010. V. 123. P. 1310–1317.
211. *Natividade M.M., Corrêa L.C., de Souza S.V.C., Pereira G.E., de Oliveira Lima L.C.* Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: method validation and characterization of São Francisco Valley samples // *Microchem. J.* 2013. V. 110. P. 665–674.
212. *Lino C.M., Pena A.* Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment // *Food Chem.* 2010. V. 121. P. 503–508.
213. *Liang Y., Cao W., Chen W., Xiao X., Zheng J.* Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography using electrochemical detection // *Food Chem.* 2009. V. 114. P. 1537–1541.
214. *Mas S., Fonrodona G., Tauler R., Barbosa J.* Determination of phenolic acids in strawberry samples by means of fast liquid chromatography and multivariate curve resolution methods // *Talanta.* 2007. V. 71. P. 1455–1463.
215. *Ostrowski W., Wojakowska A., Grajzer M., Stobiecki M.* Mass spectrometric behavior of phenolic acids standards and their analysis in the plant samples with LC/ESI/MS system // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 967. P. 21–27.
216. *Ginjom I., D’Arcy B., Caffin N., Gidley M.* Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process // *Food Chem.* 2011. V. 125. P. 823–834.

217. *Van Hung P., Hatcher D.W., Barker W.* Phenolic acid composition of sprouted wheats by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and their antioxidant activities // *Food Chem.* 2011. V. 126. P. 1896–1901.
218. *Zhou W., Liu S., Ju W., Shan J., Meng M., Cai B., Di L.* Simultaneous determination of phenolic acids by UPLC-MS/MS in rat plasma and its application in pharmacokinetic study after oral administration of Flos Lonicerae preparations // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. V. 86. P. 189–197.
219. *Flores M.I.A., Romero-González R., Frenich A.G., Vidal J.L.M.* Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Food Chem.* 2012. V. 134. P. 2465–2472.
220. *Klejdus B., Vacek J., Lojková L., Beněšová L., Kubě V.* Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1195. P. 52–59.
221. *Zygler A., Wasik A., Namiesńnik J.* Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs // *Trend. Anal. Chem.* 2009. V. 28. № 9. P. 1082–1102.
222. *Lia Y., Li J., Chena T., Liu X., Zhang H.* Covalently bonded polysaccharide-modified stationary phase for per aqueous liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 1503–1508.
223. *Huang Y., Tian Y., Zhang Z., Peng C.* A HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of seven organic acids in rat urine as biomarkers of exposure to realgar // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 905. P. 37–42.
224. *Lia D., Dück R., Schmitz O.J.* The advantage of mixed-mode separation in the first dimension of comprehensive two-dimensional liquid-chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1358. P. 128–135.
225. *Geng X., Zhang S., Wang Q., Zhao Z.* Determination of organic acids in the presence of inorganic anions by ion chromatography with suppressed conductivity detection // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1192. P. 187–190.
226. *Zhua Y., Guo Y., Ye M., James F.S.* Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1085. P. 143–146.
227. *Mancinelli V., Rinaldi M., Finessi E., Emblico L., Mircea M., Fuzzi S., Facchini M.C., Decesari S.* An anion-exchange high-performance liquid chromatography method coupled to total organic carbon determination for the analysis of water-soluble organic aerosols // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1149. P. 385–389.

228. *Lu S., Sun X., Shi C., Zhang Y.* Determination of tricarboxylic acid cycle acids and other related substances in cultured mammalian cells by gradient ion-exchange chromatography with suppressed conductivity detection // *J. Chromatogr. A.* 2003.V. 1012. P. 161–168.
229. *Dong C., Wang W.* Headspace solid-phase microextraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in beverages // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 562. P. 23–29.
230. *Citová I., Sladkovský R., Solich P.* Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction–gas chromatography // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 573–574. P. 231–241.
231. *Shrivastava K., Wu H.* Rapid determination of caffeine in one drop of beverages and foods using drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1170. P. 9–11.
232. *Farajzadeh M.A., Nouri N., Khorram P.* Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography // *Trends Anal. Chem.* 2014. V. 55. P. 14–23.
233. *Wang C., Zuo Y.* Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography-mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products // *Food Chem.* 2011. V. 128. P. 562–568.
234. *Peters S., Kaal E., Horstingd I., Janssen H.G.* An automated method for the analysis of phenolic acids in plasma based on ion-pairing micro-extraction coupled on-line to gas chromatography/mass spectrometry with in-liner derivatisation // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1226. P. 71–76.
235. *Muñoz-González C., Moreno-Arribas M.V., Rodríguez-Bencomo J.J., Cueva C., Martín P.J., Álvarez, Bartolomé B., Pozo-Bayón M.A.* Feasibility and application of liquid–liquid extraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of phenolic acids from grape polyphenols degraded by human faecal microbiota // *Food Chem.* 2012. V. 133. P. 526–535.
236. *Paravisini L., Prot A., Gouttefangeas C., Moretton C., Nigay H., Dacremont C., Guichard E.* Characterisation of the volatile fraction of aromatic caramel using heart-cutting multidimensional gas chromatography // *Food Chem.* 2015. V. 167. P. 281–289.
237. *De la Torre-Carbot K., Jauregui O., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., Covas M.-I., Casals I., López-Sabater M.C.* Rapid high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of virgin

- olive oil phenolic metabolites in human low-density lipoproteins // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1116. P. 69–75.
238. Wasik A., McCourt J., Buchgraber M. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection—Development and single-laboratory validation // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1157. P. 187–196.
239. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия. 1979. 480 с.
240. Kubelka P., Munk F. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche // *Z. Tech. Phys.* 1931. V. 12. P. 593–601.
241. Кортюм Г., Браун В., Герцог Г. Принципы и методика измерения в спектроскопии диффузного отражения // *Успехи физ. наук.* 1965. Т. 85. № 2. С. 365–380.
242. Vargas W.E., Niklasson G.A. Applicability conditions of the Kubelka–Munk theory // *Applied Optics.* 1997. V. 36. № 22. P. 5580–5586.
243. Химия привитых поверхностных соединений. / Под ред. Г.В. Лисичкина. М.: Физ-матлит. 2003. С. 592.
244. Brust O.E., Sebestian I., Halasz I. Si---N= bonded stationary phases for liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1973. V. 83. P. 15–24.
245. Horvath C.G., Preiss B.A., Lipsky S.R. Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers // *Anal. Chem.* 1967. V. 39. P. 1422–1428.
246. Telysheva G., Dizhbite T., Paegle E., Shapatin A., Demidov I. Surface-Active properties of hydrophobized derivatives of lignosulfonates: effect of structure of organosilicon modifier // *J. Appl. Polym. Sci.* 2001. V. 82. P. 1013–1020.
247. Славинская Г.В., Хохлов В.Ю. Потенциометрическое титрование ионитов. В.: Воронежский Государственный Университет. 2004. С. 35.
248. Болатбаев К.Н., Луговицкая Т.Н., Колосов А.В. Идентификация и физико-химические свойства лигносульфонатов в растворах // *Ползуновский Вестник.* 2009. № 3, С. 308–312.
249. 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 // *Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия.* 2013. Т. 68. № 5. С. 252–256.

250. *Ioutsy, 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>
251. *Raghuraman A., Tiwari V., Thakkar J.N., Gunnarsson G.T., Shukla D., Hindle M., Desai U.R.* Structural characterization of a serendipitously discovered bioactive macromolecule, lignin sulfate // *Biomacromolecules.* 2005. V. 6. P. 2822–2832.
252. *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.
253. *Leal L.K.A.M., Pierdoná T.M., Góes J.G.S., Fonsêca K.S., Canuto K.M., Silveira E.R., Bezerra A.M.E., Viana G.S.B.* A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* // *Phytomedicine.* 2010. V.18. №2–3. P. 230–233.
254. *Руденко Б.А., Руденко Г.И.* Высокоэффективные хроматографические процессы. Процессы с конденсированными подвижными фазами. М: Наука. 2003. С.287.
255. *Рудаков О.Б., Соколов М.И., Селеменев Ф.М., Рудакова Л.В.* Тетрагидрофуран – универсальный растворитель для жидкостной хроматографии // *Вестник ВГУ.* 2003. №2. С. 56–65.
256. *Chandrul Kaushal K., Srivastava B.* A process of method development: a chromatographic approach // *J. Chem. Pharm. Res.* 2010. V. 2. № 2. P. 519–545.