

ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



На правах рукописи

Упыренко Евгений Витальевич

**Разработка стационарной фазы с привитыми
динитроароматическими группами для реализации
смешанных режимов жидкостной хроматографии**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

1.4.2 – Аналитическая химия

Томск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

**Научный
руководитель:**

Бакибаев Абдигали Абдиманатович

д.х.н., профессор

**Официальные
оппоненты:**

Лосев Владимир Николаевич

д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник научной лаборатории № 2 ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»

Нестеренко Павел Николаевич

д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории адсорбции и катализа ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Защита состоится « 29 » июня 2026 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета ДС.ТПУ.08 Национального исследовательского Томского политехнического университета по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 43а, 2 корпус ТПУ



С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Томского политехнического университета и на сайте dis.tpu.ru при помощи QR-кода.

Автореферат разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДС.ТПУ.08
кандидат химических наук, доцент

A handwritten signature in blue ink that reads "Е.В. Дорожко".

Дорожко Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Значительное количество физиологически активных, токсичных и эндогенных веществ содержат в своем составе ароматическую функциональную группу, которая, как правило, имеет гидрофобный характер и поглощает излучение в ультрафиолетовой области. Благодаря этому обращенно-фазовый режим ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детектированием получил распространение для исследования органических соединений, содержащих ароматическую группу. В основе ОФ-ВЭЖХ лежат гидрофобный эффект и дисперсионные взаимодействия, которые имеют аддитивный, универсальный и ненаправленный характер. Однако, это обуславливает не только преимущества данного режима, но и недостатки, такие как неудовлетворительные удерживание и селективность для полярных органических соединений. Эффективным решением данной проблемы является использование мультимодальных стационарных фаз, содержащих на поверхности несколько функциональных групп (селекторов), что позволяет реализовать несколько типов химических взаимодействий сорбат-сорбент.

Мультимодальные стационарные фазы с ароматическими функциональными группами позволяют реализовать специфичные π -взаимодействия. Электронодефицитные ароматические группы, содержащие электроноакцепторные заместители, обеспечивают более сильные π -взаимодействия, чем электроно-насыщенные ароматические группы. Однако, наиболее часто используемые стационарные фазы для ОФ-ВЭЖХ содержат ароматические группы, не обеспечивающие достаточно сильные π -взаимодействия. Кроме того, ацетонитрил (CH_3CN) – наиболее распространенный растворитель в ВЭЖХ – в значительной степени подавляет π -взаимодействия между сорбатом и сорбентом, содержащими ароматические группы.

В связи с этим, разработка стационарных фаз с электронодефицитными ароматическими группами и поиск других способов реализации сильных π -взаимодействий в жидкостной хроматографии для увеличения селективности разделения веществ, содержащих ароматическую группу, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования. Представлено широкое разнообразие стационарных фаз с ароматическими селекторами, но наиболее используемыми остаются фенильная и пентафторфенильная фазы. Существует большое число работ по разработке и исследованию стационарных фаз, содержащих две и более нитрогрупп (табл. 1). Однако, применение данных фаз ограничено небольшим количеством исследовательских работ XX века, в которых представлено определение полиароматических углеводородов в нормально-фазовом режиме ВЭЖХ. Коммерчески доступные стационарные фазы подобного типа не имеют описанных случаев применения в ОФ-ВЭЖХ.

Таблица 1 – Стационарные фазы для ВЭЖХ, содержащие ароматические селекторы, замещенные двумя и более нитрогруппами

Ароматическая группа	Производитель или научно-исследовательская группа
3,5-Динитроанилин	«PrincetonSFC DNP» Princeton Chromatography,
Динитроанилин	«Chromegabond DNAP» PerkinElmer
3,5-Динитрофенил	«SUMIPAX DI-NO2 SG» Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.
3,5-Динитробензамид	«Whelk-O®1» Regis Technologies; «DACH-DNB» Regis Technologies
2,4-Динитрофенлаланин	V. Schurig, D. Wistuba, G. Jung et al
2,4-Динитроанилин	L. Nondek, J. Málek; P. Ghosh, B. Chawla, P. Joshi et al
2,4-Динитроанилин и толуолсульфонат серебра	J.C. Putman, S.M. Rowland, D.C. Podgorski et al
Тетранитробифенил	J.T. Ayres, C.K. Mann; G. Smets, V. Balogh, Y. Castrill
2,4-Динитроанилин	K.J. Welch, N.E. Hoffman
3,5-Динитробензоил- меркаптопропил	
2,4-Динитрофенил- меркаптопропил	
Пикрилмеркаптопропил	
2,4-Динитроанилин	L. Nondek
2,4,6-Тринитроанилин	
3,5-Динитробензамид	
2,4,6-Тринитрофенил- пропионат	
2,4,7,9-Тетранитро- флуореноксим	H. Klaar, H. Hemetsberger, H. Ricken
2,4,5,7-Тетранитро- флуоренимин	C.H. Lochmüller, R.R. Ryall, C.W. Amoss

Цель работы – разработка стационарной фазы с привитыми динитроароматическими группами для реализации смешанного режима жидкостной хроматографии, обеспечивающей эффективное удерживание и селективность в отношении ароматических соединений различной полярности.

Для достижения поставленной цели сформулированы и решены следующие **задачи**:

1. Установить элюотропный ряд для параллельно-смещенных стэкингowych π -взаимодействий, обеспечивающий понимание возможности управления силой π -взаимодействий и селективностью при разработке хроматографических методик, селективных в отношении ароматических соединений.

2. Разработать и синтезировать электронодефицитный динитрозамещенный ароматический селектор и обеспечить методологический подход к получению стационарной фазы на основе силикагеля с использованием силанизирующего агента. Провести контроль этапов синтеза современными физико-химическими методами анализа (ВЭЖХ-УФ, ЯМР-спектроскопия, термогравиметрия).

3. Исследовать хроматографическую селективность разработанной стационарной фазы, содержащей электронодефицитный динитрозамещенный ароматический селектор, с помощью тест-набора веществ-маркеров, содержащих ароматические группы различного характера, в сравнении с коммерчески доступными аналогами.

4. Оценить практическую применимость разработанной стационарной фазы для совместного определения органических веществ, содержащих ароматические группы и имеющих слабое удерживание в обращенно-фазовом режиме ВЭЖХ, в реальных объектах (на примере активных фармацевтических субстанций и многокомпонентных лекарственных препаратов). Провести валидацию разработанной методики по ключевым показателям (линейность, правильность, прецизионность, оценка пределов обнаружения и количественного определения).

Научная новизна.

1. Разработана с применением подхода Welch и впервые исследована в смешанном ОФ-ВЭЖХ режиме с π -взаимодействиями стационарная фаза, содержащая динитрозамещенный ароматический селектор.

2. Впервые установлен элюотропный ряд на основе 30 растворителей для хроматографического режима, основанного на параллельно-смещенных стэкинг- π -взаимодействиях.

3. Продемонстрирована возможность специфичного определения ароматических веществ различной полярности в изократическом режиме элюирования на примере многокомпонентных лекарственных средств.

4. Впервые продемонстрирована возможность применения стационарной фазы, содержащей динитрозамещенный ароматический селектор, для специфичного определения АФС, содержащих ароматическую группу, в присутствии мешающих липофильных компонентов матрицы на примере лиофилизированной сыворотки крови.

5. Исследована хроматографическая селективность стационарной фазы, содержащей динитрозамещенный ароматический селектор, при использовании набора веществ-маркеров и некоторых наиболее популярных в ОФ-ВЭЖХ растворителей в сравнении с коммерчески доступными стационарными фазами.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

1. Показана возможность использования разработанной стационарной фазы для специфичного одновременного определения методом жидкостной

хроматографии молекул различной полярности, содержащих ароматическую группу, в изократическом режиме элюирования.

2. Экспериментально подтверждена способность разработанной стационарной фазы специфично определять вещества, содержащие ароматическую группу и полярные заместители, в присутствии липофильных компонентов матрицы, таких как плазма крови, лиофилизированная сыворотка крови, растительные и животные жиры, липофильные и полимерные вспомогательные компоненты и др.

3. Предложено использовать установленный элюотропный ряд, основанный на параллельно-смещенных стэкингowych π -взаимодействиях, для управления удерживанием и хроматографической селективностью в отношении ароматических веществ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспериментально установленный элюотропный ряд на основе 30 растворителей для режима жидкостной хроматографии, основанного на параллельно-смещенных стэкингowych π -взаимодействиях, с использованием пиренэтильной стационарной фазы, подвижной фазы состава *n*-гексан – изопропанол (60:40) и 1,3-динитробензола как вещества маркера π -взаимодействий позволяет регулировать силу π -взаимодействий, удерживание и хроматографическую селективность в отношении веществ, содержащих ароматическую группу. Протонные и алифатические растворители обеспечивают реализацию наиболее сильных π -взаимодействий при использовании их в составе подвижной фазы в качестве основного компонента. Высокополярные растворители и простые эфиры обладают высокой элюирующей силой, что позволяет использовать их в качестве добавки для управления селективностью.

2. Путем реакции 2,4-динитрохлорбензола и (3-аминопропил)триметоксисилана с последующей модификацией поверхности полностью пористого силикагеля может быть получена стационарная фаза с динитрозамещенным ароматическим селектором для жидкостной хроматографии, обеспечивающая реализацию сильных π -взаимодействий. Контроль этапов получения стационарной фазы методами ВЭЖХ-УФ, ЯМР-спектроскопии (получение силанизирующего агента) и синхронного термогравиметрического анализа (прививка силанизирующего агента на поверхность силикагеля) подтверждает успешность данного способа.

3. Разработанная стационарная фаза с динитрозамещенным ароматическим селектором демонстрирует возможность реализации высокого удерживания и хроматографической селективности для веществ, содержащих конденсированную ароматическую группу или ароматическую группу с полярными заместителями, при работе в смешанном ОФ-ВЭЖХ режиме жидкостной хроматографии с π -взаимодействиями. Данное преимущество представлено на примере набора веществ-маркеров, содержащих ароматическую группу

различного характера (кофеин, 1,3-динитробензол, 1,2-диметилбензол и нафталин), при использовании наиболее распространённых органических растворителей, используемых в ОФ-ВЭЖХ (ацетонитрил, метанол, изопропанол, тетрагидрофуран), в диапазоне 20–95 % *об.*, по сравнению с коммерчески доступными стационарными фазами, предназначенными для работы в обращенно-фазовом режиме (C8 и C18), в том числе фазами, содержащими ароматические селекторы (фенилгексилная, пентафторфенильная и пиренэтильная).

4. Разработанная стационарная фаза с динитрозамещенным ароматическим селектором позволяет более селективно проводить одновременное определение гидрофобных и полярных органических веществ, содержащих ароматическую группу, в изократическом режиме элюирования на примере активных действующих веществ многокомпонентных лекарственных препаратов «Пенталгин», «Пенталгин НЕО», «Цефекон Н» и «Ибуклин» за счет реализации сильных π -взаимодействий. Оценка метрологических параметров разработанной методики для препарата «Ибуклин» по показателям: линейность, правильность, прецизионность, оценка пределов обнаружения и количественного определения подтвердила возможность получения достоверных результатов с использованием разработанной стационарной фазы.

Достоверность результатов работы подтверждается тем, что данные получены с использованием современного аналитического оборудования, прошедшего своевременную метрологическую поверку. Идентификация соединений и подтверждение их структуры проведены с использованием инструментальных физико-химических методов анализа, методики анализа апробированы на реальных исследуемых объектах.

Личный вклад автора заключается в планировании и разработке дизайна экспериментов, непосредственном проведении исследований, получении и интерпретации данных, оформлении результатов исследований, подготовке публикаций и текста диссертации.

Апробация результатов. Результаты работ представлены на XXI и XXII Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2024, 2025), XXVI Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2025), I-ой Всероссийской конференции «Актуальные вопросы фотоуправляемых и фармакологически активных соединений», приуроченной к 300-летию РАН и празднованию 125-летия Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова (Москва, 2025).

Публикации по результатам работы. По теме диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК и входящих в наукометрические базы данных Scopus и Web of Science, тезисы 7 докладов, представленных на международных научных конференциях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертационная работа изложена на 149 страницах, содержит 46 рисунков, 49 таблиц, 16 приложений.

Во **введении** обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель и задачи исследования, показаны новизна и значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** представлен обзор литературы, в котором кратко изложены: основные недостатки и проблемы ОФ-ВЭЖХ как одного из наиболее популярных режимов; существующие наиболее распространенные и эффективные способы решения проблем, в том числе использование мультимодальных стационарных фаз, в частности содержащих ароматические селекторы; уникальность и разнообразие π -взаимодействий.

Во **второй главе** описана экспериментальная часть работы: использованное в работе оборудование, реактивы, материалы и методики.

В **разделе 1 главы 3** обсуждается экспериментально установленный элюотропный ряд для режима жидкостной хроматографии с параллельно-смещенными стэкинговыми π -взаимодействиями. Суть эксперимента заключается в удерживании 1,3-динитробензола (1,3-ДНБ) на пиренэтильной стационарной фазе при использовании в качестве подвижной фазы состава *n*-гексан – изопропанол (60 : 40 об./об.), часть которого замещалась исследуемым растворителем (1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 15 % и 20 об.). Для агрессивных или ограниченно смешивающихся с составом *n*-гексан – изопропанол (60 : 40 об./об.) растворителей исследован меньший объем.

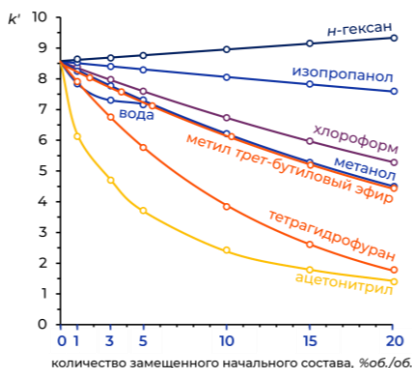


Рисунок 1 – График зависимости k' 1,3-ДНБ от объема замещенного начального состава *n*-гексан – ИПС (60:40) (об./об.).

Зависимости коэффициента удерживания k' 1,3-ДНБ от типа и количества наиболее важных в ОФ-ВЭЖХ растворителей представлены на рис. 1 и в табл. 2 и демонстрируют элюирующую силу растворителей для режима ВЭЖХ с параллельно-смещенными стэкинговыми π -взаимодействиями. Элюирующая сила растворителей увеличивается с уменьшением гидрофобной части молекулы и увеличением полярности (рис. 1). **Алканы** продемонстрировали увеличение удерживания 1,3-ДНБ при замене начального состава подвижной фазы. Это связано с уменьшением содержания изопропанола в начальной

подвижной фазе, имеющего большую элюирующую силу. **Протонные растворители** (карбоновые кислоты, спирты и вода) имеют широкий диапазон элюирующей силы, которая увеличивается с уменьшением длины углеводородной цепи. Элюирующая сила **ароматических растворителей** увеличивается в ряду бензол < толуол < ксилол, что можно объяснить увеличением электронной плотности молекул ароматического растворителя при введении электроно-донорных заместителей и конкурентными π -взаимодействиями с 1,3-ДНБ. Элюирующая сила галогеналканов увеличивается с уменьшением гидрофобности молекулы растворителя. **Сложные эфиры** (этилацетат и бутилацетат) имеют сравнительно высокую элюирующую силу, которая растёт с увеличением полярности. **Простые эфиры** (метил *трет*-бутиловый эфир, тетрагидрофуран (ТГФ) и 1,4-диоксан) обладают высокой элюирующей силой в широком диапазоне, что может быть связано с наличием двух неподеленных электронных пар на атоме кислорода и высоким дипольным моментом данных растворителей. **Высокополярные растворители** имеют наибольшую элюирующую силу. Кривая зависимости приобретает гиперболическую форму, что можно объяснить долгим временем адсорбции на поверхности пиренэтильного селектора и блокированию возможности его взаимодействия с 1,3-ДНБ.

Таблица 2 – Экспериментально полученные данные элюирующей силы растворителей для параллельно-смещенных стэкинг-взаимодействий

Растворитель	Тип	Коэффициент удерживания k'_{13DNB}						
		Количество замещенного начального состава подвижной фазы <i>n</i> -гексан – изопропанол (60:40), об./об.).						
		0	1	3	5	10	15	20
<i>n</i> -Гексан	Алифатические	8,56	8,60	8,63	8,66	8,92	9,20	9,51
Изопропанол	Протонные		8,50	8,40	8,30	8,05	7,80	7,59
Вода			7,85	7,35	7,18	—	—	—
Метанол			8,12	7,58	7,08	6,05	5,27	4,70
Хлороформ	Галогеналканы		8,35	7,95	7,55	6,65	5,85	5,11
Метил <i>трет</i> - бутиловый эфир	Простые эфиры		8,29	7,70	7,14	6,00	5,18	4,56
Тетрагидрофуран			7,50	6,10	5,10	3,51	2,56	1,98
Ацетонитрил	Высокополярные		6,1	4,5	3,5	2,38	1,79	1,43

В разделе 2 главы 3 описаны результаты эксперимента с применением подхода Welch «иммобилизованный гость» по выбору структуры ароматического селектора стационарной фазы, обеспечивающего наиболее сильные π -взаимодействия. В качестве потенциальных селекторов исследован ряд ароматических веществ, которые удерживали на пиренэтильной стационарной фазе при использовании подвижной фазы *n*-гексан – изопропанол (60 : 40). В ходе

эксперимента установлено, что динитроароматические соединения демонстрируют наибольшее удерживание и, таким образом, являются наиболее перспективными ароматическими селекторами (рис. 2). В качестве ароматического селектора выбран *N*-алкил-2,4-динитроанилин.

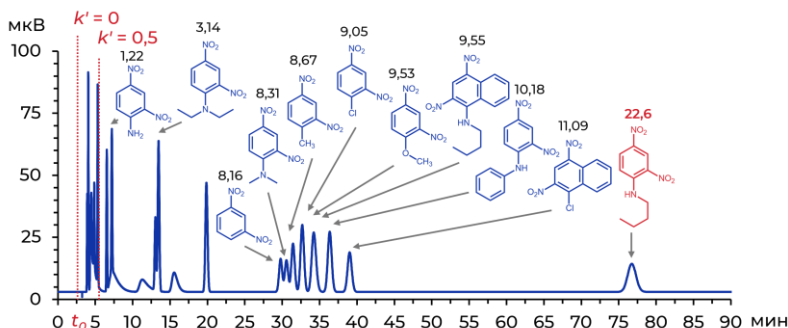


Рисунок 2 – Смоделированная хроматограмма на основе экспериментально полученных значений коэффициентов удерживания и асимметрии пиков исследованных потенциальных ароматических селекторов на пиренэтильной стационарной фазе и соответствующие коэффициенты удерживания

В разделе 3 главы 3 представлен процесс получения стационарной фазы с ароматическим селектором, включающий 3 этапа: (1) получение силанизирующего модификатора, содержащего ароматическую группу; (2) прививку модификатора на поверхность силикагеля; (3) упаковку колонки модифицированным силикагелем. Для получения силанизирующего модификатора с ароматической группой использованы 1-хлор-2,4-динитробензол (2,4-ДНХБ) и (3-аминопропил)триметоксисилан (АПТМС) (рис. 3). Реакция получения модификатора, получившего название «AWE-241» (2,4-динитрозамещенный моноциклический селектор) протекает с присоединением одной молекулы 2,4-ДНХБ к молекуле АПТМС. Структура селектора обуславливает гидрофобные свойства стационарной фазы и возможность работы в смешанном режиме ОФ-ВЭЖХ. Контроль получения силанизирующего модификатора AWE-241 осуществлялся методом ВЭЖХ-УФ по отсутствию на хроматограмме пика 2,4-ДНХБ и методом ЯМР-спектроскопии по изменению значений химического сдвига полученного модификатора и 2,4-ДНХБ. Контроль модификации силикагеля осуществлялся методом синхронного термогравиметрического анализа, доля органического вещества в результате модификации составила 8,7 %. Удерживание кофеина ($k' = 2,1$) также свидетельствует о прививке селектора (рис. 4). Качество набивки колонки оценивали по числу теоретических тарелок N и асимметрии пика A_s (5 %) для кофеина и напроксена (рис. 4).

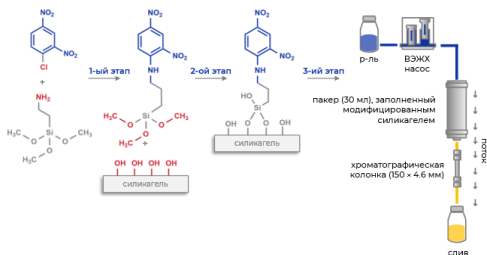


Рисунок 3 – Схема получения стационарной фазы AWE-241: 1-ый этап: АПТМС, 2,4-ДНХБ, ТЭА, толуол, УЗО 5 мин; 2-ой этап: силикагель, модификатор AWE-241, толуол, 80°C, 8 ч; 3-ий этап: суспендирование модифицированного силикагеля в растворителе с помощью УЗО, упаковка.

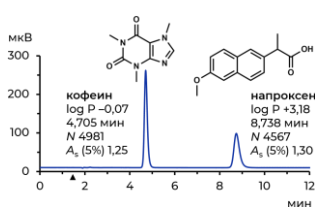


Рисунок 4 – Хроматограмма смеси кофеина и напроксена для оценки прививки и качества упаковки колонки AWE-241. Подвижная фаза: 0,1 % *o*-фосфорная к-та – CH₃CN – MeOH (40:5:55); T = 35 °C; F = 1 мл/мин; λ = 230 нм; V = 2 мкл.

В разделе 4.2 главы 3 продемонстрировано влияние типа и содержания органического растворителя (**метанол, изопропанол**) в составе подвижной фазы на возможность реализации и вклад π -взаимодействий в механизм разделения. Эксперимент проводился с использованием веществ-маркеров (**кофеин; 1,3-ДНБ; 1,2-диметилбензол; нафталин**) на фазе AWE-241 в сравнении с октисилильной (C8) фазой, не обеспечивающей реализацию π -взаимодействий. Результаты эксперимента представлены в виде графиков зависимости коэффициента удерживания от типа и содержания органического растворителя (рис. 5). 1,2-Диметилбензол и нафталин представляют электрононасыщенные ароматические системы со схожими значениями гидрофобности. Однако, конденсированная система нафталина обеспечивает удерживание за счет дисперсионных и π -взаимодействий, тогда как 1,2-диметилбензол удерживается преимущественно по ОФ-ВЭЖХ механизму. Кофеин и 1,3-ДНБ представляют собой электронодефицитные ароматические группы различной полярности с высоким дипольным моментом и позволяют оценить вклад π -взаимодействий и диполь-дипольных взаимодействий.

Метанол обладает средней элюирующей силой как в ОФ-ВЭЖХ, так и в режиме с π -взаимодействиями, обеспечивая высокое удерживание и селективность для веществ, содержащих ароматическую группу. Данное явление прослеживается в виде экспоненциального роста удерживания нафталина при уменьшении содержания метанола в составе подвижной фазы, а также в результате изменения порядка элюирования 1,2-диметилбензола, кофеина и 1,3-ДНБ (рис. 5, а). Данная закономерность, а также более высокие значения удерживания электронодефицитных ароматических групп, таких как 1,3-ДНБ и кофеин

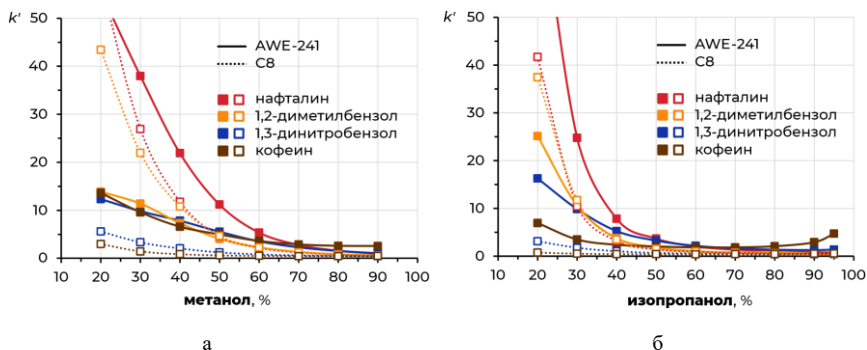


Рисунок 5 – Графики зависимости k' веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и состава подвижной фазы: а – МеОН – вода; б – ИПС – вода. Условные обозначения: сплошная линия с закрашенными квадратами – фаза AWE-241; прерывистая линия с пустыми квадратами – фаза C8.

по сравнению с 1,2-диметилбензолом при работе на стационарной фазе AWE-241 говорят о значительном вкладе π -взаимодействий в механизм удерживания. Это обеспечивает «гибкость» смешанного ОФ-ВЭЖХ режима с π -взаимодействиями при работе на стационарной фазе AWE-241. При использовании подвижной фазы на основе **изопропанола** наблюдается сильное удерживание для всех веществ-маркеров, за исключением 1,2-диметилбензола, несмотря на высокую элюирующую силу ИПС в ОФ-ВЭЖХ (рис. 5, б). Для нафталина – бициклической ароматической группы – наблюдается экспоненциальный рост удерживания при уменьшении содержания ИПС по сравнению с 1,2-диметилбензолом, несмотря на близкие значения гидрофобности. Данная зависимость обусловлена синергическим эффектом дисперсионных взаимодействий, гидрофобного эффекта и π -взаимодействий для нафталина и демонстрирует вклад π -взаимодействий в механизм удерживания. При высоком (> 90 % об.) содержании ИПС в подвижной фазе увеличивается удерживание ароматических веществ, имеющих высокий дипольный момент и содержащих полярные группы (кофеин и 1,3-ДНБ). Кривая зависимости k' от содержания ИПС в подвижной фазе принимает параболическую форму, что можно объяснить удерживанием за счет диполь-дипольных взаимодействий.

В **разделе 4.3 главы 3** представлены результаты исследования динитроароматической стационарной фазы AWE-241 в сравнении с коммерческими аналогами: C8, C18, фенилгексильной, пентафторфенильной и пиренэтильной (табл. 3). В качестве подвижной фазы выбран состав МеОН – 0,1 % *о*-фосфорная к-та (65:35).

C8 и **C18** стационарные фазы обеспечивают удерживание веществ в соответствии с их значениями гидрофобности в ряду кофеин < 1,3-ДНБ < нафталин, 1,2-диметилбензол (табл. 3). Полярные вещества, такие как кофеин и 1,3-ДНБ, демонстрируют недостаточное удерживание ($k' < 1,0$) в данных условиях. При этом неполярные вещества, имеющие близкие значения гидрофобности (1,2-диметилбензол и нафталин), имеют недостаточное разрешение в данных условиях. Популярны коммерческие стационарные фазы, содержащие ароматические группы, такие как **пентафторфенильная** и **фенилгексильная** фазы, также не обеспечивают реализацию сильных π -взаимодействий в данных условиях, о чем свидетельствует аналогичный по сравнению с **C8** и **C18** порядок элюирования и недостаточное удерживание кофеина. Фенилгексильная фаза демонстрирует большее удерживание по сравнению с пентафторфенильной, вызванное гидрофобным гексильным линкером. Фаза **AWE-241** обеспечивает ортогональную селективность для исследованных веществ-маркеров, порядок элюирования которых определяется природой ароматической группы (табл. 3). Данная особенность позволяет удерживать как электрононасыщенные конденсированные (нафталин), так и электронодефицитные ароматические группы (кофеин, 1,3-ДНБ). Однако, для моноароматических соединений, не содержащих полярные заместители, таких как 1,2-диметилбензол, не реализуются сильные π -взаимодействия. **Пиренэтильная** стационарная фаза по сравнению с **AWE-241** обеспечивает более сильное удерживание для электронодефицитных ароматических групп, но не обеспечивает удерживание электрононасыщенных ароматических групп за счет π -взаимодействий.

Таблица 3 – Значения коэффициента удерживания веществ-маркеров на исследованных стационарных фазах

Вещество-маркер	Значения коэффициента удерживания k'					
	C8	C18	AWE-241	Phehyl	PFP	PYE
<i>Кофеин</i>	0,45	0,55	2,46	0,46	0,64	11,66
<i>1,3-ДНБ</i>	0,82	1,20	2,17	1,92	1,28	20,32
<i>1,2-Диметилбензол</i>	2,30	4,64	1,41	3,27	2,77	3,04
<i>Нафталин</i>	2,04	4,62	2,84	3,74	3,07	3,95

В разделе 5.1 главы 3 показано применение стационарной фазы **AWE-241** для одновременного определения ароматических веществ различной полярности в изократическом режиме элюирования. Данная фаза обеспечивает удерживание полярных веществ, имеющих недостаточное удерживание, при работе в ОФ-ВЭЖХ, за счет реализации π -взаимодействий (рис. 5, а и б), что позволяет более специфично определять полярные вещества, содержащие ароматическую группу, и избежать градиентного режима элюирования при одновременном определении полярных и гидрофобных веществ.

Данное преимущество фазы AWE-241 продемонстрировано на примере определения действующих веществ многокомпонентного лекарственного препарата «Пенталгин НЕО» (рис. 7). Удержание и разделение нейтральных слабополярных веществ, таких как кофеин и парацетамол, представляет сложную задачу при работе в ОФ-ВЭЖХ и HILIC режимах. Для элюции гидрофобных компонентов, таких как напроксен, потребуется градиентный режим элюирования. Реализация π -взаимодействий на фазе AWE-241 делает возможным удержание и разделение полярных и гидрофобного компонентов «Пенталгин НЕО» в изократическом режиме элюирования. В сравнении с C18 стационарной фазой достигается более высокое удержание и разрешение, а при изменении состава подвижной фазы происходит обращение порядка элюирования, что свидетельствует о «гибкости» реализуемого смешанного режима.

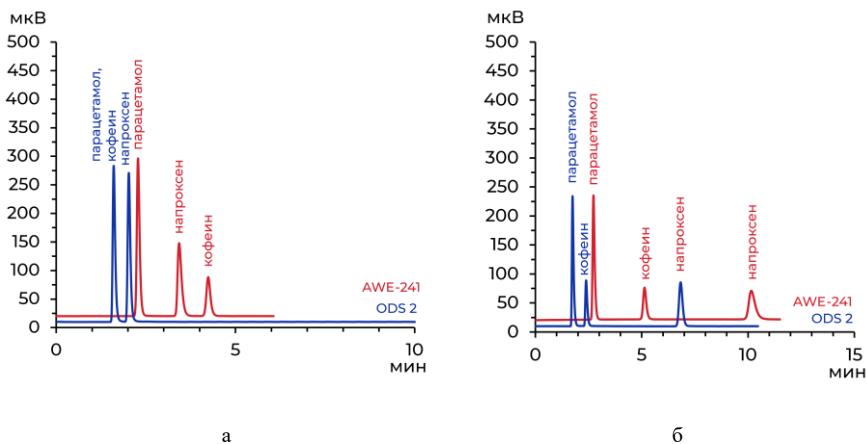


Рисунок 7 – Хроматограммы лекарственного препарата «Пенталгин НЕО»: подвижная фаза: а – метанол – 0,1 % *о*-фосфорная к-та (90:10); б – метанол – 0,1 % *о*-фосфорная к-та (60:40).

Условные обозначения: **синяя линия** – стационарная фаза Spherisorb ODS-2 150 × 4,6 мм,

5 мкм (Waters); **красная линия** – стационарная фаза AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм.

$F = 1$ мл/мин; $\lambda = 230$ нм; $T = 30$ °C; $V = 2$ мкл.

В разделе 5.2 главы 3 продемонстрирована возможность практического применения разработанной стационарной фазы на примере определения физиологически активных веществ в лиофилизованной сыворотке крови. Растворители, такие как изопропанол и гексан, позволяют реализовать специфические π -взаимодействия (рис. 1 и 5) и обладают высокой элюирующей силой в ОФ-ВЭЖХ, обеспечивая элюцию гидрофобных веществ. Это позволяет использовать фазу AWE-241 для специфичного определения физиологически активных веществ,

содержащих ароматические и полярные группы, при одновременном элюировании липофильных компонентов матрицы около «мёртвого времени» ($k' < 1$). Липофильные компоненты могут включать гидрофобные вспомогательные вещества лекарственных форм (свечи, суппозитории, мази, крема, масла), липиды плазмы крови и др. биологических объектов, а также пищевых продуктов (жиры молока, масла и др.).

Данная возможность продемонстрирована на примере определения АФС нитразепама (рис. 6, а) и мелоксикама (рис. 6, б) на уровне 0,1 мг/мл в лиофилизированной сыворотке крови. Процедура пробоподготовки включает минимально необходимые этапы: осаждение белков пробы и центрифугирование.

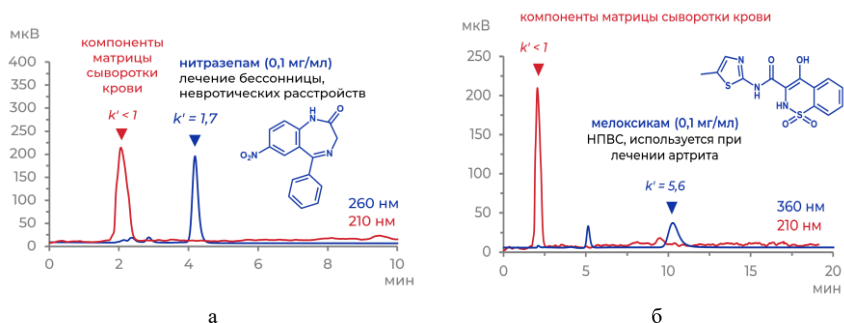


Рисунок 6 – Хроматограммы АФС в присутствии липофильных компонентов лиофилизированной сыворотки крови: **красная линия** – хроматограмма бланка лиофилизированной сыворотки крови ($\lambda = 210$ нм); **синяя линия** – хроматограмма модельной смеси АФС на уровне 0,1 мг/мл в лиофилизированной сыворотки крови:
а – нитразепама, $\lambda = 260$ нм; б – мелоксикама, $\lambda = 360$ нм. Стационарная фаза: AWE-241 $150 \times 4,6$ мм, 5 мкм; подвижная фаза: ИПС – 0,1 % H_3PO_4 (90:10);
 $F = 1$ мл/мин; $T = 30$ °C; $V = 10$ мкл.

Преимущество фазы AWE-241 также продемонстрировано в **разделе 6 главы 3** на примере определения действующих веществ многокомпонентного лекарственного препарата «Ибуклин» – парацетамола и ибупрофена. Для воспроизводимого и точного определения веществ рекомендуемый $k' > 1,0$. С другой стороны, рекомендуемый $k' < 10$, так как дальнейшее увеличение удерживания не приводит к приросту параметра разрешения R_s . В существующих работах по одновременному определению парацетамола и ибупрофена методом ВЭЖХ используется подвижная фаза с высоким значением pH (около 7,5). При этом парацетамол имеет недостаточное удерживание, что приводит к недостаточному разрешению с рано элюирующимися пиками и некорректным результатам количественного определения. В некоторых работах для элюирования ибупрофена используется градиентный режим. В сравнении с коммерческими аналогами, фаза

AWE-241 обеспечивает селективное одновременное определение полярных и гидрофобных веществ, содержащих ароматическую группу (на примере парацетамола и ибупрофена), обеспечивая оптимальные значения k' без необходимости градиентного элюирования (табл. 5).

Таблица 5 – Значения коэффициентов удерживания k' парацетамола и ибупрофена на исследованных стационарных фазах*

Стационарная фаза	k'	
	Парацетамол	Ибупрофен
<i>рекомендуемые требования</i>	> 1	< 10
AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм	1,67	9,33
XBridge C8 50 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Waters)	0,61	81,71
Spherisorb ODS 2 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Waters)	0,54	142,05
Luna PFP(2) 150 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Phenomenex)	0,85	93,03
Zorbax Phenyl-hexyl 150 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Agilent)	0,42	138,47
COSMOSIL 5PYE 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Nacalai Tesque)	0,98	139,54

*подвижная фаза метанол – фосфат аммония (50 mM, pH 3,2) (40:60);

$F = 1,0$ мл/мин, $V = 40$ мкл, $T = 30$ °C; $\lambda = 220$ нм.

Для апробации разработанной стационарной фазы проведена оценка ключевых метрологических характеристик методики количественного определения парацетамола и ибупрофена при их одновременном присутствии в пробе с использованием рекомендаций по межгосударственной стандартизации РМГ-61 2010. **Линейность** зависимости отклика УФ-детектора от концентрации действующего вещества исследована с помощью АФС парацетамола (в диапазоне от 0,02 мг/мл до 0,4 мг/мл) и ибупрофена (в диапазоне от 0,02 мг/мл до 0,5 мг/мл) на основании 7 точек, ($n = 3$; $P = 0,95$) (рис. 8). Коэффициент корреляции R^2 составил 0,9999 для парацетамола и 0,9998 для ибупрофена. Линейное уравнение для парацетамола имеет вид $S = 20792 \cdot C$ и для ибупрофена $S = 28281 \cdot C$. **Предел количественного определения (ПКО)** и **предел обнаружения (ПО)** определяли на АФС с помощью программного обеспечения на основе метода ASTM. ПКО составил 0,6 мкг/мл для парацетамола и 2,0 мкг/мл для ибупрофена, ПО – 0,3 мкг/мл для парацетамола и 0,7 мкг/мл для ибупрофена. **Повторяемость и прецизионность** оценивали независимо два аналитика на разных хроматографах, по 3 испытуемых раствора, в разные дни, с использованием различной подвижной фазы с помощью АФС. Для оценки повторяемости использовали значения относительных среднеквадратических отклонений (RSD), характеризующие повторяемость результатов единичного анализа параллельных определений (0,79 для парацетамола и 0,53 для ибупрофена) и RSD результатов анализа, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности (0,94 для парацетамола и 0,66 для ибупрофена). **Правильность** определения методики контролировали методом добавок АФС. Правильность методики оценивали на основании рассчитанных значений

коэффициента Стьюдента $t_{\text{эксп}}$, которые составили 0,08 для парацетамола и 2,17 для ибупрофена ($t_{\text{табл}} = 2,78$; $n = 5$; $P = 0,95$) (рис. 9). Для парацетамола и ибупрофена определены значения найденных концентраций и доверительные интервалы (рис. 9).

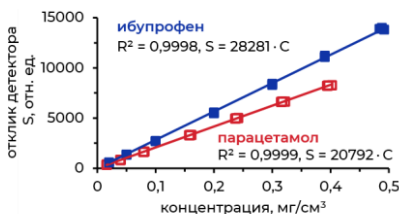


Рисунок 8 – Градуировочные зависимости для определения парацетамола (□) и ибупрофена (■)

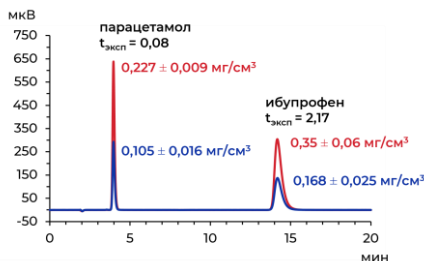


Рисунок 9 – Хроматограммы испытуемого раствора (синий цвет) и испытуемого раствора с добавкой (красный цвет).

Выводы

1. Установлен элюотропный ряд для режима жидкостной хроматографии с параллельно-смещенными стэкингowymi π -взаимодействиями с использованием 1,3-ДНБ как вещества-маркера π -взаимодействий, пиренэтильной стационарной фазы и подвижной фазы состава *n*-гексан – изопропанол (60:40).
2. Протонные (вода и спирты) и алифатические растворители (*n*-гексан) обеспечивают реализацию наиболее сильных π -взаимодействий. Высокополярные растворители (ацетонитрил и др.) и простые эфиры (тетрагидрофуран и др.) обладают высокой элюирующей силой, что позволяет использовать их в качестве добавки для управления силой π -взаимодействий и селективностью.
3. С помощью подхода Welch установлено, что использование *N*-пропилзамещенной 2,4-динитроанилиновой группы в качестве селектора обеспечивает реализацию наиболее сильных π -взаимодействий.
4. Получена стационарная фаза на основе силикагеля, содержащая привитый *N*-пропилзамещенный 2,4-динитроанилиновый селектор, для работы в смешанном режиме жидкостной хроматографии с π -взаимодействиями. Контроль получения стационарной фазы методами ВЭЖХ-УФ, ЯМР-спектроскопии, синхронного термогравиметрического анализа свидетельствуют об успешности получения разработанной фазы.
5. С помощью веществ-маркеров оценена хроматографическая селективность разработанной стационарной фазы для ВЭЖХ растворителей (CH₃CN, ТГФ, ИПС, MeOH) в сравнении с коммерчески доступными стационарными фазами: C8, C18,

фенилгексильной, пентафторфенильной, пиренэтильной. Продemonстрировано, что фаза AWE-241 обладает высокой селективностью по отношению к веществам, содержащим ароматическую и полярные группы, в особенности к электронодефицитным (кофеин, 1,3-ДНБ) или конденсированным (нафталин) ароматическим группам.

6. Показана возможность специфичного определения физиологически активных веществ, содержащих ароматическую группу и полярные группы, в присутствии липофильных компонентов матрицы в изократическом режиме элюирования с использованием подвижной фазы на основе ИПС.

7. Показана возможность одновременного селективного определения ароматических веществ различной полярности в изократическом режиме элюирования на примере действующих веществ многокомпонентных лекарственных средств («Пенталгин», «Пенталгин НЕО», «Цефекон Н» и «Ибуклин»).

8. Оценены основные метрологические параметры разработанной методики одновременного определения действующих веществ лекарственного препарата «Ибуклин» по показателям: линейность, правильность, прецизионность, оценка пределов обнаружения и количественного определения с использованием РМГ-61 2010.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен кандидату химических наук, заместителю заведующего лабораторией физико-химических методов анализа химического факультета Томского государственного университета **Д. А. Кургачеву** за идею работы, научные консультации, помощь в организации экспериментов и подготовке диссертации, а также за становление хроматографического мировоззрения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ОТРАЖЕНО АВТОРОМ В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:

Статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук

1. **Упыренко Е. В.** Выбор ароматического селектора стационарной фазы для реализации смешанного режима жидкостной хроматографии с применением подхода Welch / Е. В. Упыренко, Д. А. Кургачев, А. А. Бакибаев // Вестник ТГУ. – 2025. – № 39. – С. 94–113. DOI: 10.17223/24135542/39/7. – 0,83 / 0,28 а.л.

2. **Упыренко Е. В.** Определение парацетамола и ибупрофена в смешанном обращенно-фазовом режиме высокоэффективной жидкостной хроматографии с π -взаимодействиями при использовании стационарной фазы с *N*-алкилзамещенным 2,4-динитроанилиновым селектором / Е. В. Упыренко, Д. А. Кургачев, А. А. Мурина,

А. А. Бакибаев // Заводская лаборатория. – 2026. – Т. 92. – № 2. – С. 51–58.
DOI: 10.26896/1028-6861-2026-92-2-51-58. – 0,67 / 0,17 а.л.

Публикации в прочих научных изданиях:

3. **Upyrenko E. V.** Hydrophilic interaction liquid chromatography: mixed-mode with advanced π - π selectivity realization / E. V. Upyrenko, D. A. Kurgachev // *Mendeleev Communications*. – 2024. – V. 34. – N 3. – P. 450–452.
DOI: 10.1016/j.mencom.2024.04.044. – 0,13 / 0,06 а.л.

4. **Upyrenko E. V.** Solvents Eluotropic Strength for Parallel-Displaced π - π Interactions Chromatography / E. V. Upyrenko, D. A. Kurgachev, A. A. Bakibaev // *Mendeleev Communications*. – 2025. – V. 35. – N 2. – P. 237–239.
DOI: 10.71267/mencom.7576. – 0,13 / 0,04 а.л.

5. **Упыренко Е. В.** Разработка режима хроматографии гидрофильных взаимодействий с дополнительной π -селективностью для определения токсикологически значимых лекарственных средств от укушения / Е. В. Упыренко; науч. рук. Д. А. Кургачев // *Перспективы развития фундаментальных наук : Сборник научных трудов XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, г. Томск, 27–30 апреля 2021 г. : в 7 т. – Томск : Изд-во ТПУ, 2021. – Т. 2 : Химия. – С. 250–252. – 0,13 / 0,13 а.л.*

6. **Упыренко Е. В.** Разработка режима хроматографии гидрофильных взаимодействий с дополнительной π -селективностью / Е. В. Упыренко; науч. рук. Д. А. Кургачев // *«Аналитика Сибири и Дальнего Востока» : Сборник научных трудов XI Всероссийской научной конференции и школы, посвященной 100-летию со дня рождения И. Г. Юделевича, г. Новосибирск, 16–20 августа 2021. – 0,04 / 0,04 а.л.*

7. **Упыренко Е. В.** Методика простого и экспрессного ВЭЖХ-определения ароматических веществ в составе сложной липофильной матрицы с использованием переносно-зарядовых взаимодействий / Е. В. Упыренко; Д. А. Кургачев // *Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы : сборник научных трудов международной научно-практической конференции, Томск, 13–16 сентября 2021 г. – Томск, 2021. – С. 66–68. – 0,13 / 0,06 а.л.*

8. **Упыренко Е. В.** Элюотропный ряд для квазинормально фазовой хроматографии / Е. В. Упыренко, Д. А. Кургачев.; науч. рук. А. А. Бакибаев // *Перспективы развития фундаментальных наук : Сборник научных трудов XXI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, г. Томск, 23–26 апреля 2024 г. : в 7 т. – Томск : Изд-во ТПУ, 2024. – Т. 2 : Химия. – С. 257–259. – 0,13 / 0,06 а.л.*

9. **Упыренко Е. В.** Разработка стационарной фазы с электрон-дефицитными ароматическими группами для реализации смешанного гидрофильного режима жидкостной хроматографии с π -взаимодействиями / Е. В. Упыренко, Д. А. Кургачев, науч. рук. А. А. Бакибаев // *Перспективы развития фундаментальных наук : Сборник научных трудов XXII Международной конференции студентов, аспирантов*

и молодых ученых, г. Томск, 21–25 апреля 2025 г. : в 7 т. – Томск : Изд-во ТПУ, 2025. – Т. 2 : Химия. – С. 276-278.– 0,13 / 0,06 а.л.

10. **Упыренко Е. В.** Разработка структуры ароматических селекторов для реализации смешанных режимов жидкостной хроматографии с применением подхода Welch / Е. В. Упыренко, Д. А. Кургачев, науч. рук. А. А. Бакибаев // Химия и химическая технология в XXI веке : сборник научных трудов XXVI Международной научно-практической конференции имени выдающихся химиков Л. П. Кулева и Н. М. Кижнера, посвященная 125-летию со дня рождения профессора Л. П. Кулева, Томск, 19–23 мая 2025 г. – Томск, 2025. – Том 1. – С. 255–257. – 0,13 / 0,04 а.л.

11. **Упыренко Е. В.** Разработка стационарной фазы с 2,4-динитроанилиновым селектором для реализации смешанных режимов жидкостной хроматографии с π -взаимодействиями / Е. В. Упыренко, Д. А. Кургачев, А. А. Бакибаев // Актуальные вопросы фотоуправляемых и фармакологически активных соединений : сборник научных трудов 1-ой Всероссийской конференции, Москва, 22–24 октября 2025 г. – Москва, 2025. – С. 96. – 0,04 / 0,01 а.л.