

УДК 543.544

НОВЫЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ НА ОСНОВЕ РАЗЛИЧНЫХ МАТРИЦ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭРЕМОМИЦИНОМ

© 2023 г. Н. Ю. Чикурова^а, Д. С. Просунцова^а, А. Н. Ставрианиди^а, С. М. Староверов^а, И. А. Ананьева^а, А. Д. Смоленков^а, А. В. Чернобровкина^а, *

^а Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 07.11.2022 г.

После доработки 25.11.2022 г.

Принята к публикации 25.11.2022 г.

Получены новые сорбенты на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола (ПС-ДВБ) для гидрофильной хроматографии (ГИХ) с эремомицином в функциональных слоях. Хроматографические свойства новых сорбентов оценивали с использованием теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз и путем изучения удерживания веществ различных классов в режимах ГИХ, хиральной и обращенно-фазовой хроматографии. Показано, что применение эремомицина для создания функциональных слоев приводит к увеличению гидрофильности сорбентов на разных типах матриц и позволяет экранировать их заряд. Возможно разделение 11 азотистых оснований, нуклеозидов с эффективностью до 25000 тт/м, 7 витаминов с эффективностью до 40000 тт/м на модифицированном сорбенте на основе аминопропилсиликагеля, а также реализация трех разных режимов ВЭЖХ на сорбенте с эремомицином на основе ПС-ДВБ.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография, многофункциональные сорбенты, силикагель, полистирол-дивинилбензол, эремомицин, сахара, водорастворимые витамины, аминокислоты, алкилбензолы, разделение энантиомеров.

DOI: 10.31857/S0044450223050031, EDN: MIEOPW

В настоящее время гидрофильная хроматография (ГИХ) представляет собой активно развивающийся метод, позволяющий определять как нейтральные, так и заряженные полярные соединения. Количество публикаций, посвященных ГИХ, постоянно растет, и метод в настоящее время используется в таких важных областях химии и биохимии, как анализ продуктов питания, объектов окружающей среды, лекарственных препаратов. Известно несколько десятков неподвижных фаз для гидрофильной хроматографии, однако на рынке по-прежнему существует постоянный спрос на новые сорбенты, которые обладают другими свойствами или их получение включает инновационные методики. Селективность и эффективность в ГИХ зависит в значительной степени от структуры неподвижной фазы, поэтому актуальным направлением развития этого метода является синтез новых сорбентов и изучение их свойств [1].

Гликопептидные антибиотики, такие как эремомицин, часто используют в качестве хиральных селекторов для высокоэффективной жидкостной хроматографии. Впервые хиральный сорбент с эремомицином получен в 2006 г. [2, 3]. Он представлял собой силикагель с эпоксигруп-

пами с привитым к ним эремомицином. Синтезированный сорбент проявил высокую способность к энантиораспознаванию аминокислот и профенов [4, 5].

Большое количество карбоксильных и аминогрупп на поверхности антибиотиков обеспечивает достаточную гидрофильность, поэтому создание новых фаз с данными макромолекулами может быть перспективно для разделения полярных соединений. Широкое применение находят фазы на основе силикагеля, модифицированные молекулами большого размера, например макроциклическими олигосахаридами. Такие молекулы, как циклодекстрины, циклофруктаны, кукурбитурилы содержат большое число полярных групп, обеспечивающих их гидрофильность. Молекула циклодекстрина обладает двойными свойствами: ее внутренняя поверхность гидрофобна, что позволяет удерживать в полости гидрофобные молекулы, а внешняя — достаточно гидрофильна для применения в ГИХ [6, 7]. Благодаря своей уникальной пространственной конфигурации, циклодекстрины также успешно используются в качестве хиральных селекторов для разделения энантиомеров. Таким образом, формирование функционального слоя на основе молекул, для

которых возможны различные типы взаимодействий, открывает перспективы для создания многофункциональных сорбентов.

Применение макромолекул может также способствовать экранированию матрицы и таким образом снижать ее вклад в процессы взаимодействия с сорбатами, что в дальнейшем позволит расширить круг используемых для синтеза частиц. Показано, что на селективность разделения в ГИХ влияет не только структура функционального слоя, но и способ его закрепления, а также природа матрицы [8, 9], поэтому представляет интерес изучение сорбентов с различными способами закрепления эремомицина на матрице. Согласно данным работы [9], переход от матриц на основе силикагеля к таковым на основе гидролитически стабильных ароматических сополимеров — эффективный способ создания многофункциональных неподвижных фаз. Сорбенты с подобной архитектурой позволяют работать в режимах ионной, гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии (**ОФ ВЭЖХ**) благодаря наличию ионообменных центров и формированию гидрофильного функционального слоя на поверхности гидрофобной ароматической матрицы, обеспечивающей удерживание неполярных веществ. В работе [9] авторы создали гиперразветвленный полярный функциональный слой на поверхности частиц сополимеров стирола и дивинилбензола. Альтернативным способом экранирования гидрофобной матрицы может стать ковалентное закрепление гидрофильных макромолекул. Перспективными модификаторами для создания многофункциональных сорбентов являются гликопептидные антибиотики, среди которых эремомицин выделяется более высокой гидрофильностью. Модифицирование гидрофобной матрицы эремомицином с целью гидрофилизации ее поверхности может способствовать созданию многофункциональных сорбентов, что позволит определять как гидрофобные соединения в варианте **ОФ ВЭЖХ**, так и полярные биологически активные вещества в режиме ГИХ, а наличие хирального селектора может обеспечить разделение энантиомеров.

Целью данной работы являлось получение новых неподвижных фаз, различающихся способами закрепления эремомицина в функциональных слоях, на основе различных типов матриц: силикагеля, 3-аминопропилсиликагеля и полистирол-дивинилбензола (**ПС-ДВБ**); изучение сорбентов в режиме ГИХ на примере разделения полярных веществ различных классов, в режиме **ОФ ВЭЖХ** — гидрофобных алкилбензолов, а также изучение свойств фаз в режиме хиральной **ВЭЖХ**.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приборы и материалы. В качестве матриц для получения сорбентов использовали силикагель (Kromasil, 5 мкм, средний диаметр пор 11 нм,

удельная поверхность 313 м²/г); силикагель с привитыми аминопропильными радикалами Диасфер-110-Амин (ЗАО “БиоХимМакСТ”, Россия) со сферическими частицами диаметром 5 мкм, средний диаметр пор 11 нм, удельная поверхность 200 м²/г, 1.70% N; сополимеры стирола и дивинилбензола со степенью сшивки 50%, средним диаметром частиц 5.5 ± 0.5 мкм, площадью поверхности 650 м²/г и средним диаметром пор 4 нм.

Для синтеза сорбентов использовали: эремомицин, 96% (ЗАО “БиоХимМакСТ”, Россия), гидрохлорид метиламина 99.9% (Aldrich, США), 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир >96.0% (Aldrich, США), триметиламин 45%-ный водный раствор (Aldrich, США).

Для изучения свойств сорбентов использовали: толуол х. ч. (компонент-Реактив, Россия); аденозин, >99.0%; урацил, >99.0%; теобромин, >98.0%; теофиллин, >98.0%; уридин, >98.0%; видарабин моногидрат, >98.0%; 5-метилуридин, >98.0%; 2'-деоксиуридин, >98.0%; N,N,N-триметилфенил-аммоний хлорид, >98.0%; тозилат натрия, >90.0% (ТСИ, Япония).

Сахара: D-(+)-рибоза, 98%; D-(+)-глюкоза, 99.5%; D-(+)-фруктоза, 99.9%; D-(+)-лактоза моногидрат, >98%; D-(+)-мальтоза моногидрат, >98%; D-(+)-сахароза, >98%; L-(+)-рамноза моногидрат, >98%; D-(+)-ксилоза, >98%; D-(+)-раффиноза пентагидрат (ТСИ, Япония).

Витамины: никотинамид, 99,7%; кислота никотиновая (Sigma-Aldrich, США). Рибофлавин (В₂), 99%; пиридоксин гидрохлорид (В₆), 99%; цианокобаламин (В₁₂) ч.д.а.; аскорбиновая кислота (витамин С), 99%; тиамин (В₁), >96% (ТСИ, Япония).

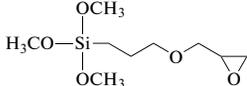
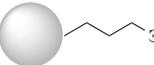
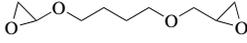
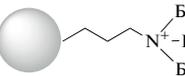
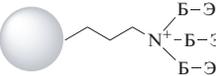
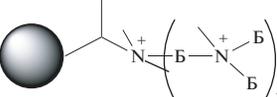
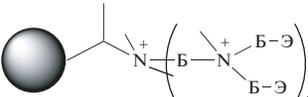
Азотистые основания, нуклеозиды: тимин, >99%; гуанозин, >98% (Sigma-Aldrich, Великобритания). Тимидин, >99%; аденин, >99%; цитозин, >99%; цитидин, >99%; гуанин 98%, ксантин, >99% (Sigma-Aldrich, Китай).

Органические кислоты: оксалат аммония, ацетат натрия х. ч. или ч. д. а. (Химмед и Лабтех, Россия). Гликолевая кислота, формиат натрия, пируват натрия, малоновая кислота, яблочная кислота, сукцинат натрия, молочная кислота, все х. ч. или ч. д. а. (Panreac, Испания). Пропионат натрия ч. д. а. (AppliChem, Германия). Глутаровая кислота, фумаровая кислота ч. д. а. (Merck, Германия).

Алкилбензолы: бензол, толуол, этилбензол, пропиленбензол, бутилбензол, пентилбензол, гексилбензол все х.ч. (Sigma-Aldrich, Россия).

Для изучения хроматографических свойств сорбентов использовали: жидкостной хроматограф Vanquish Flex с флуоресцентным детектором FLD и диодно-матричным детектором DAD (Thermo Scientific, США); систему **ВЭЖХ** Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США), состоящую из двухканального насоса высокого давления, авто-

Таблица 1. Предполагаемые структуры неподвижных фаз и их обозначения

Сорбент	Матрица	Спейсер	Функциональная группа	Предполагаемая структура
С		—	—	
С-Э	С			
С _А -Б	С _А	Б (1,4-БДДГЭ) 	Э (Эремомицин) 	
С _А -Б-Э				
П-2Б	П 	2Б 		
				

Обозначения: С – силикагель, С_А – 3-аминопропилсиликагель, П – аминированный полистирол-дивинилбензол, Б – 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир (1,4-БДДГЭ).

матической системы ввода пробы, термостата колонок и детектора на диодной матрице. Хроматограммы регистрировали с помощью программного пакета Chromeleon 7.0. Система ГХ-МС Agilent GC (8890)-MS (5977B) (Agilent Technologies, США) состояла из моноквадрупольного МС детектора с источником электронной ионизации, термостата колонки, охлаждаемого узла ввода пробы, термодесорбера (TDU 2) и автоматической роботизированной системы ввода пробы (Gerstel, Германия) и линии подачи газов (He, 1 мл/мин). Колонка ГХ: две соединенные последовательно колонки HP-5MS 15 м × 0.25 мм, 0.25 мкм (Agilent Technologies, США). Стеклокерамические термодесорбционные трубки (5 × 0.5 см). Кварцевая стекловата ЧДА (TRAJAN, Австралия). Применяли элементный анализатор PerkinElmer 2400 Series II CHNS Elemental Analyzer (PerkinElmer, Boston, США). Для упаковки сорбентов использовали стальные колонки размером 100 × 3 мм, которые заполняли при помощи насоса Knauer K-1900 (Knauer, Германия).

Синтез сорбентов и заполнение хроматографических колонок. Сорбент на основе силикагеля С (Kromasil, 5 мкм) и сорбент С-Э с иммобилизованным эремомицином (Диафер-110-Ere) были предоставлены ЗАО “БиоХимМакСТ” (Россия) (табл. 1).

На первой стадии синтеза сорбентов С_А-Б и С_А-Б-Э проводили введение эпоксидных групп и их пространственное удаление от поверхности матрицы. К 2 г 3-аминопропилсиликагеля (мат-

рица С_А) добавляли 2 мл 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (1,4-БДДГЭ). Реакцию проводили при 60°C и при перемешивании в течение 30 мин. Полученное вещество С_А-Б отфильтровывали, промывали 100 мл воды и 80 мл ацетонитрила, после чего делили на две части, одну из которых использовали на второй стадии. На второй стадии 0.5 г эремомицина растворяли в 25 мл дистиллированной воды, с помощью 1 М раствора КОН pH полученного раствора доводили до 8.50 и полученный раствор антибиотика добавляли к 1 г эпокси-активированного сорбента С_А-Б. Реакционную смесь интенсивно перемешивали в течение 2 ч, затем оставляли без нагревания и перемешивания в течение 7 дней. Полученное вещество С_А-Б-Э (табл. 1) отфильтровывали, промывали 100 мл воды и 80 мл ацетонитрила.

Для синтеза сорбентов на основе полимерной матрицы на первом этапе получали якорные аминогруппы на поверхности частиц ПС-ДВБ в соответствии с методикой [10]. Таким образом, неподвижные фазы П-2Б и П-2Б-Э синтезировали на аминированном ПС-ДВБ методом гиперразветвления [11–13] при использовании метиламина в первом цикле модифицирования и 1,4-БДДГЭ в качестве спейсера в двух циклах модифицирования. Полученное соединение П-2Б делили на две части, одну из которых использовали для дальнейшего ковалентного модифицирования эремомицином аналогично фазе С_А-Б-Э. Полученный

сорбент П-2Б-Э отфильтровывали и промывали 1 л воды.

Колонки заполняли при давлении 300–400 бар. Для приготовления суспензии сорбентов на основе силикагеля использовали смесь 10 мл 0.1 М раствора KCl, 8 мл этанола и 2 мл 1,4-диоксана, на основе ПС-ДВБ – 20 мл воды. В качестве подвижной фазы для упаковки сорбентов на основе силикагеля использовали дегазированный ацетонитрил, для полимерных – 0.1 М раствор карбоната натрия.

Изучение структуры сорбентов. Элементный анализ полученных фаз на основе силикагеля показал увеличение содержания углерода и азота при модифицировании матриц эремомицином: 12.17% C, 1.25% N для С-Э; 9.04% C, 1.32% N для С_А-Б; 9.90% C, 1.51% N для С_А-Б-Э.

Изучение термодесорбции высушенных образцов сорбентов методом газовой хромато-масс-спектрометрии доказало закрепление эремомицина на поверхности разных матриц: силикагеля, аминопропилсиликагеля и полистирол-дивинилбензола. При нагревании до 250°C образцов сорбентов регистрировали сигналы фрагментов молекулы эремомицина. На масс-хроматограмме продуктов термического разложения сорбентов С-Э, С_А-Б-Э и П-2Б-Э наблюдали пики, предположительно относящиеся к крезолом или бензиловому спирту (время удерживания ~5 мин), разветвленных С₇–С₁₀ гидроксизамещенных енонов и сложных эфиров (8–10 мин), в том числе, предположительно, изопропилового эфира 3,4-диметил-2,4-пентадиеновой кислоты, 6-этил-7-гидрокси-4-октен-3-она, а также 2,4-диметил-1,3-циклопентандиона. Отличительной особенностью образцов С_А-Б-Э и П-2Б-Э по сравнению с С-Э являлось присутствие пика (10.2 мин) азотсодержащего фрагмента с основными сигналами m/z 84, 86 и 128, предположительно, 1,1,4-триметил-3-пирозолона, образование которого легко объяснить циклизацией при расщеплении пептидных связей молекулы эремомицина. Такое различие может быть связано с близостью матрицы силикагеля и фазы С-Э, образующей водородные связи, вследствие чего отщепляются только самые летучие фрагменты молекулы антибиотика. Обнаруженные сигналы хорошо согласуются с молекулярной структурой эремомицина и отсутствуют на хроматограммах других изученных сорбентов, не содержащих эремомицин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучали свойства сорбентов на основе силикагеля и сополимеров стирола и дивинилбензола, модифицированных эремомицином, ковалентно закрепленным на поверхности матриц различными способами. Для оценки применимости таких неподвижных фаз к разделению полярных ве-

ществ в режиме ГИХ сравнили хиральный сорбент Диасфер-110-Еге производства ЗАО “Био-ХимМак СТ” (Россия) на основе силикагеля с иммобилизованным с помощью линейного глицидоксипропильного спейсера эремомицином, а также синтезировали новую фазу на основе 3-аминопропилсиликагеля с использованием бифункционального спейсера 1,4-БДДГЭ, на эпоксидных фрагментах которого далее закрепляли эремомицин. Использование подобного спейсера позволяет увеличить количество закрепляемых макромолекул благодаря его разветвлению на поверхностных аминогруппах (от одной до трех на каждую исходную аминогруппу матрицы), а также дополнительно повысить степень экранирования матрицы. Показано, что такой подход является перспективным также для гидрофиллизации гидрофобной матрицы ПС-ДВБ, при этом в работе [14] увеличение степени разветвления спейсера и числа циклов модифицирования до двух приводило к наибольшей эффективности фаз по отношению к полярным веществам. В связи с этим для закрепления эремомицина на поверхности ПС-ДВБ предварительно создавали разветвленный слой 1,4-БДДГЭ в результате двух циклов модифицирования (табл. 1). Для оценки вклада функционального слоя эремомицина в свойства сорбентов изучали также разделяющие способности матриц и продуктов предыдущих стадий, не содержащих антибиотик. Таким образом, прототипами для сравнения являлись пары сорбентов С-Э и С (силикагель), С_А-Б-Э и С_А-Б на основе 3-аминопропилсиликагеля, П-2Б-Э и П-2Б на основе ПС-ДВБ (табл. 1). Полученные фазы сравнивали с помощью теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз [15, 16] и на примере разделения модельных смесей сахаров, аминокислот, азотистых оснований и нуклеозидов, водорастворимых витаминов, а также органических кислот и алкилбензолов.

Тест Танака и поведение модельных аналитов. *Гидрофильность.* Согласно результатам теста Танака для гидрофильных сорбентов, представленным в табл. 2, сорбенты, модифицированные эремомицином ($\lg P = -3.21$ согласно Еriweb 4.1), продемонстрировали большие величины фактора удерживания уридина $k(U)$, отвечающего за оценку гидрофильных взаимодействий, по сравнению с соответствующими матрицами и сорбентами-прототипами, что свидетельствует об успешном введении гидрофильных фрагментов в структуру функциональных слоев.

При рассмотрении нейтральных полярных сахаров и цвиттер-ионных аминокислот в качестве модельных объектов для попарного сравнения полученных сорбентов показано, что при модифицировании с помощью эремомицина всех трех типов матриц (на основе силикагеля С, с пространственным удалением функционального слоя С_А-Б и полимерной матрицы П-2Б) факторы удерживания

Таблица 2. Величины коэффициентов селективности теста Танака и факторов удерживания модельных веществ

Сорбент	$k(U)$	$\alpha (CX)$	$\alpha (AX)$	$\alpha (V/A)$	$\alpha (CH_2)$	$\alpha (OH)$	$\alpha (Tb/Tr)$
С	0.76	45.10	0.09	1.17	1.14	1.09	1.23
С-Э	2.49	1.56	1.66	1.25	1.14	1.42	1.09
С _А -Б	1.63	0.00	26.94	1.39	1.23	1.64	0.44
С _А -Б-Э	2.04	0.00	19.40	1.40	1.23	1.66	0.50
П-2Б	0.39	0.00	271.30	1.29	1.14	2.28	0.20
П-2Б-Э	1.15	0.00	34.13	1.32	1.12	1.79	0.52

Условия: подвижная фаза CH_3CN —20 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор с pH 4.7 (90 : 10); скорость потока 0.5 мл/мин; УФ-детектирование при 254 нм.

сахаров и аминокислот значительно увеличиваются (табл. 3), что согласуется с увеличением гидрофильности поверхности по результатам теста Танака. Наибольшее увеличение факторов удерживания сахаров (в 2–3 раза) и аминокислот (в 2–3.5 раза) отмечено для пары: матрица С и сорбент С-Э без значительного удаления функционального слоя. При сравнении сорбентов С_А-Б-Э и С-Э, различающихся способами закрепления эремомицина в функциональных слоях, наблюдали меньшие факторы удерживания практически всех полярных нейтральных и цвиттер-ионных веществ на сорбенте С_А-Б-Э, что, вероятно, связано с наличием в структуре гидрофобных бутильных фрагментов. Таким образом, показано, что удерживание анализов зависит от длины и структуры спейсера.

Наименьшее увеличение факторов удерживания сахаров — до 1.5 раз при введении эремомицина в функциональный слой — среди рассматриваемых сорбентов показала пара фаз на основе ПС-ДВБ, что может свидетельствовать о сохранении все еще значительного влияния гидрофобной матрицы на удерживание полярных нейтральных сахаров, несмотря на увеличение гидрофильности сорбента.

Введение эремомицина в функциональные слои на всех матрицах также привело к увеличению факторов удерживания азотистых оснований и нуклеозидов (табл. 3). Интересно отметить, что фактор удерживания наиболее гидрофильного гуанозина для пары сорбентов на основе силикагеля после закрепления эремомицина увеличился в 30 раз, а для пары сорбентов на основе ПС-ДВБ — в 10 раз. Такое значительное изменение факторов удерживания полярного вещества обосновывает перспективность использования антибиотиков для гидрофилизации поверхности различных матриц.

Водорастворимые витамины — группа аналитов, характеризующаяся разными кислотно-основными свойствами, полярностью и зарядом, вклад в удерживание которых могут вносить различные взаимодействия. Удерживание витаминов, заряженных в условиях разделения, в большей степени зависит от электростатических взаи-

модействий и будет рассмотрено в дальнейшем в рамках катионо- и анионообменной селективности [17]. Здесь же необходимо отметить увеличение факторов удерживания незаряженных витаминов при модифицировании различных матриц эремомицином, а также увеличение факторов удерживания всех витаминов при модифицировании матрицы на основе ПС-ДВБ (табл. 3), что свидетельствует в пользу экранирования гидрофобной поверхности.

Катионообменная селективность. Установлено существенное уменьшение катионообменной селективности $\alpha(CX)$ для сорбента на основе силикагеля С-Э по сравнению с матрицей С (табл. 2), что указывает на экранирование отрицательного заряда силикагеля при закреплении антибиотика.

Получение зависимостей факторов удерживания от доли сильного растворителя и концентрации элюирующего иона позволяет оценить вклад распределительного, адсорбционного и ионообменного механизмов удерживания, реализующихся в режиме ГИХ. Согласно теории метода гидрофильной хроматографии [18], близость коэффициента корреляции к единице в уравнении (1) свидетельствует о реализации адсорбционного механизма удерживания, а в уравнении (2) — соответственно о преобладании распределительного механизма. Близость наклона зависимости (3) к единице позволяет оценить степень влияния элестростатических взаимодействий:

$$\lg k' = a - m \lg w(H_2O), \quad (1)$$

$$\lg k' = b - m_1 w(H_2O), \quad (2)$$

$$\lg k' = -\lg [c]_m + \lg b_{\text{IEX}}, \quad (3)$$

где $w(H_2O)$ — доля воды как сильного растворителя, а $[c]_m$ — концентрация элюирующего иона в подвижной фазе.

Согласно данным табл. 4, на матрице С реализуется адсорбционный механизм удерживания витамина В₁ со значительным вкладом электростатических взаимодействий, а на сорбенте С-Э наблюдается увеличение вклада распределительного механизма в сочетании с адсорбционным вследствие гидрофилизации поверхности сорбента при введении эремомицина в функциональный слой. При этом уменьшение факторов

Таблица 3. Величины факторов удерживания модельных веществ

Вещество	C	C-Э	C _A -Б	C _A -Б-Э	П-2Б	П-2Б-Э
Сахара						
Рибоза	0.61	0.85	0.18	0.30	0.19	0.29
Фруктоза	1.00	1.45	0.54	0.77	0.39	0.52
Глюкоза	1.00	1.88	0.84	1.20	0.57	0.73
Сахароза	1.48	3.39	1.39	2.25	1.15	1.20
Лактоза	2.04	4.90	1.93	3.15	1.16	1.55
Мальтоза	1.70	4.71	2.04	2.96	1.32	1.65
Аминокислоты						
Фенилаланин	1.37	3.74	1.96	2.21	2.47	3.43
Пролин	3.09	6.32	2.75	3.47	0.72	1.73
Аспарагин	2.64	9.32	5.51	6.86	2.23	4.20
Серин	3.88	8.45	8.82	10.63	3.09	4.74
Азотистые основания и нуклеозиды						
Тимин	0.43	1.53	0.52	0.84	0.43	1.09
Урацил	0.52	1.84	0.83	1.08	0.43	1.26
2'-Дезоксиуридин	0.73	2.16	1.00	1.27	0.45	1.02
Уридин	2.20	3.25	1.65	2.10	0.71	1.64
Аденозин	1.76	4.49	1.96	2.60	0.86	1.77
Аденин	2.20	5.07	2.45	3.03	0.98	2.23
Цитозин	3.20	17.91	2.67	4.58	0.73	8.33
Цитидин	2.99	10.39	3.77	5.35	1.21	3.98
Гуанин	2.46	27.98	7.47	11.09	2.12	14.89
Гуанозин	2.46	72.63	8.92	18.42	3.14	29.82
Ксантин	1.02	17.27	16.28	21.00	4.17	31.11
Витамины						
Никотинамид	0.81	1.07	0.51	0.59	0.20	0.29
В ₆	2.02	1.96	1.43	1.67	0.52	0.78
В ₂	2.95	5.07	2.12	2.71	0.92	1.93
В ₁	69.42	12.93	0.62	1.15	0.02	0.68
Никотиновая кислота	1.68	5.19	10.75	10.80	3.10	4.91
В ₁₂	18.77	16.01	4.80	6.22	0.11	0.37
Витамин С	1.95	5.46	18.70	17.54	2.69	4.01
Кислоты						
Пировиноградная	0.47	1.12	0.70	0.92	2.27	2.12
Аскорбиновая	0.97	1.89	2.20	2.79	2.19	2.33
Глутаровая	3.65	8.79	7.02	9.50	14.33	18.79
Винная	3.92	6.54	6.39	8.12	16.11	13.79
Щавелевая	4.00	6.99	14.46	16.39	20.40	19.19
Фумаровая	4.37	7.41	7.15	9.09	23.23	26.89
Алкилбензолы						
Бензол	—	—	—	—	2.36	2.22
Толуол	—	—	—	—	3.19	3.04
Этилбензол	—	—	—	—	4.07	3.89
Пропилбензол	—	—	—	—	5.60	5.41
Бутилбензол	—	—	—	—	7.95	7.78
Пентилбензол	—	—	—	—	11.02	10.92
Гексилбензол	—	—	—	—	15.75	15.74

Условия: сахара: подвижная фаза (ПФ) CH₃CN–H₂O (85 : 15); рефрактометрическое детектирование. Аминокислоты: ПФ CH₃CN–1 мМ фосфатный буферный раствор (ФБ) с рН 6.5 (80 : 20); УФ-детектирование при 200 нм. Азотистые основания и нуклеозиды: ПФ CH₃CN–20 мМ ААБ (90 : 10); УФ-детектирование при 254 нм. Витамины: ПФ для никотинамида, В₆, В₁, В₂: CH₃CN–100 мМ ААБ (90 : 10); ПФ для никотиновой кислоты, В₁₂, витамина С: CH₃CN–100 мМ ААБ (80 : 20); УФ-детектирование при 270 нм. Органические кислоты: ПФ CH₃CN–10 мМ ФБ с рН 7.0 (80 : 20); УФ-детектирование при 200 нм. Алкилбензолы: H₂O–CH₃CN (20 : 80); УФ-детектирование при 254 нм. Скорость потока – 1 мл/мин.

Таблица 4. Уравнения и коэффициенты корреляции логарифмической и билогарифмической зависимостей факторов удерживания тиамина от доли водной части (10–30%) в подвижной фазе (1, 2) или от концентрации (3) буферного раствора (10–100 мМ)

Сорбент	$\lg k' = f_1(w(\text{H}_2\text{O}))$	r_1	$\lg k' = f_2(\lg w(\text{H}_2\text{O}))$	r_2	$\lg k' = f_3(\lg c)$	r_3
С	$y = -4.4x + 2.2$	0.978	$y = -1.9x - 0.1$	0.999	$y = -0.5x + 0.5$	0.998
С-Э	$y = -5.4x + 1.7$	0.991	$y = -2.3x - 1.1$	0.999	$y = 0.2x + 0.5$	0.995

Условия: подвижная фаза CH_3CN –ААБ с рН 5.4; скорость потока – 1 мл/мин; УФ-детектирование при 270 нм.

удерживания тиамина с возрастанием концентрации элюирующего иона в подвижной фазе и крутизна -0.5 соответствующей зависимости (3) для силикагеля сменяется обратным наклоном со снижением вклада электростатических взаимодействий до 0.2 в случае С-Э (табл. 4), что может свидетельствовать об отталкивании положительно заряженного аналита или эффекте высаливания. Полученные результаты совместно с уменьшением катионообменной селективности $\alpha(\text{СХ})$ подтвердили успешное экранирование отрицательного заряда силикагеля с помощью антибиотика, что отразилось на факторах удерживания положительно заряженного тиамина, уменьшившись в пять раз на сорбенте С-Э по сравнению с фазой С (табл. 2) и приводящих к снижению селективности по паре витаминов $\text{В}_1/\text{В}_2$ (рис. 1).

Анионообменная селективность. Сорбенты $\text{С}_\text{А}$ -Б и П-2Б характеризуются положительным зарядом поверхности и ярко выраженной анионообменной селективностью $\alpha(\text{АХ})$ вследствие протонирования аминогрупп в рабочих условиях, увеличения степени их замещения вплоть до кватернизации атомов азота исходных матриц

при присоединении до трех молекул 1,4-БДДГЭ к каждой аминогруппе. Существенное уменьшение величин $\alpha(\text{АХ})$ в двух парах сорбентов на основе разных матриц после их модифицирования эремомицином – $\text{С}_\text{А}$ -Б-Э и П-2Б-Э – аналогично свидетельствует об экранировании положительного заряда макромолекулой антибиотика.

Эффект экранирования положительно заряженной поверхности наблюдается также при оценке селективности для пары никотинамид/ В_1 : на сорбенте с пространственным удалением функционального слоя $\text{С}_\text{А}$ -Б-Э по сравнению с прототипом $\text{С}_\text{А}$ -Б происходит ее увеличение, а для сорбентов на основе полимерной матрицы П-2Б и П-2Б-Э селективность для этой пары витаминов иная. На сорбенте П-2Б с большой анионообменной селективностью (табл. 2) реализуется электростатическое отталкивание положительно заряженного тиамина, и он элюируется практически с мертвым временем. Введение эремомицина в функциональный слой и в случае гидрофобной матрицы приводит к значительному уменьшению анионообменной селективности для

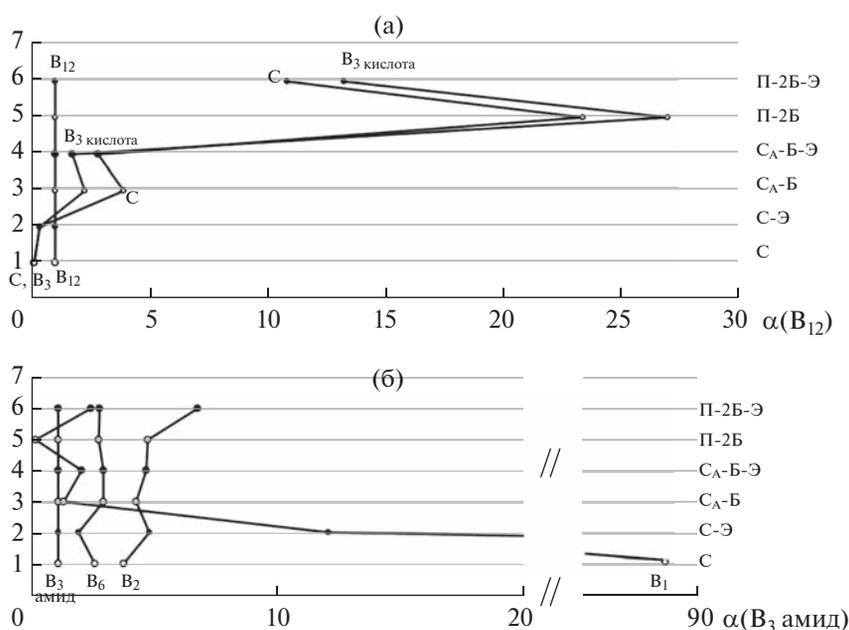


Рис. 1. Шкалы селективности сорбентов по отношению к витаминам. (а) Подвижная фаза для никотиновой кислоты, В_{12} , С: CH_3CN –100 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор (ААБ) (80 : 20); (б) подвижная фаза для никотинамида, В_6 , В_1 , В_2 : CH_3CN –100 мМ ААБ (90 : 10); УФ-детектирование при 270 нм; скорость потока 1 мл/мин.

сорбента П-2Б-Э и позволяет увеличить удерживание тиамина.

Для сорбента C_A -Б-Э отмечено уменьшение селективности для пары никотиновая/аскорбиновая кислоты по сравнению с прототипом C_A -Б, что согласуется с уменьшением его анионообменной селективности (табл. 2) и, как следствие, меньшим удерживанием диссоциированных и отрицательно заряженных карбоксильных групп аналитов в условиях разделения. В случае сорбентов на основе ПС-ДВБ наблюдали увеличение факторов удерживания этих кислот без значимого изменения селективности для их пары несмотря на существенное уменьшение анионообменной селективности сорбента П-2Б-Э по сравнению с прототипом П-2Б. На основании полученных результатов можно заключить, что именно повышение гидрофильности функционального слоя сорбента способствует возрастанию k' и вносит значимо больший вклад в удерживание веществ кислотного характера, чем его анионообменная селективность.

В качестве модельных объектов для изучения свойств и возможностей синтезированных сорбентов использовали также и другие органические кислоты, представляющие класс полярных отрицательно заряженных аналитов. Для их разделения в качестве подвижной фазы выбрали фосфатный буферный раствор с рН 7.0, не поглощающий электромагнитное излучение при длине волны 200 нм, используемой для детектирования органических кислот [19]. При выборе условий элюирования содержание буферного раствора снизили до 10 мМ для обеспечения растворимости фосфата в водно-органической среде, доля водной фазы составила 20%.

При модифицировании эремомицином матриц на основе силикагеля и аминопропилсиликагеля факторы удерживания кислот увеличивались практически в два раза (табл. 3), что согласуется с увеличением гидрофильности $k(U)$ в три раза и появлением анионообменной селективности в случае пары фаз С/С-Э. На примере пары C_A -Б/ C_A -Б-Э наблюдали увеличение факторов удерживания кислот только на 15–35% при возрастании гидрофильности на 20% и сохранении высокой анионообменной селективности, на порядок большей, чем для С-Э. Незначительное увеличение до 10% факторов удерживания ряда кислот, кроме винной и щавелевой, по сравнению с прототипом на основе полимера наблюдали для сорбента П-2Б-Э с большей гидрофильностью и на порядок меньшей анионообменной селективностью по сравнению с П-2Б. Таким образом, установлен незначительный вклад ионообменного механизма в удерживание анионов кислот, что может быть связано с понижением анионообменной селективности сорбентов при переходе к рабочему рН 7.0: в данных условиях элюирования удерживание кислот на полученных сорбентах определя-

ется в большей степени гидрофильностью фаз. Результаты, полученные для этого ряда кислот, согласуются с таковыми для аскорбиновой и никотиновой кислот в других условиях элюирования, что подтверждает правомерность сделанных выводов о доминирующем влиянии гидрофильности сорбента на удерживание веществ кислотного характера.

Интересно отметить, что происходит изменение порядка элюирования щавелевой и фумаровой кислот на сорбентах на основе полимера по сравнению с фазами на основе силикагеля. Этот факт, вероятно, связан с гидрофобными взаимодействиями аналитов и ПС-ДВБ, которые сохраняются и после модифицирования эремомицином.

Гидроксильная селективность $\alpha(OH)$ сорбентов возрастает для С-Э по сравнению с С, согласуясь с увеличением гидрофильности (табл. 2). Для фаз C_A -Б/ C_A -Б-Э и П-2Б/П-2Б-Э не наблюдали согласования изменения $\alpha(OH)$ с $k(U)$. Показано, что селективность по отношению к стереоизомерам $\alpha(V/A)$ и метиленовая селективность $\alpha(CH_2)$ значительно не изменяются для полученных сорбентов по сравнению с соответствующими матрицами, а величины $\alpha(Tb/Tr) < 1$ подтвердили основную природу сорбентов на основе аминопропилсиликагеля и полимера (C_A -Б, C_A -Б-Э, П-2Б, П-2Б-Э), $\alpha(Tb/Tr) > 1$ – кислотную природу сорбентов на основе силикагеля (С, С-Э).

Таким образом, показано, что закрепление эремомицина позволяет экранировать различные матрицы и является хорошим способом их гидрофилизации.

Эффективность и разделяющая способность модифицированных сорбентов. Среди всех сорбентов самую высокую эффективность продемонстрировали сорбенты на основе 3-аминопропилсиликагеля. Необходимо отметить значительное уменьшение эффективности практически по всем классам рассматриваемых соединений для сорбентов, модифицированных объемным антибиотиком, на основе силикагеля С-Э и на основе полимерной матрицы П-2Б-Э (рис. 2). В свою очередь, эффективность сорбентов C_A -Б и C_A -Б-Э на основе 3-аминопропилсиликагеля по азотистым основаниям и нуклеозидам, витаминам и кислотам сопоставима, а случае сахаров сорбент C_A -Б-Э продемонстрировал двукратное возрастание эффективности по сравнению с прототипом. Таким образом, способ закрепления эремомицина с пространственным удалением функциональных групп и повышенная степень экранирования гидрофильной матрицы благодаря наличию 1,4-БДДГЭ в качестве спейсера позволяют сохранить эффективность при введении в слой молекул большого размера.

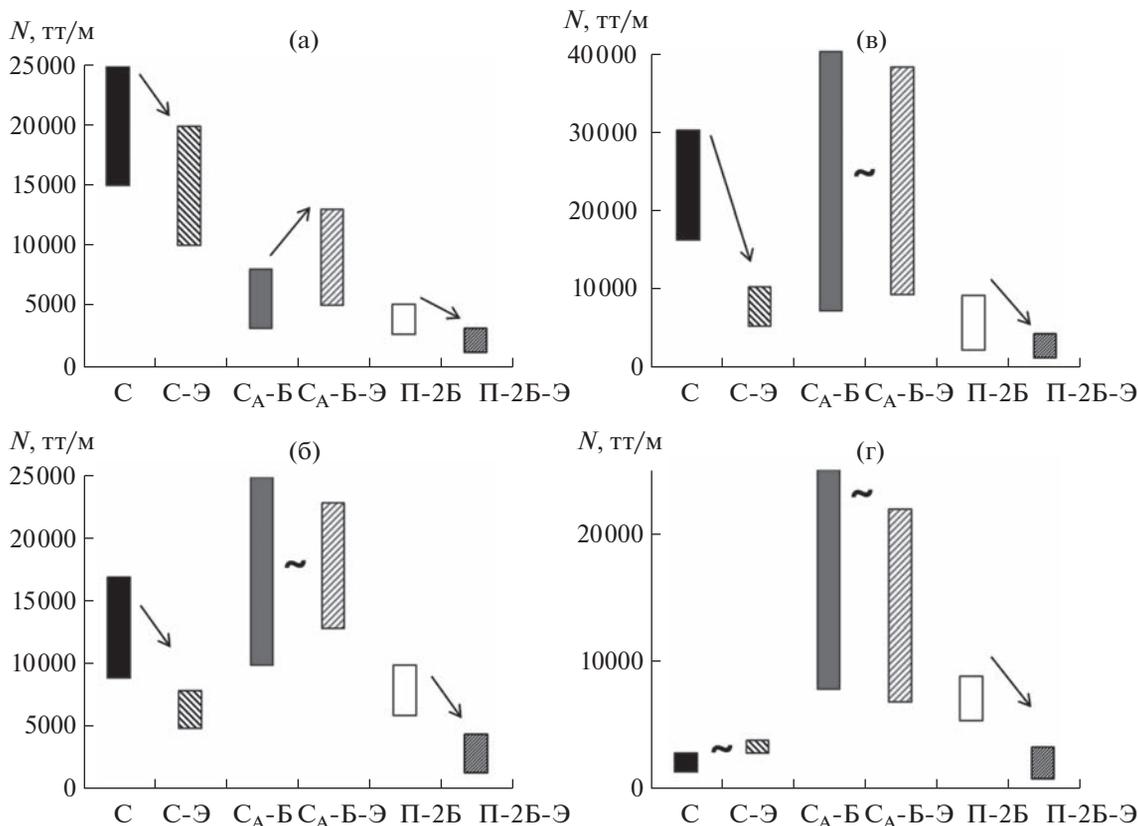


Рис. 2. Эффективность колонок по отношению к разным классам модельных веществ. (а): Сахара; подвижная фаза (ПФ): $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (85 : 15); рефрактометрическое детектирование. (б): Азотистые основания и нуклеозиды, ПФ: $\text{CH}_3\text{CN}-20$ mM ацетатно-аммонийный буферный раствор (ААБ) (90 : 10), pH 4.7; УФ-детектирование при 254 нм. (в): Витамины, ПФ для никотинамида, B_6 , B_1 , B_2 : $\text{CH}_3\text{CN}-100$ mM ААБ (90 : 10); pH 5.4; ПФ для никотиновой кислоты, B_{12} , С: $\text{CH}_3\text{CN}-100$ mM ААБ (80 : 20); pH 5.4; УФ-детектирование при 270 нм. (г): Органические кислоты, ПФ: $\text{CH}_3\text{CN}-10$ mM фосфатный буферный раствор (80 : 20); pH 7.0; УФ-детектирование при 200 нм. Скорость потока — 1 мл/мин.

С целью повышения экспрессности разделения смеси витаминов использовали градиентное элюирование. Благодаря увеличению селективности для пары никотинамид/ B_1 на сорбенте $\text{C}_A\text{-Б-Э}$ по сравнению с прототипом $\text{C}_A\text{-Б}$ возможно разделение данной пары до базовой линии. В целом сорбенты, полученные при модифицировании эремомоцином, продемонстрировали хорошую разделяющую способность и разрешение пиков семи витаминов (рис. 3). Выбраны условия разделения азотистых оснований и нуклеозидов [20, 21]. Доля водной фазы для сорбентов С-Э и П-2Б-Э с наибольшими факторами удерживания этих соединений составила 15%, для сорбента $\text{C}_A\text{-Б-Э}$ на основе 3-аминопропилсиликагеля — 10%. Благодаря сочетанию повышенной селективности сорбента $\text{C}_A\text{-Б-Э}$ и его высокой эффективности максимальная разделяющая способность данного сорбента включает 11 азотистых оснований и нуклеозидов. Хроматограммы смесей представлены на рис. 4.

Многофункциональные возможности сорбентов.
Разделение гидрофобных веществ. Полученные

гидрофильные сорбенты на основе силикагеля ожидаемо не удерживают гидрофобные алкилбензолы и, таким образом, эти фазы могут быть бифункциональными, пригодными для использования в режимах гидрофильной и хиральной [2, 5] хроматографии. Наличие гидрофобной матрицы ПС-ДВБ позволяет реализовать дополнительный тип взаимодействий аналитов с такой архитектурой новых неподвижных фаз, благодаря чему становится возможным разделение гидрофобных соединений в режиме ОФ ВЭЖХ [8].

Порядок элюирования алкилбензолов на полимерных сорбентах П-2Б и П-2Б-Э характерен для ОФ ВЭЖХ (рис. 5), и их удерживание увеличивается с уменьшением содержания ацетонитрила в подвижной фазе. Разделения смеси алкилбензолов в изократическом режиме удалось достичь за 10 мин при использовании воды и ацетонитрила в соотношении 20 : 80 (по объему). Факторы удерживания алкилбензолов на сорбенте П-2Б-Э несколько уменьшились по сравнению с прототипом П-2Б, что согласуется с большей гидрофильностью (табл. 2) сорбента П-2Б-Э, мо-

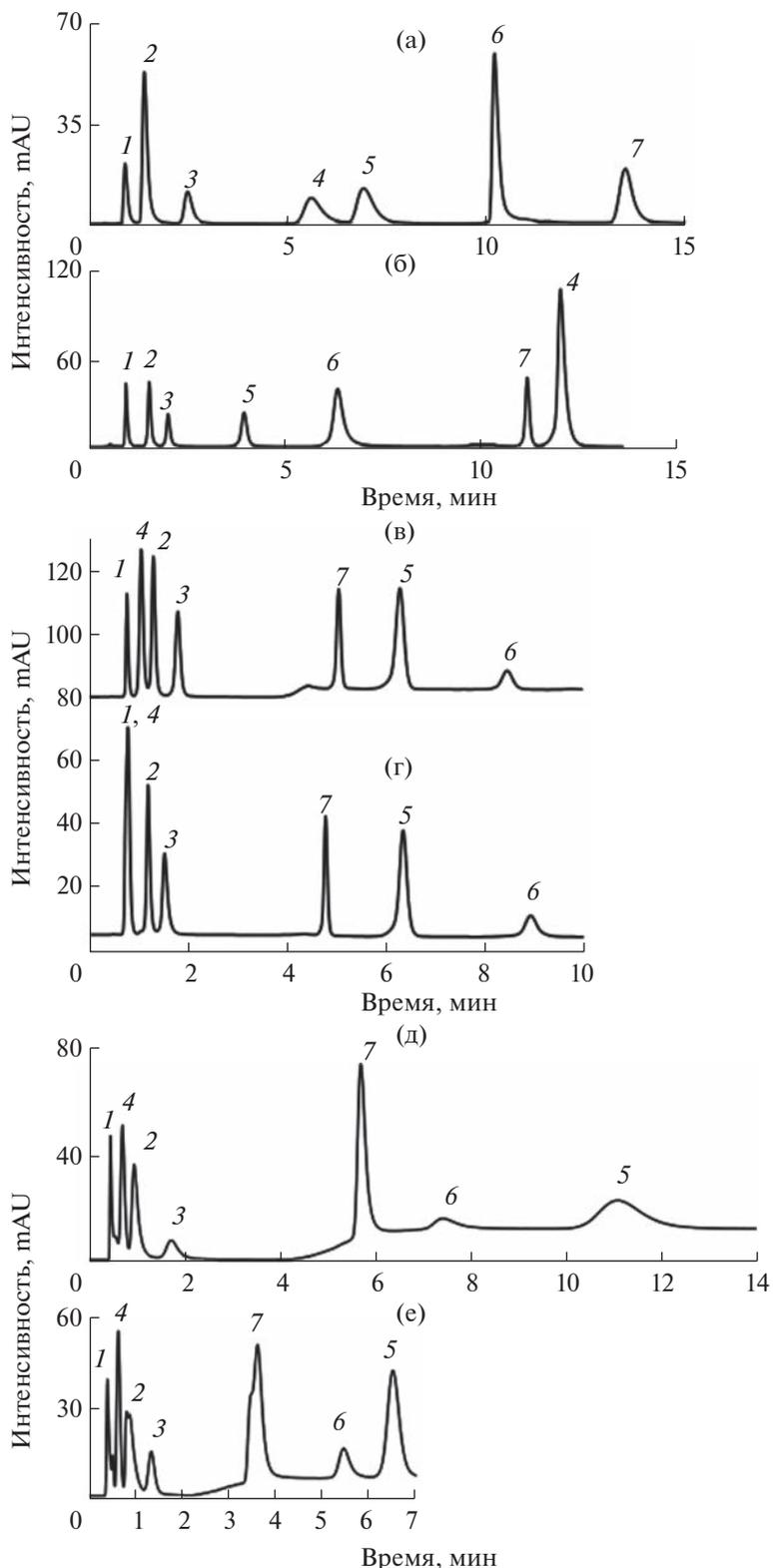


Рис. 3. Хроматограммы модельной смеси витаминов. ПФ: 100 мМ ААБ с рН 5.4–CH₃CN. Сорбенты: С-Э (а), С (б); градиентное элюирование для С-Э: 0–8 мин 12% ААБ, 9.5–16 мин 24% ААБ; для С: 0–7.5 мин 10% ААБ, 9–16 мин 31% ААБ. Сорбенты С_А-Б-Э (в), С_А-Б (г); градиентное элюирование: 0–2 мин 10% ААБ, 3.5–10 мин 25% ААБ. Сорбенты П-2Б-Э (д), П-2Б (е); ПФ: 100 мМ формиатно-аммонийный буферный раствор (АФБ) с рН 3.0–CH₃CN: градиентное элюирование для П-2Б-Э: 0–3.5 мин 10% АФБ, 4.7–15 мин 22% АФБ; для П-2Б: 0–1.5 мин 7% АФБ, 4.7–15 мин 15% АФБ; УФ-детектирование при 270 нм. 1 – никотинамид, 2 – В₆, 3 – В₂, 4 – В₁, 5 – никотиновая кислота, 6 – витамин С, 7 – В₁₂.

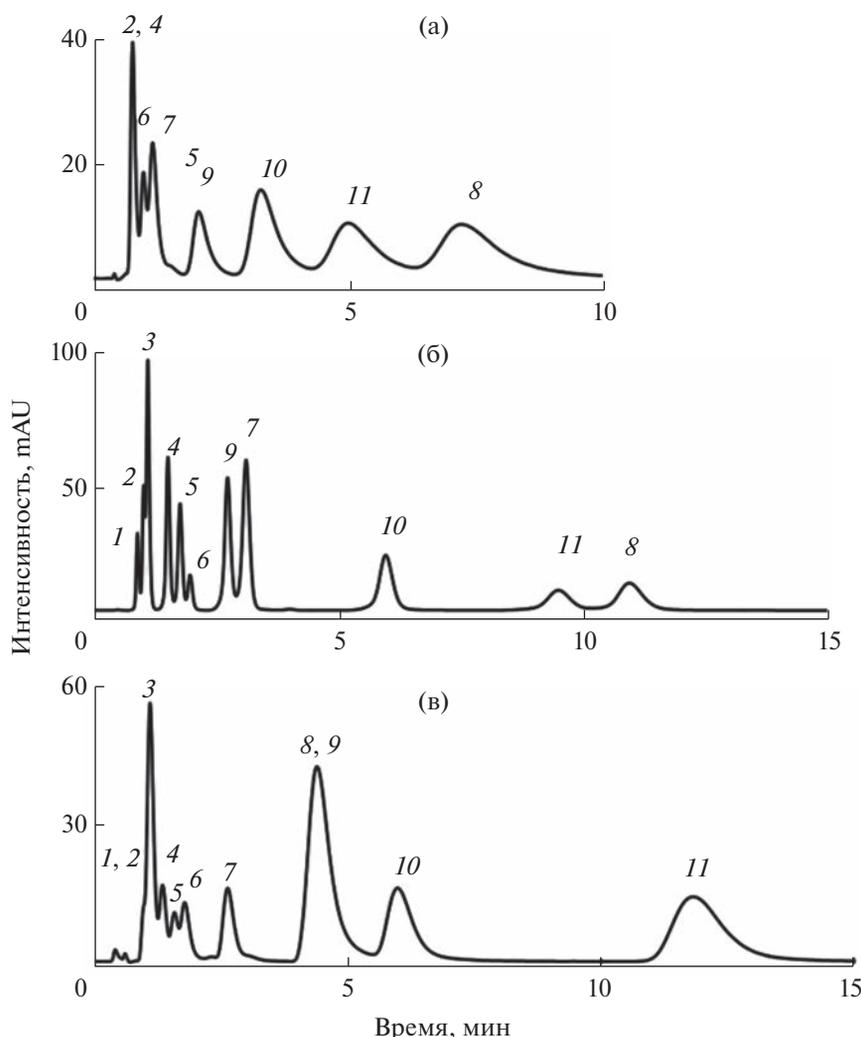


Рис. 4. Хроматограммы модельной смеси азотистых оснований и нуклеозидов. Сорбенты: П-2Б-Э (а), С_А-Б-Э (б), С-Э (в); ПФ: 20 мМ ААБ с рН 4.7–СН₃CN (15 : 85 для 1 и 3, 10 : 90 для 2); УФ-детектирование при 254 нм. 1 – тимин, 2 – урацил, 3 – 2'-дезоксуридин, 4 – уридин, 5 – аденозин, 6 – аденин, 7 – цитидин, 8 – ксантин, 9 – цитозин, 10 – гуанин, 11 – гуанозин.

дифицированного антибиотиком. Однако, как и для других классов модельных соединений, применение эремомицина для создания нового функционального слоя приводит к уменьшению эффективности на сорбенте П-2Б-Э в два раза. Таким образом, несмотря на существенную гидрофилизацию поверхности, в случае модифицированного сорбента на основе ПС-ДВБ в значительной степени сохраняется влияние гидрофобной матрицы и возможна реализация различных типов взаимодействия аналитов с неподвижной фазой.

Разделение энантиомеров. Закрепление хирального селектора в функциональном слое сорбента может обеспечить его энантиоселективность, проявление которой также будет свидетельствовать об эффективности модифицирования матрицы. На сорбенте П-2Б-Э изучили удерживание оптически активных соединений. Содержание органической

добавки в элюенте варьировали от 95 до 5%. Неподвижная фаза проявила энантиоселективность к аминокислотам, порядок удерживания которых характерен для гидрофильной хроматографии. Достигнуто разделение энантиомеров ряда аминокислот и их производных при элюировании подвижной фазой метанол–0.05%-ный буферный раствор ацетата триэтиламина с рН 4.0 (80 : 20) (валин $\alpha = 2.2$, $R_s = 1.1$; лейцин $\alpha = 2.5$, $R_s = 1.3$; бензилоксикарбониласпарагин $\alpha = 1.7$, $R_s = 1.3$). При переходе к подвижной фазе состава ацетонитрил–10 мМ буферный раствор ацетата аммония с рН 5.2 достигли разделения энантиомеров 4-хлорфенилаланина до базовой линии при содержании ацетонитрила 60% ($R_s = 1.8$, $\alpha = 3.5$). Хроматограмма представлена на рис. 6. Проявленные хиральные свойства неподвижной фазы также подтверждают закрепление эремомицина на сорбенте.

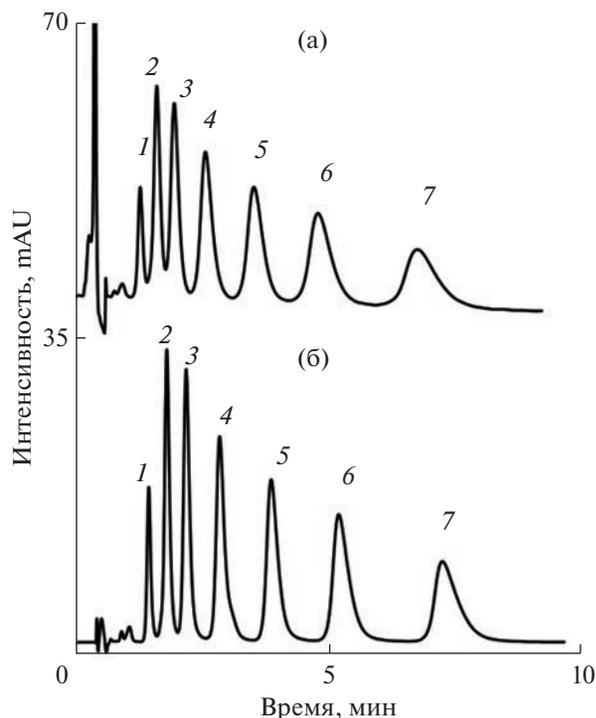


Рис. 5. Хроматограммы модельной смеси алкилбензолов. Сорбенты: П-2Б-Э (а), П-2Б (б); ПФ: H_2O-CH_3CN (20 : 80); УФ-детектирование при 254 нм. 1 – бензол, 2 – толуол, 3 – этилбензол, 4 – пропилбензол, 5 – бутилбензол, 6 – пентилбензол, 7 – гексилбензол.

Стабильность. Для оценки эксплуатационных характеристик полученных сорбентов изучили стабильность модифицированных фаз на основе трех различных матриц с эремомицином в функциональных слоях. Для этого через колонки непрерывно пропускали 10 л подвижной фазы, фиксировали времена удерживания полярных веществ различной природы (витаминов, азотистых оснований и нуклеозидов) через каждый 1 л элюента (рис. 7). Тестовые смеси анализов подбирали индивидуально для каждого сорбента.

Максимальное изменение времен удерживания в процессе использования колонок С-Э, С_А-

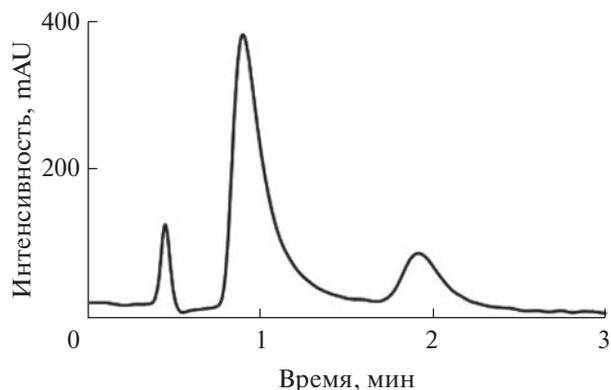


Рис. 6. Хроматограмма смеси энантимеров 4-хлорфенилаланина. ПФ: 10 мМ ААБ с pH 5.2– CH_3CN (60 : 40). Скорость потока – 1 мл/мин.

Б-Э, П-2Б-Э составило 10%, для сильноудерживаемого гуанозина на колонке С_А-Б-Э – 15%. В течение рассматриваемого времени пропускания элюента не отмечено значимых изменений селективности и эффективности для всех неподвижных фаз. Таким образом, полученные сорбенты продемонстрировали достаточную стабильность в ходе эксплуатации.

Изучены три новые неподвижные фазы на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола для гидрофильной хроматографии, модифицированные гликопептидным антибиотиком эремомицином. Показано, что использование антибиотика для создания новых гидрофильных функциональных слоев является перспективным подходом, поскольку приводит к увеличению гидрофильности поверхности разных типов матриц (силикагеля и ПС-ДВБ) и позволяет экранировать их заряд. Предложен способ закрепления эремомицина с помощью спейсера 1,4-БДДГЭ, позволяющий сохранить высокую эффективность сорбентов, модифицированных макромолекулами. Полученные неподвижные фазы на основе ПС-ДВБ являются многофункцио-

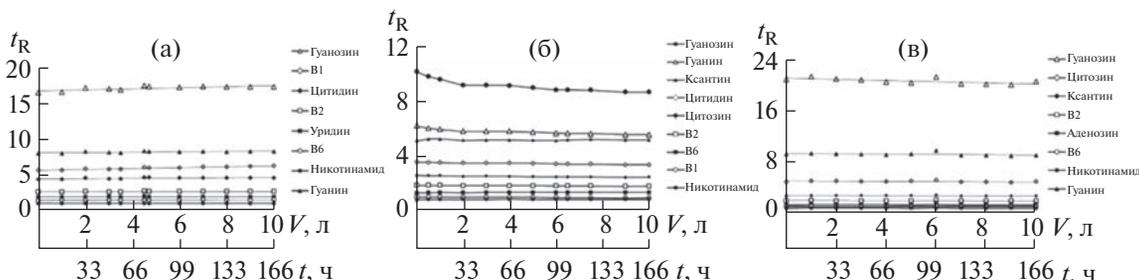


Рис. 7. Изменение времен удерживания полярных веществ в ходе эксплуатации колонок с сорбентами С-Э (а), С_А-Б-Э (б), П-2Б-Э (в); подвижная фаза (а), (б): 100 мМ ААБ с pH 5.4– CH_3CN (12 : 88 для сорбента С-Э, 10 : 90 для сорбента С_А-Б-Э), подвижная фаза (в): 100 мМ АФБ (pH 3.0)– CH_3CN (10 : 90%); УФ-детектирование при 270 нм; скорость потока 1 мл/мин.

нальными и позволяют реализовывать режимы ГИХ, ОФ ВЭЖХ и хиральной хроматографии для определения и разделения как полярных, так и гидрофобных веществ, а также энантиомеров благодаря наличию хирального селектора в функциональном слое.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 20-03-00909, в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды” с использованием оборудования ЦКП МГУ “Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование”, приобретенного МГУ по программе обновления приборной базы в рамках национального проекта “Наука” и в рамках Программы развития МГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Buszewski B., Noga S.* Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – A powerful separation technique // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. P. 231.
2. *Staroverov S.M., Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiyarov G.G., Katrukha G.S., Fedorova G.B.* New chiral stationary phase with macrocyclic glycopeptide antibiotic eremomycin chemically bonded to silica // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1108. P. 263.
3. *Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiyarov G.G., Staroverov S.M.* Sorbents with immobilized glycopeptide antibiotics for separating optical isomers by high-performance liquid chromatography // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. V. 42. P. 536.
4. *Кузнецов М.А., Нестеренко П.Н., Васияров Г.Г., Староверов С.М.* Высокоэффективная жидкостная хроматография энантиомеров α -аминокислот на силикагеле с иммобилизованным эремомицином // *Журн. аналит. химии.* 2008. Т. 63. № 1. С. 64. (*Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiyarov G.G., and Staroverov S.M.* High-performance liquid chromatography of α -amino acid enantiomers on eremomycin-modified silica // *J. Anal. Chem.* 2008. V. 63. № 1. P. 57.)
5. *Шаповалова Е.Н., Федорова И.А., Ананьева И.А., Шпигун О.А.* Макроциклические антибиотики как хиральные селекторы в высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярном электрофорезе // *Журн. аналит. химии.* 2018. Т. 73. № 11. С. 1. (*Shapovalova E.N., Fedorova I.A., Ananieva I.A., Shpigun O.A.* Macrocyclic antibiotics as chiral selectors in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis // *J. Anal. Chem.* 2018. V. 73. № 11. P. 1.)
6. *Li Y., Zhu N., Chen T., Wei M., Ma Y.* Stationary phase based on β -Cyclodextrin and poly(N-isopropylacrylamide) for HILIC and RPLC // *Chromatographia.* 2016. V. 79. P. 29.
7. *Guo Z., Jin Y., Liang T., Liu Y., Xu Q., Liang X., Lei A.* Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a “Click β -cyclodextrin” stationary phase // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 257.
8. *Chikurova N.Yu., Shemiakina A.O., Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V.* Multicomponent Ugi reaction as a tool for fast and easy preparation of stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography. Part I: The influence of attachment and spacing of the functional ligand obtained via the Ugi reaction // *J. Chromatogr. A.* 2022. V. 1666. Article 462804.
9. *Popov A.S., Spiridonov K.A., Uzhel A.S., Smolenkov A.D., Chernobrovkina A.V., Zatirakha A.V.* Prospects of using hyperbranched stationary phase based on poly(styrene-divinylbenzene) in mixed-mode chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2021. V. 1642. Article 462010.
10. *Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Pirogov A.V., Nesterenko P.N., Shpigun O.A.* Preparation and characterization of anion exchangers with dihydroxy-containing alkyl substitutes in the quaternary ammonium functional groups // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1323. P. 104.
11. *Uzhel A.S., Zatirakha A.V., Shchukina O.I., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Covalently-bonded hyperbranched poly(styrene-divinylbenzene)-based anion exchangers for ion chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1470. P. 97.
12. *Uzhel A.S., Zatirakha A.V., Smirnov K.N., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Anion exchangers with negatively charged functionalities in hyperbranched ion-exchange layers for ion chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1482. P. 56.
13. *Uzhel A.S., Gorbovskaia A.V., Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Manipulating selectivity of covalently-bonded hyperbranched anion exchangers toward organic acids. Part I: Influence of primary amine substitutes in the internal part of the functional layer // *J. Chromatogr. A.* 2018. V. 1589. P. 65.
14. *Понов А.С.* Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2022. 175.
15. *Dolci M.* Chromatographic Characterization of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. Runcorn, Cheshire, UK: Thermo Fisher Scientific, 2013.
16. *Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N.* Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. P. 5903.
17. *Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D.* HILIC separation and quantitation of water-soluble vitamins using diol column // *J. Sep. Sci.* 2009. V. 32. P. 909.
18. *Чернобровкина А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Гидрофильная хроматография – перспективный метод определения полярных веществ // *Лаборатория и производство.* Т. 4. № 4. С. 76.
19. *Marrubini G., Pedrali A., Hemstrom P., Jonsson T., Mascolini G.* Column comparison and method development for the analysis of short-chain carboxylic acids by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography with UV detection // *J. Sep. Sci.* 2013. V. 36. P. 3493.
20. *Chen Y., Bicker W., Wu J., Xie M., Lindner W.* Simultaneous determination of 16 nucleosides and nucleobases by hydrophilic interaction chromatography and its application to the quality evaluation of Ganoderma // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. P. 4243.
21. *Tang T., Guo D., Huang S.* Preparation and chromatographic evaluation of the hydrophilic interaction chromatography stationary phase based on nucleosides or nucleotides // *Anal. Methods.* 2021. V. 13. P. 419.