

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Томский государственный университет»

На правах рукописи

Упыренко Евгений Витальевич

РАЗРАБОТКА СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЫ С ПРИВИТЫМИ
ДИНИТРОАРОМАТИЧЕСКИМИ ГРУППАМИ ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ СМЕШАННЫХ
РЕЖИМОВ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1.4.2. Аналитическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель
доктор химических наук, профессор
Бакибаев Абдигали Абдиманатович

Томск – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1. Литературный обзор.....	11
1.1 Проблема недостаточной селективности и удерживания полярных органических веществ в обращенно-фазовом режиме высокоэффективной жидкостной хроматографии и некоторые существующие способы ее решения	11
1.1.1 Использование ион-парных реагентов для увеличения удерживания и селективности заряженных веществ в ОФХ.....	13
1.1.2 Использование стационарных фаз с полярными функциональными группами для работы в ОФХ при использовании подвижной фазы с высоким содержанием водной составляющей	14
1.1.3 Работа в HPLC режиме жидкостной хроматографии	15
1.2 Реализация смешанных режимов высокоэффективной жидкостной хроматографии с π -взаимодействиями как эффективный способ увеличения селективности и удерживания веществ, содержащих ароматическую группу.....	16
1.2.1 Мультиמודальные стационарные фазы для жидкостной хроматографии и их типы	16
1.2.2 Мультиמודальные стационарные фазы для жидкостной хроматографии, содержащие ароматические группы	17
1.2.3 Необходимость учета природы и комплементарности ароматических селекторов стационарной фазы и определяемых ароматических веществ	22
1.2.4 Подавление π -взаимодействий подвижной фазой в жидкостной хроматографии	23
1.3 Классификация и характеристика основных типов π -взаимодействий.....	23
1.3.1 Классификация π -взаимодействий по геометрии взаимодействующих ароматических групп.....	24
1.3.2 Классификация π -взаимодействий по электронной плотности взаимодействующих ароматических групп	26
1.3.3 Классификация π -взаимодействий по типу участвующих функциональных групп	26
Выводы по главе 1	32
2. Экспериментальная часть	34
2.1 Реактивы, материалы и оборудование	34
2.2 Методики синтеза и анализа	38

2.2.1 Процедура подготовки силикагеля	38
2.2.2 Процедура получения модифицирующего агента, содержащего <i>N</i> -алкилзамещенную 2,4-динитроанилиновую группу и силанизирующие группы.....	39
2.2.3 Процедура модификации поверхности силикагеля модифицирующим агентом	39
2.2.4 Процедура набивки колонки	39
2.3 Метрологическая оценка методики количественного определения действующих веществ лекарственного препарата «Ибуклин»	40
2.3.1 Линейность.....	40
2.3.2. Предел обнаружения и предел количественного определения.....	40
2.3.3 Повторяемость и прецизионность	40
2.3.4 Правильность	41
3. Обсуждение результатов.....	42
3.1 Установление элюотропного ряда для режима жидкостной хроматографии с параллельно-смещенными стэкингowymi взаимодействиями	42
3.1.1 Стационарная фаза	42
3.1.2 Подвижная фаза	43
3.1.3 Вещества-маркеры π -взаимодействий.....	44
3.1.4 Элюирующая сила растворителей	44
Выводы по главе 3.1	48
3.2 Выбор ароматического селектора для получения стационарной фазы, обеспечивающей реализацию сильных π -взаимодействий.....	49
Выводы по главе 3.2.....	52
3.3 Получение стационарной фазы с 2,4-динитроанилиновым селектором	53
3.3.1 Подготовка силикагеля	53
3.3.2 Расчет необходимого количества силикагеля и модификатора для модификации поверхности силикагеля.....	53
3.3.3 Получение реактива с динитрозамещенными ароматическими группами для модификации поверхности стационарной фазы.....	54
3.3.4 Подтверждение структуры полученного модификатора с помощью метода ЯМР-спектроскопии.....	57
3.3.5 Подтверждение ковалентной прививки модифицирующего реактива на поверхность силикагелевого сорбента методом синхронного термогравиметрического анализа	58

3.3.6 Упаковка хроматографической колонки.....	61
3.3.7 Оценка качества упаковки хроматографической колонки.....	61
Выводы по главе 3.3.....	63
3.4 Исследование хроматографической селективности полученной стационарной фазы.....	64
3.4.1 Вещества-маркеры для исследования хроматографической селективности полученной стационарной фазы.....	64
3.4.2 Исследование влияния типа и количества органического растворителя на возможность реализации π -взаимодействий на полученной стационарной фазе.....	65
3.4.3 Исследование разработанной стационарной фазы в сравнении с коммерчески доступными аналогами.....	77
Выводы по главе 3.4.....	84
3.5 Практическое применение разработанной стационарной фазы.....	85
3.5.1 Определение действующих веществ, содержащих ароматическую группу, в многокомпонентных лекарственных препаратах.....	85
3.5.2 Возможность определения активных фармацевтических субстанций в лиофилизованной сыворотке крови с помощью разработанной стационарной фазы.....	92
Выводы по главе 3.5.....	96
3.6 Метрологическая оценка параметров методики определения действующих веществ лекарственного препарата, разработанной с использованием стационарной фазы AWE-241.....	98
3.6.1 Возможность одновременного определения веществ различной гидрофобности обращенно-фазовом режиме жидкостной хроматографии.....	98
3.6.2 Линейность.....	101
3.6.3 Предел количественного определения (ПКО) и предел обнаружения (ПО)....	102
3.6.4 Повторяемость и прецизионность.....	103
3.6.5 Правильность.....	104
3.6.6 Сравнение стационарных фаз AWE-241 и ODS по возможности количественного определения парацетамола и ибупрофена.....	105
Выводы по главе 3.6.....	107
4. Выводы.....	108
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	110
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	112
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	133

Приложение А. Результаты проверки работы коробки градиент-дозировочных клапанов жидкостного хроматографа.....	133
Приложение Б. Графики зависимости коэффициента удерживания k' 1,3-ДНБ от количества замещенного начального состава изопропанол – <i>n</i> -гексан (40:60).....	138
Приложение В. Физико-химические свойства растворителей, исследованных для установления элюотропного ряда.....	142
Приложение Г. Результаты входного контроля 1-хлор-2,4-динитробензола, использованного для получения модифицирующего реактива «АВЕ-241».....	143
Приложение Д. Спектры ядерного магнитного резонанса для 1-хлор-2,4-динитробензола и полученного модифицирующего реактива «АВЕ-241».....	145
Приложение Е. Кривые синхронного термогравиметрического анализа немодифицированного силикагеля и модифицированного силикагеля «АВЕ-241@SiO ₂ ».....	147

ВВЕДЕНИЕ

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 (ОФХ) со спектрофотометрическим детектированием получил распространение для исследования органических соединений, содержащих ароматическую группу. В основе ОФХ 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 электрононасыщенные ароматические группы. Однако, наиболее часто используемые стационарные фазы для ОФХ 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 стационарной фазы 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. Существует широкое разнообразие стационарных фаз с ароматическими селекторами, но наиболее используемыми остаются фенильная и пентафторфенильная фазы. Несмотря на большое число работ по разработке и исследованию стационарных фаз, содержащих две и более нитрогрупп, применение данных фаз ограничено небольшим количеством исследовательских работ XX века, в которых представлено определение полиароматических углеводов в нормально-фазовом режиме ВЭЖХ. Коммерчески доступные стационарные фазы подобного типа не имеют описанных случаев применения в ОФХ.

Цель исследования – разработка стационарной фазы с привитыми динитро-ароматическими группами для реализации смешанного режима жидкостной хроматографии, чтобы обеспечить 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 стэкинговых 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 ОФХ режиме с π -взаимодействиями стационарная фаза, содержащая динитрозамещенный ароматический селектор.

2. Установлен элюотропный ряд на основе 30 растворителей для хроматографического режима, основанного на параллельно-смещенных стэкинговых π -взаимодействиях.

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

4. 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 ОФХ растворителей в сравнении с коммерчески доступными стационарными фазами.

Практическая значимость работы заключается в:

1. Возможности использования разработанной стационарной фазы для специфичного одновременного определения методом жидкостной хроматографии молекул различной полярности, содержащих ароматическую группу, в изократическом режиме элюирования.

2. Способности 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. Возможности использования установленного элюотропного ряда, основанного на параллельно-смещенных стэкинговых 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 стэкинговых 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, *o*-ксилол и нафталин), при использовании наиболее распространенных 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 (фенилгексильная, 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.

1. Литературный обзор

1.1 Проблема недостаточной селективности и удерживания полярных органических веществ в обращенно-фазовом режиме высокоэффективной жидкостной хроматографии и некоторые существующие способы ее решения

Существует большое разнообразие хроматографических режимов (таблица 1) [1–3] и лабораторно синтезированных и коммерчески доступных стационарных фаз. Однако, обращенно-фазовый режим жидкостной хроматографии (ОФХ или RPLC, от англ. Reversed-Phase Liquid Chromatography) со спектрофотометрическим детектированием и соответствующие стационарные фазы с привитыми гидрофобными группами (селекторами) [4, 5] остаются наиболее распространенным решением, особенно в области фармацевтической промышленности [6–8], пищевой отрасли [5] и токсикологической экспертизы [9, 10].

Таблица 1 – Основные режимы ВЭЖХ и их принципиальные особенности [3, 6, 11]

Режим \ Параметры	Стационарная фаза	Элюирующая сила подвижной фазы	Преобладающие химические взаимодействия	Другие факторы, влияющие на удерживание
Обращенно-фазовый (ОФХ)	Неполярная	Неполярность	Гидрофобные эффекты, дисперсионные взаимодействия	Тип растворителя, значение рН подвижной фазы
Нормально-фазовый (НФХ)	Полярная	Полярность	Водородные связи, галогеновые связи, дипольные, электростатические	Тип растворителя, значение рН подвижной фазы
Гидрофильный (HPLC)	Полярная	Полярность	Водородные связи, дипольные, электростатические, ионообменные	Значение ионной силы и рН подвижной фазы
Ионный (ИХ)	Ионообменные группы	Ионная сила	Ионообменные	Значение ионной силы и рН подвижной фазы
Эксклюзионный (SEC)	Инертная	–	Нет (эксклюзия по размеру)	Размерность сорбента
Квази-нормально фазовый (QNP)	π -Селекторы	Дипольный момент	π -Взаимодействия	Число неподеленных электронных пар

Это связано с тем, что подавляющее большинство известных органических соединений, в том числе физиологически активных, токсичных и эндогенных веществ, содержат в своем составе ароматическую функциональную группу [12]. Ароматическая группа, как правило, поглощает излучение в ультрафиолетовой области, позволяя использовать простой, дешевый и чувствительный метод УФ-детектирования [13]. Гидрофобный характер ароматической группы позволяет реализовать хорошо изученный и предсказуемый механизм разделения, основанный на гидрофобном эффекте и дисперсионных взаимодействиях [3, 14–18]. При этом, наиболее популярными являются гидрофобные стационарные фазы, такие как октилсилильные (C8) и октадецилсилильные (C18) [19, 20].

Однако, универсальный и ненаправленный характер лондоновских сил и гидрофобного эффекта [21] обуславливает не только преимущества данного режима, но и недостатки, к которым можно отнести неудовлетворительное удерживание и, как результат, недостаточную селективность для некоторых заряженных и полярных органических соединений.

Между тем, член селективности α вносит наибольший вклад в параметр разрешения двух соседних пиков R_s и поэтому является ключевым фактором, определяющим степень разделения (уравнение 1, рисунок 1) [11]:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \frac{k'_2}{1+k'_2} \cdot \frac{(\alpha-1)}{\alpha}, \quad (1)$$

где N – эффективность хроматографического пика;

k'_2 – коэффициент удерживания второго пика;

α – хроматографическая селективность разделения.

Наиболее простой и эффективный способ повлиять на селективность – изменить тип и соотношение растворителей, входящих в состав подвижной фазы. Другие хроматографические условия (значение pH и ионной силы подвижной фазы, температура колонки, добавка модификаторов подвижной фазы и ион-парных реагентов и др.) также влияют на разделение, но в значительно меньшей степени [3, 6]. Однако, часто изменения данных условий в рамках одного хроматографического режима без изменения типа стационарной фазы бывает недостаточно для достижения требуемой селективности.

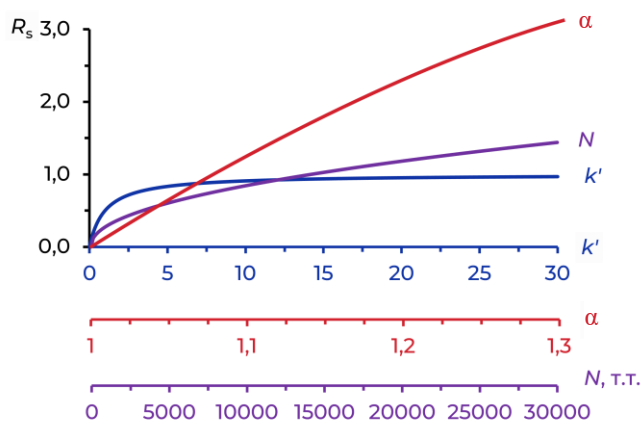


Рисунок 1 – Диаграмма вклада эффективности N (–), удерживания k' (–) и селективности α (–) в параметр разрешения R_s

1.1.1 Использование ион-парных реагентов для увеличения удерживания и селективности заряженных веществ в ОФХ

Устаревший, но один из распространенных подходов увеличения удерживания и, как результат, селективности для заряженных веществ в ОФХ режиме – использование ион-парных реагентов (ИПР), содержащих гидрофобный участок молекулы и заряженную функциональную группу (рисунок 2) [22]. Однако, использование ИПР приводит к долгому времени уравнивания стационарной фазы, невозможности работы в градиентном режиме элюирования, а также сложности дальнейшего использования стационарной фазы с другими подвижными фазами без использования ИПР [23]. Кроме того, использование ИПР не позволяет увеличить удерживание незаряженных полярных веществ.

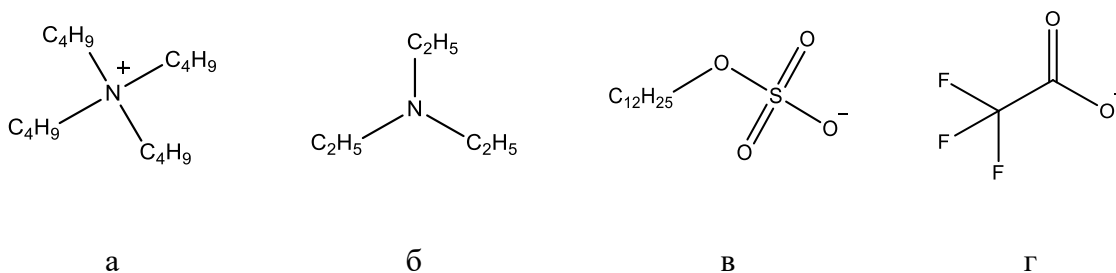


Рисунок 2 – Структурные формулы некоторых ион-парных реагентов, используемых в высокоэффективной жидкостной хроматографии: а – тетрабутиламмоний; б – триэтиламин; в – лаурилсульфат; г – трифторуксусная кислота

1.1.2 Использование стационарных фаз с полярными функциональными группами для работы в ОФХ при использовании подвижной фазы с высоким содержанием водной составляющей

Попытка увеличения удерживания заряженных и полярных соединений в ОФХ режиме путем уменьшения элюирующей силы вплоть до использования полностью водной подвижной фазы может приводить к другой проблеме: «несмачиванию» гидрофобных селекторов стационарной фазы [14, 24–26]. Данная проблема решена путем использования стационарных фаз, содержащих полярные вставки (так называемые «polar embedded groups»), например, Agilent Zorbax Bonus-RP, Waters XBridge Shield RP18 (рисунок 3) и др. [27]. Такие стационарные фазы позволяют не только увеличить удерживание полярных веществ при работе в полностью водной подвижной фазе, но и обеспечивают некоторую дополнительную селективность за счет полярных взаимодействий (диполь-дипольные, взаимодействия посредством водородных связей и др.) с полярными вставками [28–32].

Однако, данный подход подразумевает использование максимально слабого элюента для удерживания полярных веществ, что лишает возможности управлять селективностью путем дальнейшего уменьшения элюирующей силы подвижной фазы.

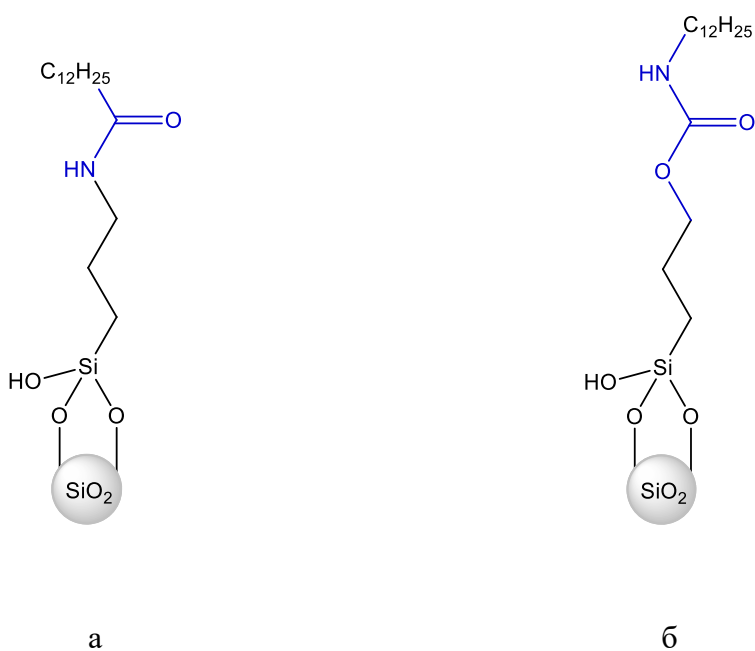


Рисунок 3 – Структуры стационарных фаз с полярными вставками (обозначены **синим цветом**): а – Zorbax Bonus RP (Agilent Technologies); б – XBridge Shield RP18 (Waters)

Кроме того, в случае присутствия в пробе одновременно полярных и гидрофобных веществ, попытка удерживания полярных веществ путем уменьшения элюирующей силы подвижной фазы приведет к чрезмерно долгому удерживанию гидрофобных веществ. Разделение смеси полярных и гидрофобных веществ потребует использования градиентного элюирования.

1.1.3 Работа в HILIC режиме жидкостной хроматографии

Одним из эффективных и набирающих популярность способов решения проблемы недостаточного удерживания и селективности полярных веществ в ОФХ режиме является переход в гидрофильный режим жидкостной хроматографии (HILIC, от англ. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography), где удерживание веществ основано на их распределении между иммобилизованным водно-солевым слоем и объемом органического растворителя (рисунок 4) и увеличивается с ростом способности анализируемых веществ образовывать прочные водородные связи [33, 34].

Однако, использование HILIC режима не позволяет удерживать и определять гидрофобные вещества, а также одновременно определять одновременно гидрофобные и полярные вещества при работе в изократическом режиме элюирования.

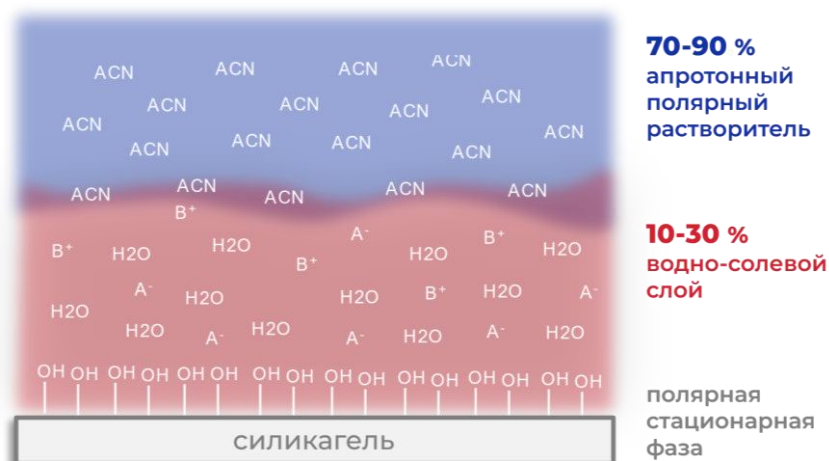


Рисунок 4 – Схема расслоения подвижной фазы, обуславливающего механизм разделения в HILIC режиме жидкостной хроматографии

1.2 Реализация смешанных режимов высокоэффективной жидкостной хроматографии с π -взаимодействиями как эффективный способ увеличения селективности и удерживания веществ, содержащих ароматическую группу

1.2.1 Мультимодальные стационарные фазы для жидкостной хроматографии и их типы

Другим эффективным решением проблемы недостаточного удерживания и селективности в ОФХ является использование мультимодальных стационарных (ММС, от англ. Mixed-mode chromatography, или multimodal chromatography) фаз, содержащих одновременно несколько функциональных групп на поверхности сорбента [35]. Такого рода фазы позволяют реализовать одновременно несколько типов взаимодействий сорбат-сорбент, например, ионообменные, диполь-дипольные, дисперсионные, взаимодействия посредством водородных связей и др. [36–39]. Данный подход позволяет комбинировать различные механизмы удерживания для увеличения селективности, и впервые был реализован несколькими группами исследователей в 1980-х годах [40–42].

Любые стационарные фазы, содержащие функциональные группы и способные реализовывать два и более типа нековалентных взаимодействий, в том числе нежелательные остаточные взаимодействия, считаются мультимодальными и делятся на несколько типов [43]:

1. Состоящие из смешанных частиц сорбента нескольких типов (рисунок 5а, например, стационарные фазы серии Scherzo компании Imtakt);
2. Содержащие несколько типов селекторов на поверхности сорбента (рисунок 5б, например, стационарные фазы XSelect CSH C18 и Atlantis Premier BEH C18 AX компании Waters и др.);
3. Содержащие селекторы, несущие одновременно несколько функциональных групп (рисунок 5в, например, стационарные фазы компаний Helix, ThermoScientific Acclaim, Sielc Obelisc и Primesep, Capto и др.);
4. Содержащие различные стерически разнесенные функциональные группы (рисунок 5г, например, стационарные фазы Trinity P1 и P2 компании ThermoScientific Acclaim).

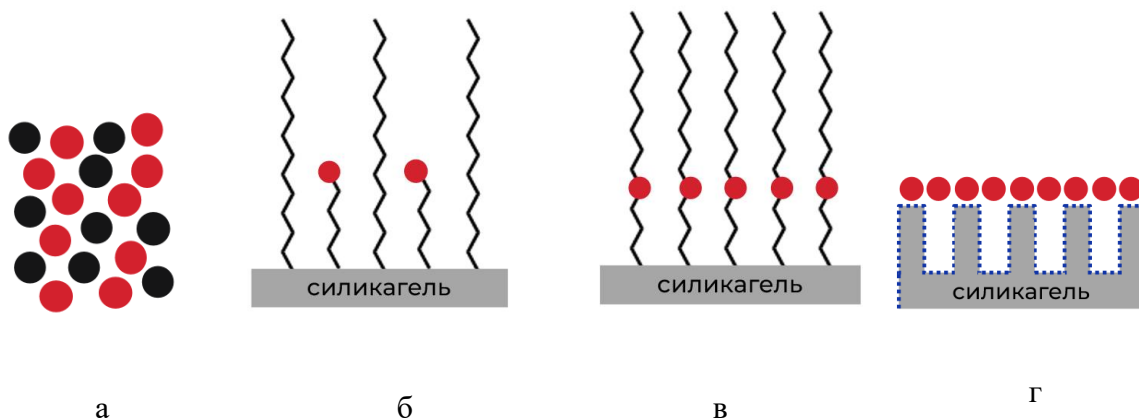


Рисунок 5 – Типы мультимодальных стационарных фаз:

а – Тип 1; б – Тип 2; в – Тип 3; г – Тип 4; где черным цветом обозначены гидрофобные сайты; серым – силикагелевая подложка; **красным** – катионообменные функциональные группы; **синим** – анионообменные функциональные группы [43]

ММС фазы первого и второго типов могут давать плохо воспроизводимые результаты от серии к серии из-за плохой воспроизводимости процедуры набивки колонки и неоднородности смешивания частиц (для ММС первого типа), плохой воспроизводимости прививки различных селекторов на поверхность сорбента (для ММС второго типа) и неоднородности деструкции различных селекторов сорбента [43]. На данный момент наиболее популярны сорбенты третьего типа, модифицированные селекторами, содержащими несколько функциональных групп. ММС четвертого типа за счет физического разнесения противоположно заряженных функциональных групп обладают уникальной селективностью по отношению к амфолитам и другим веществам, имеющим ионообменные функциональные группы [44–47]. Однако, синтез данных сорбентов более сложен, а емкость ниже по сравнению с ММС других типов.

1.2.2 Мультимодальные стационарные фазы для жидкостной хроматографии, содержащие ароматические группы

Мультимодальные стационарные фазы с ароматическими селекторами позволяют реализовать специфичные π -взаимодействия между сорбатом и сорбентом. Такие фазы могут содержать как гидрофобные, так и гидрофильные линкеры для реализации смешанных ОФХ или НІІС режимов с π -взаимодействиями соответственно. При этом, основной вклад в удерживание вносят соответственно гидрофобные или гидрофильные взаимодействия, в то время как π -взаимодействия обеспечивают лишь дополнительную селективность.

Режим хроматографии, основанный на реализации π -взаимодействий между ароматическими селекторами, подвижной фазой и анализируемыми веществами, содержащими ароматическую группу, не имеет определенного названия и четкой оформленности, является мало изученным, а сами π -взаимодействия сравнительно редко учитываются и применяются при разработке методик ВЭЖХ-анализа. Фундаментальные работы по исследованию данного режима ограничиваются небольшим количеством первопроходческих работ начала 2000-х годов, в которых данный режим называется квазинормально фазовым (QNP, от англ. Quasi-normal phase) [48–52].

На сегодняшний день существует широкое разнообразие как коммерчески доступных, так и лабораторно полученных стационарных фаз с ароматическими селекторами (рисунок 6, таблица 2). Однако, наиболее часто используемые в аналитической практике стационарные фазы для ВЭЖХ содержат ароматические группы, не обеспечивающие достаточно сильные π -взаимодействия: фенильные и, в меньшей степени, пентафторфенильные (PFP) фазы. Значительно менее популярные стационарные фазы включают нафталиновые, пиренильные, нитрофенильные, пентабромфенильные селекторы и др. и часто демонстрируют более высокую селективность по сравнению с фенильными стационарными фазами [53–56].

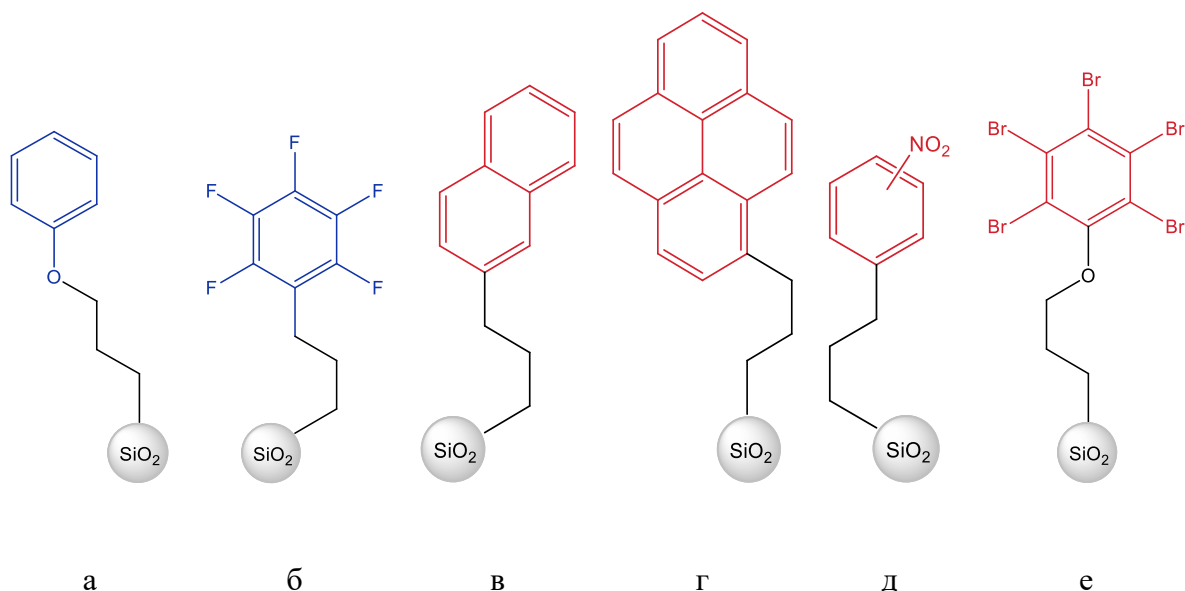


Рисунок 6 – Структуры коммерчески доступных стационарных фаз с ароматическими селекторами: а – фенильная; б – пентафторфенильная; в – нафталиновая (Cosmosil NAP); г – пиренэтильная (Cosmosil 5PYE); д – нитрофенильная (Cosmosil NPE); е – пентабромфенильная (Cosmosil 5PBr)

Таблица 2 – Стационарные фазы для жидкостной хроматографии, содержащие ароматические селекторы

Ароматическая группа	Производитель или научно-исследовательская группа
Фенил	Agilent Technologies, Phenomenex, GL Sciences, ACE, Restek, Thermo Fisher Scientific, Helix, Halo, COSMOSIL и др.
Бифенил	
Дифенил	
Пентафторфенил	
Фениламинопропил	M.G. Kiseleva, P.N. Nesterenko [57]
Нафталин	«πNAP COSMOSIL» Nacalai Tesque Inc.
N(9-Метилантрацен)-аминопропил	M. Verzele, N. Van de Velde [58]
Фенотиазин	«Buckyprep-M COSMOSIL» Nacalai Tesque Inc.
Пиреналкил	«PYE COSMOSIL» Nacalai Tesque Inc.
	«Buckyprep COSMOSIL» Nacalai Tesque Inc.
	B. Lin, H.-B. He, Z.-G. Shi et al [59]
	C.H. Lochmüller. A.S. Colborn, L.M. Hunnicutt et al [60]
Пентабромфенил	«5PBr COSMOSIL» Nacalai Tesque Inc.
Пентафторбензамид	G. Félix, C. Bertrand [61]
Кофеин	G. Félix, C. Bertrand [62]
	G. Félix, C. Bertrand, F. Van Gastel [63]
Фталимид	«Acclaim Phenyl-1» Thermo Fisher Scientific
Тетрахлорфталимид	P. Jadaud, M. Caude, R. Rosset [64]
	L. Nondek [65]
	W. Holstein, H. Hemetsberger [66]
	W. Holstein [67]
Пиридин	«PY COSMOSIL» Nacalai Tesque Inc.
	«BEH 2EP» Waters
	«2-PIC» Waters
	«Epic HILIC-Pi» Perkin Elmer
2-Хиназолин	C.H. Lochmüller, S.F. Marshall, D.R. Welder [68]
8-Хинолинол	A. Marshall, H.A. Mottola [69]
Нитрофенилэтил	«NPE COSMOSIL» Nacalai Tesque Inc.
4-Нитропропилбензол	«Nucleosil-NO ₂ » MACHEREY-NAGEL
(4-Нитрофенил) мочеви́на	«CD-Screen» CycloLab Cyclodextrin R&D Laboratory Ltd.
Нитро-1,8-нафталими́д	N. Kuroda, A. Sako, K. Ohyama, et al [70]
	Y. Yamada, K. Ohyama, G. Onodera et al [71]

Также в литературе представлено большое количество стационарных фаз, содержащих гетероциклические азотсодержащие ароматические системы (пиридин, хинолин и т.д.) [72–79]. Коммерчески доступные стационарные фазы данного типа представлены компаниями Cosmosil, Waters и др. (таблица 2). Однако, их применение ограничено сверхкритической флюидной хроматографией (СКФ) [76, 79–81].

Помимо коммерчески доступных стационарных фаз с ароматическими группами, в литературе представлено широкое разнообразие фаз, полученных научно-исследовательскими группами в лабораторных условиях (таблица 2) [57, 59, 82–86].

Как показано в главе 1.3 данной работы, π -взаимодействия отличаются разнообразием в зависимости от типа участвующих функциональных групп, конфигурации взаимодействия, природы ароматической группы, а также положения и характера заместителей [87], что обуславливает высокую селективность π -взаимодействий и перспективность их реализации для увеличения хроматографической селективности.

Согласно обзору литературы, электронодефицитные ароматические группы, содержащие электроноакцепторные заместители, как правило, обеспечивают более сильные π -взаимодействия, чем электрононасыщенные ароматические группы [87] (глава 1.3). Стационарные фазы с электронодефицитными ароматическими селекторами, содержащими два и более сильных электроноакцепторных заместителя, таких как нитрогруппы, включают всего несколько коммерчески доступных примеров (рисунок 7, таблица 3). Однако, данные фазы не имеют описанных в литературе случаев практического применения для анализа реальных объектов в ОФХ.

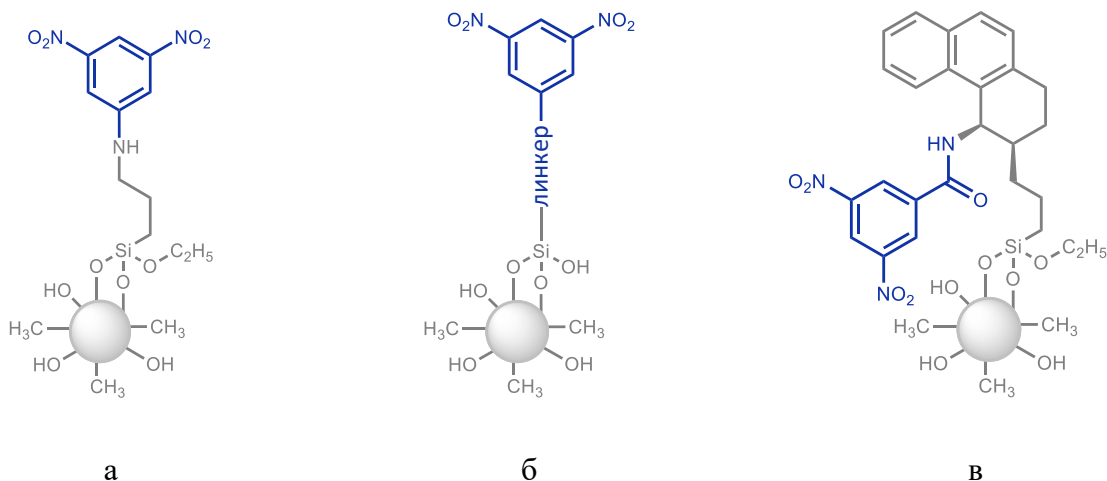


Рисунок 7 – Структуры коммерчески доступных стационарных фаз с динитрозамещенными ароматическими группами: а – PrincetonSFC DNP; б – SUMIPAX DI-NO₂ SG; в – (R,R) Whelk-O®1

Таблица 3 – Стационарные фазы для жидкостной хроматографии с ароматическими селекторами, замещенными 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 [88]
2,4-Динитроанилин	L. Nondek, J. Málek [89]
	P. Ghosh, B. Chawla, P. Joshi et al [90]
2,4-Динитроанилин и толуолсульфонат серебра	J.C. Putman, S.M. Rowland, D.C. Podgorski et al [91]
Тетранитробифенил	J.T. Ayres, C.K. Mann [92]
	G. Smets, V. Balogh, Y. Castrill [93]
2,4-Динитроанилин	K.J. Welch, N.E. Hoffman [94]
3,5-Динитробензоил-меркаптопропил	
2,4-Динитрофенил-меркаптопропил	
Пикрилмеркаптопропил	
2,4-Динитроанилин	L. Nondek [94]
2,4,6-Тринитроанилин	
3,5-Динитробензамид	
2,4,6-Тринитрофенил-пропиловый эфир	
2,4,7,9-Тетранитро-флуореноксим	
2,4,7,9-Тетранитро-флуореноксим	H. Klaar, H. Hemetsberger, H. Ricken [95]
2,4,5,7-Тетранитро-флуоренимин	C.H. Lochmüller, R.R. Ryall, C.W. Amoss [96]

Так, стационарная фаза «PrincetonSFC DNP» предназначена для работы в сверхкритической флюидной хроматографии (рисунок 7а) [97]. Стационарная фаза «Chromegabond DNAP» предназначена для определения полиароматических углеводородов в нефтепродуктах при работе в нормально-фазовом режиме ВЭЖХ [98]. Стационарная фаза «SUMIPAX DI-NO2 SG» (рисунок 7б) позиционируется для ВЭЖХ-анализа в нормально-фазовом и обращенно-фазовом режимах ВЭЖХ, обеспечивая высокое разрешение для позиционных изомеров, содержащих ароматическую группу [99]. Однако, точная структура линкера стационарной фазы неизвестна, а в литературе не описано примеров ее

практического применения. Серия коммерчески доступных хиральных стационарных фаз компании Regis Technologies [100] (рисунок 7в) и лабораторно синтезированных хиральных стационарных фаз «пиркловского» типа, содержащих динитрофенильную ароматическую группу, привитую через амидный линкер [101–106] используется для хиральной хроматографии.

Несмотря на то, что в литературе описано большое количество работ по разработке и исследованию стационарных фаз, содержащих несколько нитрогрупп (таблица 3), их применение ограничено работами прошлого века для определения преимущественно полиароматических углеводородов в нормально-фазовом режиме ВЭЖХ. Данные стационарные фазы также не имеют описанных в литературе случаев практического применения для анализа реальных объектов в ОФХ.

1.2.3 Необходимость учета природы и комплементарности ароматических селекторов стационарной фазы и определяемых ароматических веществ

Согласно обзору литературы, представленному в главе 1.3, одними из наиболее распространенных и при этом сильных типов π -взаимодействий являются стэкинговые параллельно смещенные взаимодействия между парой электронодефицитной и электрононасыщенной ароматических систем [87]. Сила π -взаимодействий как для пары электрононасыщенная...электронодефицитная, так и для пары электронодефицитная...электронодефицитная ароматической системы увеличивается:

- 1) при участии электронодефицитных ароматических систем, содержащих несколько электроноакцепторных заместителей или гетероциклических атомов в составе ароматической системы;
- 2) при участии поликонденсированных ароматических систем.

Таким образом, для достижения наибольшей π -селективности необходимо выбирать стационарные фазы, содержащие селекторы комплементарного характера по отношению к анализируемым веществам: электрононасыщенные селекторы для анализа электронодефицитных ароматических систем и электронодефицитные для анализа электрононасыщенных ароматических систем. Наиболее сильные и селективные π -взаимодействия реализуются при использовании ароматических селекторов, содержащих конденсированные или электронодефицитные ароматические группы. Однако, данные факторы редко учитываются при выборе стационарной фазы.

Большинство лекарственных средств (ЛС), сильнодействующих веществ и токсинов представляет собой электрононасыщенные ароматические системы, содержащие несколько электронодонорных заместителей. Вещества, содержащие ароматические системы с несколькими электроноакцепторными заместителями или гетероатомами, встречаются, как правило, значительно реже и являются более специфичными, например:

- Азотистые основания и их производные;
- Некоторые онкологические и антиретровирусные препараты, против ВИЧ, противогрибкового действия, антибиотики и др. [107];
- Взрывчатые вещества, некоторые пестициды, гербициды и др.

Таким образом, наибольший спрос существует на стационарные фазы, содержащие электронодефицитные ароматические группы.

1.2.4 Подавление π -взаимодействий подвижной фазой в жидкостной хроматографии

Ацетонитрил (CH_3CN) – наиболее распространенный растворитель в ВЭЖХ из-за своих выгодных физико-химических свойств, таких как низкая вязкость, низкая граница УФ-отсечки, и др., а также дешевизны [108]. Однако, CH_3CN в значительной степени подавляет π -взаимодействия между сорбатом и сорбентом, что не позволяет реализовать дополнительную π -селективность [109–112].

Несмотря на это, значительное число исследователей при использовании стационарной фазы с ароматическими селекторами все равно используют подвижную фазу на основе CH_3CN [96, 113, 114]. Многие исследователи используют альтернативные растворители, такие как метанол, для реализации более сильных π -взаимодействий [109, 115–121]. Также с этой целью часто используются такие органические растворители, как изопропанол, метанол, этанол, гексан и др. [109, 122–124]. Несмотря на перспективность реализации дополнительной π -селективности, на настоящий момент отсутствует подробный систематизированный элюотропный ряд. В работе [125] представлен ограниченный элюотропный ряд для QNP режима на основе семи растворителей.

1.3 Классификация и характеристика основных типов π -взаимодействий

В основе каждого из режимов ВЭЖХ лежат определенные нековалентные химические взаимодействия [30] (таблица 4), а также гидрофобные эффекты [87, 112]. Одними из направленных и дальнедействующих типов взаимодействий являются электростатические, дипольные и π -взаимодействия.

Таблица 4 – Характеристика основных типов нековалентных химических взаимодействий [126, 127]

Тип взаимодействий	Подтип взаимодействий	Схема взаимодействия	Энергия взаимодействия, кДж/моль	Зависимость энергии от расстояния взаимодействия
Электростатические	ионные		200-300	1/r
	ион-диполь		50-200	1/r ²
	ион-индуцированный диполь		3-15	1/r ⁴
	водородные связи		4-120	фиксированная длина
	галогеновые		4-125 [128]	фиксированная длина
Ван-дер-Ваальсовы	диполь-диполь		5-50	1/r ³
	диполь-индуцированный диполь		2-10	1/r ⁵
	Лондоновские силы		< 5	1/r ⁶
π -Взаимодействия	квадруполь-квадруполь		< 60 (1-5)	2-5 Å (фиксированная длина)

1.3.1 Классификация π -взаимодействий по геометрии взаимодействующих ароматических групп

Согласно геометрии, π -взаимодействия между плоскими ароматическими системами делятся на несколько типов (рисунок 8) [129, 130]:

- Перпендикулярные Т-образные (T) и Y-образные «edge to face» (Y);
- Сэндвич-стэкинг «face-to-face» (S);
- Стэкинговые параллельно смещенные «offset-stacked», или «parallel displaced» (PD).

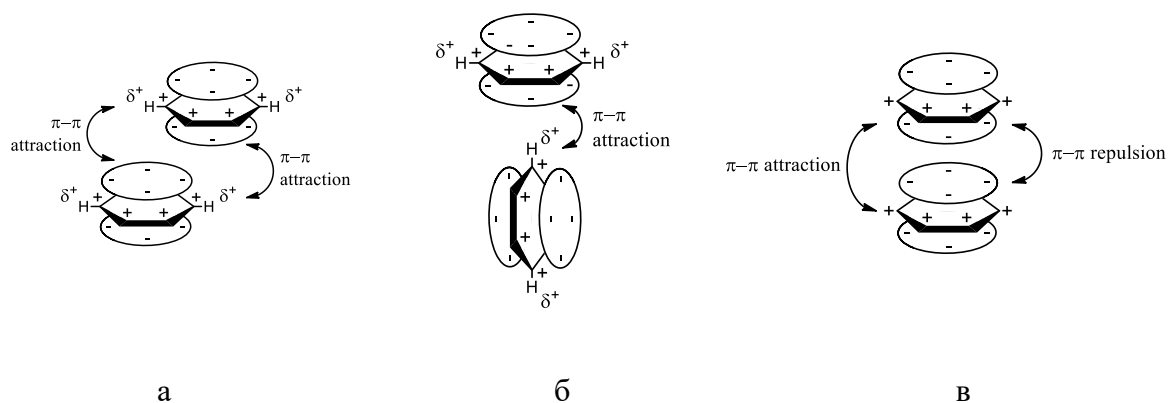


Рисунок 8 – Типы π -взаимодействий согласно их геометрии: а – стэкинговые параллельно-смещенные; б – Т-образная конфигурация; в – «сэндвич»-конфигурация [131]

Стэкинговые взаимодействия в параллельно смещенной конформации (далее – стэкинговые) возникают между ароматическими группами, в качестве которых с одной стороны выступают электрононасыщенные π -основания, а с другой – электронодефицитные π -кислоты, которые ориентируются в параллельно смещенной конформации и таким образом уменьшают отталкивающие взаимодействия. При этом, чем сильнее взаимодействующие π -основание и π -кислота, тем сильнее стэкинговые взаимодействия (рисунок 8а). Незамещенные, полициклические конденсированные (например, нафталин, антрацен, пирен и т.д.) или содержащие электронодонорные заместители электрононасыщенные ароматические группы имеют положительно заряженную поверхность и, как следствие, сильнее взаимодействуют с электронодефицитными ароматическими группами, содержащими электроноакцепторные заместители или гетероатомы. При этом за счет сил прямого электростатического взаимодействия между ароматическим кольцом одного вещества и заместителем второго происходит дополнительная стабилизация стэкингового взаимодействия.

В случае «Т-образной» конфигурации положительный квадруполь одного ароматического кольца взаимодействует с отрицательным квадруполем или атомом водорода карбонильной группы, атомом серы другого (рисунок 8б). Наибольшее взаимное притяжение происходит, когда электроноакцепторный заместитель усиливает кислотные свойства взаимодействующего атома водорода одной π -системы, а электронодонорный заместитель – основные свойства второй из взаимодействующих π -систем [14].

В случае «У-образной» конфигурации два атома Н одной π -системы направлены к акцепторному ароматическому кольцу второй π -системы, что также делает взаимодействие энергетически выгодным [129].

Максимальное перекрытие π -систем и дестабилизация отталкивающими квадруполь/квадрупольными взаимодействиями делают «сэндвич»-конфигурацию наименее стабильной из-за отталкивания Паули (рисунок 8в) [131, 132].

1.3.2 Классификация π -взаимодействий по электронной плотности взаимодействующих ароматических групп

В зависимости от заместителей и типа атомов и функциональных групп в составе ароматической группы различают:

– Электронодефицитные (π -дефицитные) ароматические группы – содержащие электроноакцепторные (например, нитро-, циано-, карбокси-, сульфо- и др.) группы или электроотрицательные атомы в составе ароматической группы (например, сера, азот, кислород и др.). Кроме того, хиноны также проявляют сильные электроноакцепторные свойства [133];

– Электроноизбыточные (π -избыточные) ароматические группы – содержащие электронодонорные (метил, метокси, гидроксид, амино и др.) группы; гетероароматические (пиразол, имидазол) системы; полициклические конденсированные или незамещенные ароматические моноядерные группы.

1.3.3 Классификация π -взаимодействий по типу участвующих функциональных групп

В зависимости от природы взаимодействующих π -систем и функциональных групп, π -взаимодействия делятся на следующие типы [87, 132]:

- π -Система... π -система;
- Перенос заряда (π -донор... π -акцептор);
- Полярные группы... π -взаимодействия:
 - СН... π -система;
 - NH... π -система;
 - OH... π -система;
- Неподделенная электронная пара (НЭП)... π -система;
- Катион... π -система
- Анион... π -система;
- Галоген... π -система;
- Хиноны... π -система;
- Металл... π -система (металлоцены и др. металл-органические соединения).

Взаимодействия π -система... π -система

Для π ... π -взаимодействий характерна параллельно смещенная конфигурация. Вклад в природу взаимодействий π -система... π -система вносят в основном дисперсионные силы и электростатические взаимодействия, но также могут вносить вклад диполь-дипольные и диполь-индуцированный диполь взаимодействия [87, 131], притяжение между отрицательно заряженными π -электронами и положительно заряженным сигма-скелетом [132], отталкивание Паули, сольвофобные эффекты, и переносно-зарядовые взаимодействия (рисунок 9).

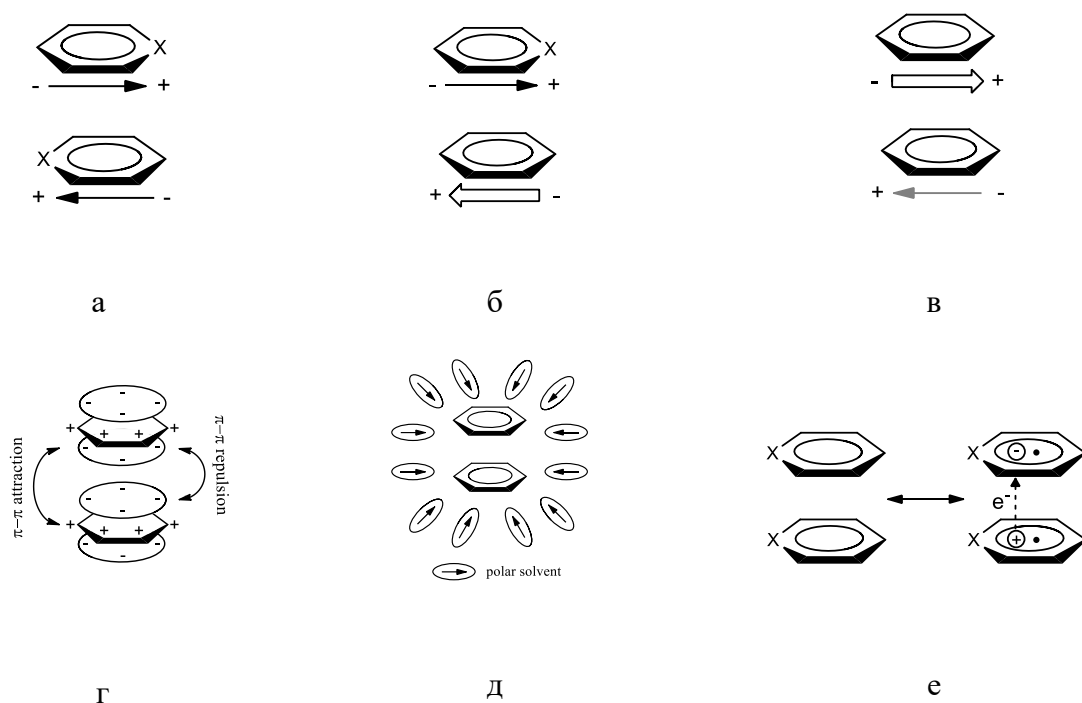


Рисунок 9 – Типы ван-дер-ваальсовых сил, вносящих вклад в π ... π -взаимодействия:
 а – ориентационные силы; б – индукционные взаимодействия; в – дисперсионное притяжение; г – отталкивание Паули; д – сольвофобные эффекты; е – перенос заряда [131]

Сила π ... π -взаимодействий в значительной степени зависит от природы и числа заместителей и увеличивается при введении любого заместителя, но особенно сильно при введении электроноакцепторных групп [132, 134–137]. Согласно последней модели Виллера и Хоука, введение заместителей увеличивает силу взаимодействий за счет увеличения вклада электростатических взаимодействий [138–142] и не связано с изменением электронной плотности/заряда [143].

Стабильность взаимодействия двух π -систем уменьшается в ряду π -дефицитная... π -дефицитная > π -дефицитная... π -насыщенная > π -насыщенная... π -насыщенная [137]. Введение сильных электроноакцепторных групп (например, нитро-, циано- и др.) или некоторых гетероатомов (например, азота в случае пиридина, пиримидина и триазина) в ароматическую группу приводит к обращению поляризации ароматической системы и, как результат, увеличению энергии взаимодействия (рисунок 10б). Частичный атомный заряд и перманентный диполь приводит к появлению электростатических диполь-дипольных и диполь-индуцированный диполь взаимодействий [87, 131], а также уменьшению отталкивания π -электронов из-за уменьшения электронной плотности. Введение электронодонорных заместителей увеличивает как отталкивание за счет π -электронов, так и притяжение за счет дисперсионных сил, что, однако, приводит в конечном счете к незначительному увеличению энергии взаимодействия.

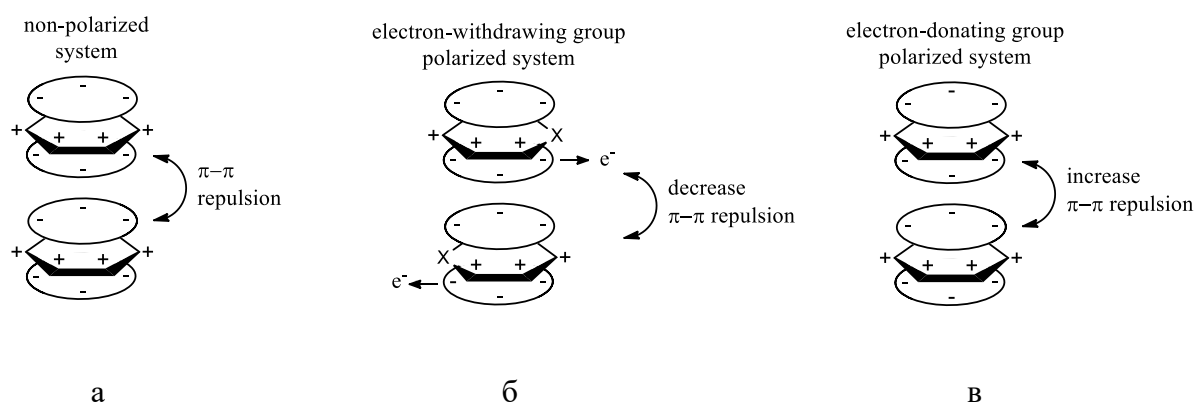


Рисунок 10 – Изменение поляризации и энергии взаимодействия π -систем при введении заместителей: а – незамещенные π -системы; б – введение электроноакцепторного заместителя; в – введение электронодонорного заместителя [131]

Переносно-зарядовые взаимодействия (π -донор... π -акцептор)

Отдельным подтипом π ... π -взаимодействий являются π -акцептор... π -донор переносно-зарядовые взаимодействия между НСМО орбиталью π -донора и ВЗМО орбиталью π -акцептора [138, 139]. При непосредственной близости электронодефицитной и электрононасыщенной ароматических систем между двумя противоположными квадрупольными моментами возникает электростатическое притяжение, и системы принимают параллельно-смещенную конфигурацию. При этом, из-за понижения

энергетического барьера между ВЗМО электрононасыщенной ароматической системы и НСМО электронодефицитной ароматической системы образуется переносно-зарядный комплекс. Дополнительное введение электронодонорных групп в электрононасыщенную систему повышает энергию ВЗМО; введение электроноакцепторных групп в электронодефицитную систему понижает энергию НСМО. Это приводит к снижению разницы энергий НСМО \cdots ВЗМО взаимодействующих систем и, как результат, увеличению энергии взаимодействия.

Взаимодействия СН \cdots π -система

Взаимодействия СН \cdots π -система – это слабые [140] нековалентные π - σ взаимодействия в «Т-образной» или «У-образной» конфигурации [141–147].

Взаимодействия СН \cdots π -система с участием sp^3 -гибридизованного атома углерода С-Н связи называются «обычными», тогда как СН \cdots π -взаимодействия с участием sp^2 -/ sp -гибридизованного или сильно кислого атома углерода С-Н связи (например, связей с участием электроноакцепторных групп X_3C-H в хлороформе или ацетиленовых групп $C\equiv C-H$) значительно сильнее и направленнее «обычных» и называются «активированными» [140].

Отличительным свойством СН \cdots π -взаимодействий также является кооперативность, приводящая к множественным конкурентным СН \cdots π -взаимодействиям с ароматической системой и возможность реализации как в неполярных, так и в полярных протонных растворителях [140].

Энергия СН \cdots π -система взаимодействий больше как для π -избыточных, так и для π -дефицитных гетероароматических систем по сравнению с незамещенными системами [87] и зависит от природы как молекулярных фрагментов С-Н связи, так и ароматической π -системы:

– Электронодонорные заместители и галогены-заместители увеличивают силу СН \cdots π -взаимодействий за счет увеличения дисперсионных сил [148].

– Увеличение кислотности (электроотрицательности) донора протона С-Н связи за счет электроноакцепторных заместителей или sp^2 -/ sp -гибридизованных атомов углерода приводит к увеличению силы СН \cdots π -взаимодействий [149–153].

– Электронодонорные заместители ароматической системы увеличивают энергию ВЗМО; при этом электроноакцепторные заместители атома углерода С-Н донорной группы уменьшают энергию С-Н антисвязывающей орбитали; как результат, это приводит к понижению энергии энергетического барьера взаимодействующих орбиталей и усилению взаимодействия.

Взаимодействия NH...π-система и OH...π-система

К взаимодействиям -XH...π-система относятся слабые водородные связи с участием -OH, -NH, -SH и других групп-доноров водородной связи [142, 154], в которых облако π-электронов ароматической системы выступает в роли акцептора водородной связи, а поляризованная частично положительно заряженная -XH группа — в роли донора [155].

Энергия взаимодействия увеличивается с увеличением электроотрицательности атома донора водородной связи и при увеличении электронной плотности ароматической группы за счет введения электронодонорных групп [156]. Для гетероароматических азотсодержащих систем (пиридин, хиноксалин, фенатридин и др.) наблюдаются преимущественно водородные связи -NH...N(π) [156].

Взаимодействия неподеленная электронная пара...π-система

Во взаимодействиях НЭП...π-система участвуют π-электроны электронодефицитной ароматической системы и неподеленная электронная пара основания Льюиса. При этом вклад электростатических сил может в значительной степени варьироваться, определяя силу взаимодействия [157].

Сила НЭП...π-взаимодействий увеличивается с увеличением электронной плотности и, соответственно, кислотности, π-системы (например, в ряду бензол < пиридин < пирозин < триазин < тетразин) [158, 159, 160]. Кроме того, сила НЭП...π-взаимодействий значительно увеличивается при протонировании ароматической системы, приближаясь по силе к обычной водородной связи [159, 161] и увеличивается с увеличением электроотрицательности атома, несущего неподеленную электронную пару [158].

Так как в НЭП...π-взаимодействиях участвуют НСМО молекулы, несущей НЭП и ВЗМО второй π-системы, величина энергетического барьера НСМО...ВЗМО взаимодействующих молекул значительно влияет на энергию взаимодействия.

Взаимодействия катион...π-система

Взаимодействия катион...π-система — это нековалентные взаимодействия между отрицательно заряженной областью квадрупольной одной и катионом (монополюсом) второй π-системы [162]. Основной вклад в данное взаимодействие вносят электростатические и поляризационные эффекты [163]. Энергия взаимодействия катион...π-система, как и анион...π-система значительно больше (в среднем на порядок), чем энергия других

типов взаимодействий с участием π -систем, достигает нескольких десятков ккал/моль и находится на уровне водородных связей и солевых мостиков (40–20 ккал/моль) [112]. Несмотря на то, что сила взаимодействия увеличивается с увеличением плотности катиона [164–167], с увеличением полярности растворителя прочность комплекса и сила взаимодействия катион $\cdots\pi$ -система значительно снижается.

Энергия взаимодействия катион $\cdots\pi$ -система больше для π -избыточных гетероароматических систем из-за более высокой плотности π -электронов и увеличения вклада индуктивных и электростатических взаимодействий [87].

Электроноакцепторные заместители ослабляют взаимодействие катион $\cdots\pi$ -система, а электронодонорные – усиливают. Для очень сильных доноров или акцепторов поляризация может служить дополнительным фактором [87].

Взаимодействия анион $\cdots\pi$ -система

Анион $\cdots\pi$ -взаимодействия возникают между электронодефицитной ароматической системой и анионом [168–171]. Основной вклад вносят электростатические силы и ион-индуцированная поляризация ароматической системы [163, 172–174].

Сила анион $\cdots\pi$ -взаимодействий увеличивается с ростом плотности заряда аниона, положительного квадрупольного момента Q_{zz} ароматической системы и поляризуемости α ароматической системы [112], поэтому анион $\cdots\pi$ -взаимодействия особенно важны в случае сильно электронодефицитных или гетероароматических групп [87, 172, 174, 175].

Взаимодействия галоген $\cdots\pi$ -система

Галогеновые связи – это высоконаправленные нековалентные взаимодействия [176] с атомами галогенов и IV–VI групп, основанные на переносно-зарядовых, дисперсионных, электростатических и индукционных взаимодействиях, а также поляризационных эффектах [177]. Подобно взаимодействиям посредством водородных связей, галогеновые связи представляют собой одни из самых сильных межмолекулярных взаимодействий [177].

Галогеновые связи ЭАГ–Х \cdots В (где Х – Cl, Br, I) возникают между областью частичного положительного заряда электроотрицательного атома галогена «Х» (кислотой Льюиса, или донором связи), ковалентно связанного с электроноакцепторной группой «ЭАГ» [177] с одной стороны; и основанием Льюиса/электрононасыщенным субъектом «В» (нуклеофилом, или акцептором связи, например, атомом N, O, P, S и др.) с другой стороны.

Оттягивание электронной плотности атома галогена электроноакцепторной группой приводит к истощению электронной плотности электростатического потенциала и образованию положительно заряженной области на конце атома «X» (так называемой σ -«дырки»), окруженной поясом частичного отрицательного заряда [177].

Сила галоген- π -взаимодействий зависит от природы атома галогена, связанной ЭАГ и акцептора водородной связи [178]. Поскольку σ -«дырка» увеличивается при поляризации электронной плотности в сторону ковалентной связи R-X, энергия взаимодействия увеличивается, а направленность уменьшается с уменьшением электроотрицательности атома галогена-донора в ряду R-F \ll R-Cl < R-Br < R-I [177].

Так как одна из моделей объясняет переносно-зарядовую компоненту за счет взаимодействия между неподеленной электронной парой на ВЗМО нуклеофила «В» и σ^* -орбиталью на НСМО донора галогеновой связи R-X [177], снижение разницы энергий НСМО-ВЗМО взаимодействующих систем также приводит к увеличению энергии взаимодействия [178].

Взаимодействия с хинонами

Хиноны представляют собой циклические сопряженные дикетоны – окисленные производные ароматических соединений (например, бензохиноны, нафтохиноны, антрахиноны и др.), в которых четное число $-\text{CH}=\text{}$ связей замещены $-\text{C}(=\text{O})-$ связями [133]. Кетогруппы хинонов могут иметь различное расположение друг относительно друга (1,4-, 1,2-, 1,6-, 1,8-). Из-за происходящей при этом перегруппировки двойных связей ароматической системы образуется полностью сопряженная циклическая система. Из-за сильно электроотрицательного атома кислорода и электроноакцепторных свойств кетогруппы, хиноны представляют собой электронодефицитные ароматические системы.

Выводы по главе 1

Одной из актуальных проблем ОФХ режима с УФ-детектированием как наиболее распространенного режима высокоэффективной жидкостной хроматографии остается недостаточное удерживание и селективность в отношении полярных веществ. Значительное число веществ, в том числе полярных, содержат в своем составе ароматическую группу, что делает перспективным использование смешанных режимов ВЭЖХ с π -взаимодействиями для решения данных проблем.

Одним из наиболее энергетически выгодных и перспективных типов π -взаимодействий представляются параллельно-смещенные стэкинговые π -взаимодействия

с участием электронодефицитных ароматических групп, замещенных электроноакцепторными заместителями. Однако, несмотря на многообразие существующих коммерчески доступных и лабораторно полученных стационарных фаз, содержащих ароматические группы, их применение ограничено несколькими наиболее популярными фазами (фенильная и пентафторфенильная). Данные фазы содержат ароматические группы, неспособные обеспечить реализацию достаточно сильных π -взаимодействий и дополнительную селективность. Стационарные фазы, содержащие динитрозамещенные ароматические группы представляются перспективными для достижения данной цели, однако их применение и исследование ограничено рядом работ прошлого века или не имеет описанных в литературе случаев практического применения, в том числе для работы в ОФХ.

Кроме того, возможность реализации π -взаимодействий и управление селективностью в смешанном режиме ВЭЖХ осложняется отсутствием подробного элюотропного ряда для режима жидкостной хроматографии с π -взаимодействиями.

Таким образом, получение и исследование стационарных фаз, содержащих ароматические группы, обеспечивающие реализацию сильных π -взаимодействий, а также установление элюотропного ряда для смешанного режима ВЭЖХ с π -взаимодействиями представляется актуальной задачей.

2. Экспериментальная часть

2.1 Реактивы, материалы и оборудование

Растворители, использованные для анализа методом ВЭЖХ

Вода I степени чистоты, полученная с использованием системы очистки воды Simplicity-UV; ацетонитрил, для UV, IR, HPLC, ACS (Concord, Китай); метанол, для градиентной ВЭЖХ (Акваметрия, Россия); тетрагидрофуран, для изократической ВЭЖХ, нестабилизированный (Carlo Erba, Италия); изопропанол, х.ч. ТУ 2632-181-44493179-2014 (Экос 1, Россия); *o*-фосфорная кислота 85 %, ч.д.а. ГОСТ 6552-80 (Химреактивснаб, Россия); дигидрофосфат аммония, ч.д.а. ГОСТ 3771-74 (Вектон, Россия); формиат аммония, > 99 % CAS: 540-69-2 (Fluka, Германия); муравьиная кислота 85%, для анализа CAS: 64-18-6 (PanReac, Испания).

Растворители, использованные для установления элюотропного ряда

n-Гексан, х.ч. ТУ 2631-001-54260861-2013 (Криохром, Россия); *n*-гептан, эталонный ГОСТ 25828-83 (Экос 1, Россия); *n*-бутанол, ч.д.а. ГОСТ 6006-78 (Экос 1, Россия); изобутанол, ч.д.а. ГОСТ 6016-77 (Экос 1, Россия); *n*-пропанол, х.ч. ТУ 2632-106-44493179-07 (Экос 1, Россия); изопропанол, х.ч. ТУ 2632-181-44493179-2014 (Экос 1, Россия); этанол абс., 99,8 % для ВЭЖХ (Fisher Scientific, Великобритания), метанол, для градиентной ВЭЖХ (Акваметрия, Россия); метил-*трет*-бутиловый эфир для УФ, ИК, ВЭЖХ (PanReac, Испания); 1,4-диоксан, ч.д.а. ГОСТ 10455-80 изм.1 (Химмед, Россия); тетрагидрофуран, для изократической ВЭЖХ, нестабилизированный (Carlo Erba, Италия); пропионовая кислота \geq 99,5 % (Sigma Aldrich, США); пентановая кислота, ч. ТУ 6-09-528-75 (Экос 1, Россия); трихлорметан ос.ч. ТУ 2631-105-44493179-07 (Экос 1, Россия); дихлорметан, х.ч. ТУ 20.14.14.-295-44493179-2022 (Экос 1, Россия); 1,2-дихлорэтан, х.ч. ТУ 2631-085-44493179-2002 (Экос 1, Россия); 1,2-дихлорпропан, 98% CAS: 78-87-5 (Acros Organics, Бельгия); этилацетат, х.ч. ГОСТ 22300-76 (Экос 1, Россия); бутилацетат, ч. ГОСТ 22300-76 (Экос 1, Россия); бензол, х.ч. ГОСТ 5955-75 (Экос 1, Россия); метилбензол, ос.ч. 22-5 ТУ 2631-065-44493179-01 (Экос 1, Россия); 1,2-диметилбензол, х.ч. ТУ 2631-088-44493179-03 с изм. 1 (Экос 1, Россия); пропиленкарбонат, 99,5 % (Acros Organics, Бельгия); диметилкетон, ос.ч. ТУ 2633-039-44493179-00 (Экос 1, Россия); ацетонитрил, для UV, IR, HPLC, ACS (Concord, Китай); *N,N*-диметилформаид, х.ч. ГОСТ 20289-74 (Экос 1, Россия); диметилсульфоксид для ВЭЖХ (Fisher Scientific, Великобритания); *N,N*-диметилацетаид, 99 % (PanReac, Испания); *N*-метилпирролидон, х.ч. ТУ 20.59.52-211-44493179-2016 (Экос 1, Россия).

Растворители, использованные для анализа методом ЯМР

Дейтерированный метанол, степень дейтерирования > 99,8 % для ЯМР-спектроскопии MagniSolv (Merck, Германия).

Реактивы и растворители, использованные для получения стационарной фазы

Ацетонитрил, для UV, IR, HPLC, ACS (Concord, Китай); метанол, для градиентной ВЭЖХ (Акваметрия, Россия); метилбензол, ос.ч. 22-5 ТУ 2631-065-44493179-01 (Экос 1, Россия); 1-хлор-2,4-динитробензол, 97 % CAS: 97-00-7 (Sigma Aldrich, США); триэтиламин, ч.д.а. CAS: 121-44-8 (Компонент-реактив, Россия); пропионовая кислота \geq 99,5 % CAS: 79-09-4 (Sigma Aldrich, США); (3-аминопропил)триметоксисилан, 97 % CAS: 13822-56-5 (Fluka, Германия).

Реактивы, использованные для обработки силикагелевого сорбента

Силикагель Luna Phenomenex с размером частиц 5 мкм, размером пор около 100 нм, удельной площадью поверхности около 400 м²/г; соляная кислота, ос.ч. 20-4 ГОСТ 14261-77 с изм. 1 (Химреактивснаб, Россия).

Вещества, использованные для эксперимента по выбору ароматического селектора стационарной фазы

Метилбензол, ос.ч. 22-5 ТУ 2631-065-44493179-01 (Экос 1, Россия); 1,2-диметилбензол, х.ч. ТУ 2631-088-44493179-03 с изм. 1 (Экос 1, Россия); фенол, ч.д.а. ТУ 6-09-40-3245-90 (Вектон, Россия); метоксибензол > 99 % CAS: 100-66-3 (Химкрафт, Россия); анилин, ч.д.а. ГОСТ 5819-78 (Вектон, Россия); *N,N*-диэтиланилин, 99 % CAS: 91-66-7 (Acros Organics, Бельгия); дифениламин, > 99 % CAS: 122-39-4 (Химкрафт, Россия); 4-метоксианилин, 98 % CAS: 104-94-9 (Pallav Chemicals, Индия); 2-метоксифенол, 99 % ТУ 6-09-2123-72 CAS: 90-05-1 (Химкрафт, Россия); 4-аминофенол, 97 % CAS: 123-30-8 (Acros Organics, Бельгия); 2-изопропил-5-метилфенол, > 99,5 % ТУ 6-09-3736-79 CAS: 89-83-8 (Химкрафт, Россия); 1,2-диаминобензол 98 % CAS: 95-54-5 (Acros Organics, Бельгия); 1-нафтиламин \geq 99 % CAS: 134-32-7 (Sigma Aldrich, США); 1-нитронафталин, 99% ТУ 6-09-07-1056-78 CAS: 86-57-7 (Химкрафт, Россия); нафталин, > 99 %, ТУ 6-09-40-949-86, CAS: 91-20-3 (Химкрафт, Россия); антрацен, 99 % CAS: 120-12-7 (Sigma Aldrich, США); фенантрен, 98 % CAS: 85-01-8 (Химкрафт, Россия); нитробензол, ч. CAS: 98-95-3 (Реактив Экспресс, Россия); бензонитрил, 99 % CAS: 100-47-0 (Химкрафт, Россия); пиридин, х.ч. ТУ 2631-159-44493179-13 (Экос 1, Россия); пиразин-2-карбоксамид CAS: 98-96-4 (Озон, Россия); 1,2-дихлорбензол, > 99 % ТУ 6-09-11-1104-78 CAS: 89-83-8 (Химкрафт, Россия); 1,2-дицианобензол, > 98 % CAS: 91-15-6 (Химкрафт, Россия); 2-нитробензойная кислота, 99 % ТУ 6-09-801-76 CAS: 552-16-9 (Химкрафт, Россия); 3-нитробензойная кислота, 98 %

CAS: 121-92-6 (Acros Organics, Бельгия); 4-нитробензойная кислота, 98 % CAS: 62-23-7 (Sigma Aldrich, США); 1-хлорантрахинон (ПКФ Минкар, Россия), 1-аминоантрахинон > 98 % CAS: 82-45-1 (Химкрафт, Россия); 1,3-динитробензол 97 % CAS: 99-65-0 (Sigma Aldrich, США); 2,4-динитроанилин, > 99 % CAS: 97-02-9 (Химкрафт, Россия); 2,4-динитротолуол, 97 % CAS: 121-14-2 (Sigma Aldrich, США); 2,4-динитроанизол, 98 % CAS: 119-27-7 (Alfa Aesar, Германия); 1-хлор-2,4-динитробензол, 97 % CAS: 97-00-7 (Sigma Aldrich, США); 2,4-динитродифениламин, 98 % CAS: 961-68-2 (Sigma Aldrich, США).

Вещества-маркеры, использованные для исследования разработанной стационарной фазы

Кофеин 98 % CAS: 58-08-2 (Pallav Chemicals, Индия); 1,3-динитробензол 97 % CAS: 99-65-0 (Sigma Aldrich, США); 1,2-диметилбензол, х.ч. ТУ 2631-088-44493179-03 с изм. 1 (Экос 1, Россия); нафталин 98 % CAS: 91-20-3 (Sigma-Aldrich, США).

Лекарственные препараты и вещества, использованные для исследования возможности практического применения

«Гералив, таблетки 275 мг» (Bayer, Швейцария); «Пенталгин таблетки, покрытые пленочной оболочкой» (Отисифарм, Россия); «Цефекон Н Суппозитории ректальные 50 мг + 75 мг + 600 мг» (Нижфарм, Россия); «Ибуклин таблетки, покрытые пленочной оболочкой 400 мг + 325 мг» (Dr. Reddy's, Индия); «Кетопрофен субстанция-порошок» (Органика, Россия); «Ибупрофен субстанция-порошок» (ЮжФарм, Россия); «Парацетамол субстанция-порошок» (Китай); «Аскофен-П таблетки 200 мг + 40 мг + 200 мг» (Отисифарм, Россия); «Нитроксолин таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 50 мг» (Биосинтез, Россия); «Нифедипин таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг» (Озон, Россия); «Новокаина гидрохлорид стандартный образец предприятия», 99,9 % (Органика, Россия); «Диоксидин раствор для инфузий и наружного применения 10 мг/мл» (Новосибхимфарм, Россия). «Валсартан таблетки, покрытые пленочной оболочкой 160 мг» (Вертекс, Россия); «Нимесулид Реневал таблетки, 100 мг» (Реневал, Россия); «Фурацилин Реневал таблетки 20 мг для приготовления раствора для местного и наружного применения» (Обновление, Россия); «Фуразидин стандартный образец предприятия» (Усолье-Сибирский химфармзавод, Россия); «Фебуксостат Органика Таблетки, покрытые пленочной оболочкой 80 мг» (Органика, Россия); «Флумазенил субстанция»; «Нитразепам субстанция»; «Мелоксикам раствор для инъекций, внутримышечно 10мг/мл» (Озон, Россия); стандартный образец молярной концентрации холестерина в крови ГСО 9913-2011, ТУ 9398-015-94568735-2010 (Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д. И. Менделеева, Россия).

Оборудование

Ванна ультразвуковая Elmasonic P10H (Elma, Германия);

Система очистки воды Simplicity-UV (MerckMillipore, Германия);

Весы аналитические GR-200 (A&D, Япония);

Пакер объемом 30 мл для упаковки хроматографической колонки сорбентом (uHPLCs Scientific instruments Co. Ltd., Китай);

Корпус хроматографической колонки размером 150 × 4,6 мм с фритой из нержавеющей стали для упаковки сорбентом (uHPLCs Scientific Instruments Co. Ltd., Китай);

Жидкостной хроматограф Agilent 1200 Infinity LC, оснащенный спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны и рефрактометрическим детектором (Agilent Technologies, США);

Жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity LC, оснащенный рефрактометрическим детектором (Agilent Technologies, США);

Жидкостной хроматограф Ultimate 3000, оснащенный спектрофотометрическим детектором (Dionex, США);

ЯМР-спектрометр Bruker AVANCE 400 III HD (Bruker, США);

Газовый хромато-масс-спектрометр GCMS QP2020 (Shimadzu, Япония);

Прибор для проведения синхронного термического анализа TG-DTA STA 449F1 (NETZSCH, Германия).

Вспомогательное оборудование

Одноканальный дозатор переменного объема, 100–1000 мкл, (LLG labware);

Одноканальный дозатор переменного объема, 20–200 мкл, (LLG labware);

Одноканальный дозатор переменного объема, 5–50 мкл, (LLG labware);

Флаконы пенициллиновые НС-3, ФО-10 мл;

Пробирки центрифужные 1,5 мл (Eppendorf);

Виалы, объем 1,5 мл, с винтовой резьбой № 9, септа силиконовая (Agilent Technologies);

Шприцевые фильтры PTFE d = 20 мм, размер пор 0,45 мкм (Agilent Technologies);

Центрифуга CM-50 с герметичным ротором 50.01 (Eppendorf);

Вихревой встряхиватель Vortex Genius 3 (IKA).

Хроматографические колонки

Колонка XBridge C8 50 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Waters Corp., США); Колонка Spherisorb ODS-2 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Waters Corp., США); Колонка Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Rapid Resolution 150 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Agilent Technologies, США); Колонка Luna PFP(2) 150 × 4,6 мм, 3 мкм (Phenomenex, США); Колонка COSMOSIL 5PPE 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Nacalai Tesque Inc., Япония).

2.2 Методики синтеза и анализа

2.2.1 Процедура подготовки силикагеля

Силикагелевый сорбент с размером частиц 5 мкм извлекали из вышедших из строя хроматографических колонок Luna C18 и C18(2) размером 250 × 4,6 мм и 150 × 4,6 мм с помощью насоса хроматографической системы. Далее силикагель прокаливали в муфельной печи при температуре 600 °С в течение 12 ч для удаления привитых октадецилсилильных групп и адсорбированных органических веществ (рисунок 11).

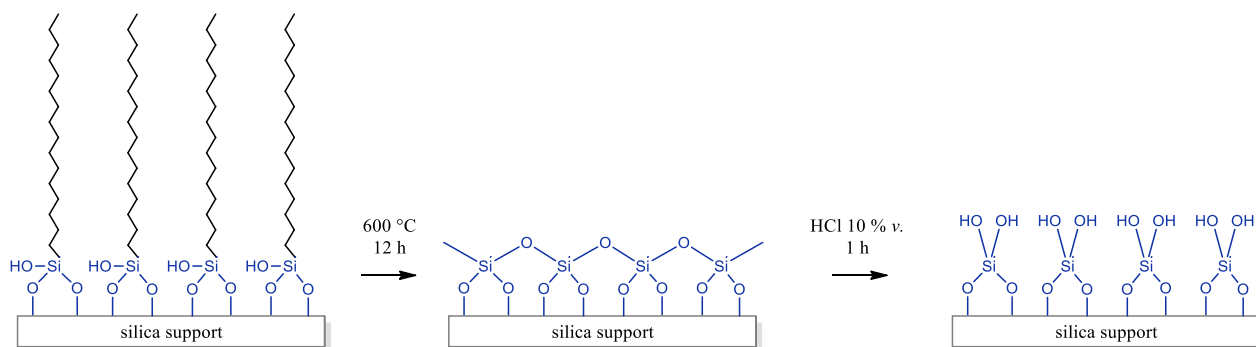


Рисунок 11 – Схема обработки силикагелевого сорбента

Прокаленный силикагель обрабатывали раствором соляной кислоты (10 % об.) при воздействии ультразвука в течение 1 часа для регидроксилирования силанольных групп (рисунок 11) [179], промывали ацетонитрилом и сушили при комнатной температуре. Далее силикагель сушили в сушильном шкафу при температуре около 140 °С в течение 3 часов для удаления адсорбированной воды.

*2.2.2 Процедура получения модифицирующего агента, содержащего
N-алкилзамещенную 2,4-динитроанилиновую группу и силанизирующие группы*

В полипропиленовую пробирку объемом 50 мл помещали 1-хлор-2,4-динитробензол (1 г, 4,94 ммоль), растворяли в 4 мл толуола, аккуратно добавляли (3-аминопропил)три-метоксисилан (840 мкл, 4,44 ммоль), триэтиламин (1400 мкл; 9,87 ммоль) и обрабатывали на ультразвуковой ванне в течение 5 минут.

Контроль протекания реакции проводили методом ВЭЖХ с УФ-детектированием (таблица 5). Для этого из реакционной массы отбирали аликвоту объемом 100 мкл, к аликвоте добавляли 200 мкл пропионовой кислоты для нейтрализации триэтиламина, 200 мкл воды для гидролиза силанольных групп и обрабатывали на ультразвуковой ванне в течение 1 минуты. Полученный испытуемый раствор помещали в виалу и сразу хроматографировали. В качестве раствора сравнения использовался толуольный раствор 1-хлор-2,4-динитробензола в концентрации 1 % от полученного испытуемого раствора.

Таблица 5 – Хроматографические условия контроля протекания реакции получения модифицирующего реагента AWE-241

Стационарная фаза:	XBridge C8 50 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Waters)
Подвижная фаза:	CH ₃ CN – вода (60:40)
Температура колонки, °С:	30
Скорость потока подвижной фазы, мл/мин:	2
Длина волны УФ-детектора, нм:	240
Объем ввода пробы, мкл:	1

2.2.3 Процедура модификации поверхности силикагеля модифицирующим агентом

В полипропиленовую пробирку с полученным модифицирующим реагентом добавляли 5 мл толуола, 2 г подготовленного силикагеля и выдерживали в ультразвуковой ванне при температуре 80 °С в течение 8 ч.

2.2.4 Процедура набивки колонки

В пластиковую пробирку объемом 50 мл помещали модифицированный силикагель (около 2,0 г), растворитель (около 30 мл смеси ТГФ–ИПС–толуол в объемном соотношении 1:1:1) и диспергировали при помощи ультразвуковой ванны и встряхивателя типа вортекс в течение 10 мин. Полученную суспензию быстро переносили в пакер и присоединяли

набиваемую колонку (150 × 4,6 мм). Для набивки колонки использовался насос ВЭЖХ системы Ultimate 3000 (Dionex, США), обеспечивающий давление до 600 бар.

Подавали продавливающий растворитель (ТГФ–ИПС–толуол в объемном соотношении 1:1:1) со скоростью, обеспечивающей давление в хроматографической системе около 600 бар, в течение 30 мин, затем поддерживая такое же давление подавали последовательно смесь ИПС–ТГФ (1:1) и воду. После окончания набивки снимали колонку, убеждались в отсутствии полости на входе в колонку, надевали фритту, закручивали входную гайку и обозначали направление набивки.

2.3 Метрологическая оценка методики количественного определения действующих веществ лекарственного препарата «Ибуклин»

2.3.1 Линейность

Для приготовления градуировочных растворов с целью установления линейной зависимости 0,02 г АФС парацетамола (с точностью до четвертого знака) и 0,025 г АФС ибупрофена (с точностью до четвертого знака) помещали в мерную колбу вместимостью 25 см³, растворяли в метаноле при помощи ультразвуковой ванны и доводили объем раствора до метки. Аликвоту приготовленного раствора (объемом в соответствии с Таблица 44) переносили в мерную колбу вместимостью 10 см³, доводили объем раствора до метки подвижной фазой, перемешивали и переносили в виалу для дальнейшего анализа.

2.3.2. Предел обнаружения и предел количественного определения

Для оценки предела обнаружения (ПО) и количественного определения (ПКО) подбирали концентрацию раствора АФС парацетамола и ибупрофена, обеспечивающую значение сигнал/шум $S/N > 10$ для ПКО и $S/N > 3$ для ПО. Соответствующие значения ПО и ПКО рассчитывали с использованием программного обеспечения хроматографа на основе метода ASTM.

2.3.3 Повторяемость и прецизионность

Для приготовления испытуемых растворов 0,20 г АФС парацетамола (с точностью до четвертого знака) и 0,25 г АФС ибупрофена (с точностью до четвертого знака) помещали в мерную колбу вместимостью 25 см³, растворяли в метаноле, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. Аликвоту полученного раствора объемом 4,0 см³

переносили в мерную колбу вместимостью 10 см³, доводили объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивали и переносили в виалу для дальнейшего анализа.

В качестве раствора сравнения использовался модельный раствор АФС парацетамола и ибупрофена той же концентрации.

2.3.4 Правильность

Правильность определения методики контролировали методом добавок с использованием АФС парацетамола и ибупрофена.

Испытуемый раствор. Для приготовления испытуемого раствора 0,05 г АФС парацетамола (с точностью до четвертого знака) и 0,075 г АФС ибупрофена (с точностью до четвертого знака) помещали в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяли в метаноле, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. Аликвоту полученного раствора объемом 2,0 см³ переносили в мерную колбу вместимостью 10 см³, доводили объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивали и переносили в виалу для дальнейшего анализа.

Раствор добавки. Для приготовления раствора добавки 0,05 г АФС парацетамола (с точностью до четвертого знака) и 0,075 г АФС ибупрофена (с точностью до четвертого знака) помещали в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяли в метаноле, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали.

Испытуемый раствор с добавкой. Для приготовления испытуемого раствора с добавкой аликвоту испытуемого раствора объемом 2,0 см³ переносили в мерную колбу вместимостью 10 см³, добавляли аликвоту раствора добавки объемом 2,0 см³, доводили объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивали и переносили в виалу для дальнейшего анализа.

3. Обсуждение результатов

3.1 Установление элюотропного ряда для режима жидкостной хроматографии с параллельно-смещенными стэкингowymi взаимодействиями

Один из способов реализации более сильных π -взаимодействий в жидкостной хроматографии – использование растворителя, в меньшей степени подавляющего π -взаимодействия. Элюотропный ряд является одним из важнейших инструментов для регулирования селективности и удерживания анализируемых веществ. Однако, для режима жидкостной хроматографии с параллельно-смещенными стэкингowymi взаимодействиями не существует систематизированного и опубликованного подробного элюотропного ряда.

Для установления элюотропного ряда для режима жидкостной хроматографии с параллельно-смещенными стэкингowymi взаимодействиями проведена серия экспериментов по удерживанию 1,3-динитробензола (1,3-ДНБ) в качестве вещества-маркера на пиренэтильной стационарной фазе при использовании различных растворителей.

3.1.1 Стационарная фаза

В качестве стационарной фазы выбрана пиренэтильная стационарная фаза COSMOSIL 5PYE (рисунок 12). Данная фаза содержит конденсированную ароматическую группу, обеспечивающую реализацию более сильных π -взаимодействий, чем популярные фенильная и пентафторфенильная стационарные фазы ([56], раздел 3.2).

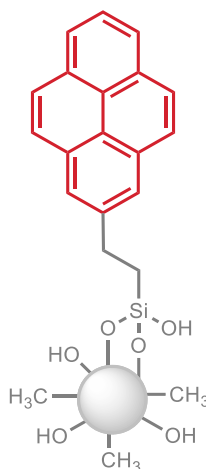


Рисунок 12 – Структурная формула стационарной фазы COSMOSIL 5PYE, Nacalai Tesque Inc.

3.1.2 Подвижная фаза

В качестве начальной подвижной фазы использован состав *n*-гексан – изопропанол в объемном соотношении (60:40 об./об.), который замещался исследуемым растворителем (1%, 3%, 5%, 10%, 15% и 20% по объему от начальной подвижной фазы, таблица 6). Данный состав позволяет минимизировать вклад дисперсионных взаимодействий и гидрофобного эффекта в механизм удерживания, реализуемый в данных условиях.

Таблица 6 – Состав подвижной фазы, использованной для установления элюотропного ряда

<i>Исследуемый растворитель</i>	Содержание, %						
	0	1	3	5	10	15	20
<i>Изопропанол</i>	40	39,6	38,8	38	36	34	32
<i>n-Гексан</i>	60	59,4	58,2	57	54	51	48

Чистый гексан обеспечивает чрезмерно сильное и нестабильное время удерживания 1,3-ДНБ ($k' \sim 38$), а также не смешивается с некоторыми исследуемыми растворителями (карбоновые кислоты, ацетонитрил, метанол, вода и пропиленкарбонат). В связи с этим, использована смесь *n*-гексан – изопропанол в объемном соотношении (60:40 об./об.). Использование некоторых растворителей было ограничено более низкими значениями из-за их физико-химических свойств (таблица 7). Формирование конечного состава подвижной фазы обеспечивалось с помощью коробки градиент-дозировочных клапанов жидкостного хроматографа, воспроизводимость и точность работы которой оценивались с помощью ацетоновых тестов (приложение А).

Таблица 7 – Максимальные значения исследованного объема некоторых растворителей, использованных для установления элюотропного ряда

Растворитель	Максимальное исследованное значение, % об.	Причина
<i>Вода</i>	5	Не смешивается с начальным составом подвижной фазы
<i>Пропиленкарбонат</i>	5	
<i>1,4-Диоксан</i>	3	Агрессивное воздействие по отношению к оборудованию или стационарной фазе
<i>Дихлорметан</i>	15	
<i>Пентановая кислота</i>	5	
<i>Пропионовая кислота</i>	5	

3.1.3 Вещества-маркеры π -взаимодействий

В качестве веществ-маркеров для оценки силы параллельно-смещенных стэкингных π -взаимодействий был исследован широкий ряд веществ (раздел 3.2, таблица 9). В качестве вещества-маркера был выбран 1,3-ДНБ, так как он содержит две сильно электроноакцепторных нитрогруппы, обеспечивающие реализацию достаточно сильных π -взаимодействий, и при этом не содержит заряженных функциональных групп или групп, способных образовывать сильные галогеновые или водородные связи и исказить оценку силы π -взаимодействий.

3.1.4 Элюирующая сила растворителей

На основе экспериментально полученных значений зависимости коэффициента удерживания k' 1,3-ДНБ от количества и типа исследуемого растворителя строились графики (для наиболее распространенных в ОФХ растворителей см. рисунок 13а, для остальных растворителей см. приложение Б, таблица 8). Кривые зависимости представлены линиями тренда (за исключением группы высокополярных растворителей, линия тренда которых продемонстрировала значительное отклонение от экспериментально полученных значений). Для оценки влияния активной части молекулы растворителя, объем замещенного состава растворителя был пересчитан в количество, ммоль с использованием молярной массы и плотности растворителей из литературных источников [14, 180, 181] (рисунок 13б, приложение Б). Физико-химические свойства исследованных растворителей представлены в приложении В.

Алифатические растворители

Алканы (на примере гексана и гептана) не содержат ароматических, полярных функциональных групп или гетероатомов и не обладают значительным дипольным моментом, в связи с чем являются единственной группой растворителей, которые продемонстрировали увеличение удерживания 1,3-ДНБ при замене начального состава подвижной фазы (таблица 8, рисунок 13, приложение Б). Данное явление связано с уменьшением относительного содержания изопропанола в начальном составе подвижной фазы, имеющего бóльшую элюирующую силу, чем алканы.

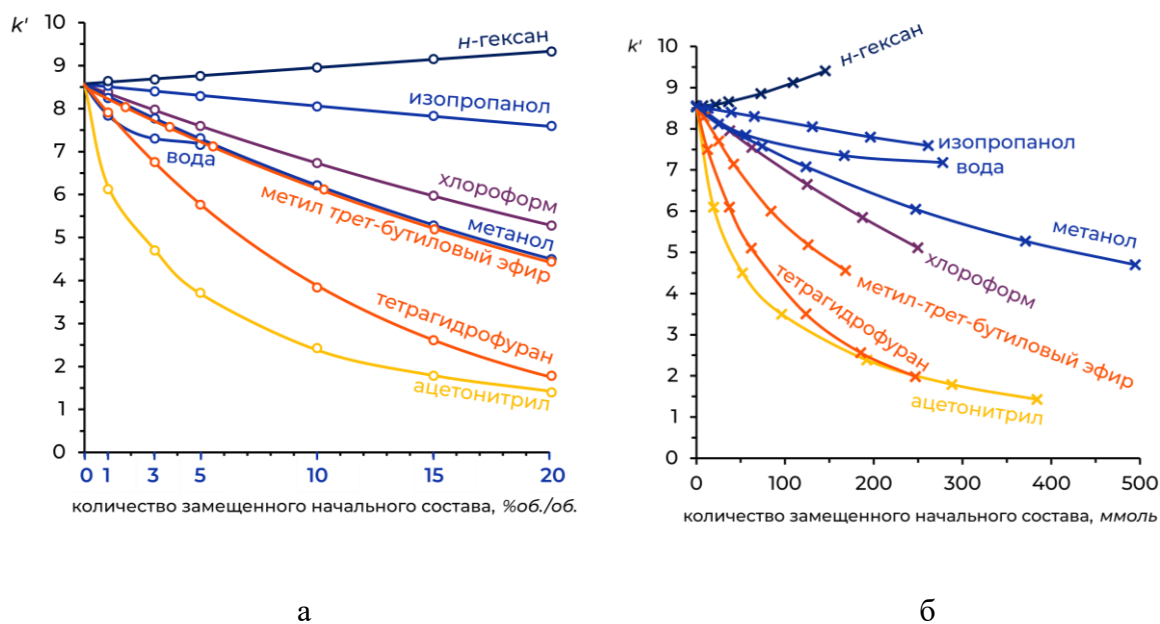


Рисунок 13 – Графики зависимости коэффициента удерживания k' 1,3-ДНБ для некоторых исследованных растворителей: а – от объема замещенного начального состава *n*-гексан – изопропанол (60:40); б – от количества замещенного начального состава *n*-гексан – изопропанол (60:40), ммоль.

Протонные растворители

Протонные растворители (спирты и вода) продемонстрировали широкий диапазон элюирующей силы, которая увеличивается с уменьшением длины углеводородной цепи и особенно резко для низших спиртов (таблица 8, рисунок 13, приложение Б). При этом, разница в элюирующей силе спиртов значительно снижается уже при переходе к спиртам, содержащим 3–4 атома углерода в углеводородной цепи. Увеличение элюирующей силы спиртов с уменьшением длины цепи противоречит гипотезе о влиянии увеличения электронной плотности неподеленной пары атома кислорода гидроксильной группы за счет индуктивного эффекта. Данный эффект скорее всего связан с увеличением относительной массы полярной части молекулы.

Карбоновые кислоты

Карбоновые кислоты на примере пентановой и пропионовой кислот демонстрируют относительно слабую элюирующую силу, сопоставимую с протонными растворителями. Элюирующая сила для исследованных карбоновых кислот примерно равна из-за схожей длины и вклада индуктивного электронного эффекта алкильных углеводородных цепей (таблица 8, приложение Б).

Таблица 8 – Экспериментальные данные элюирующей силы растворителей для параллельно-смещенных стэкинг-π-взаимодействий

Растворитель	Тип растворителя	Коэффициент удерживания k'_{13DNB}						
		Количество замещенного начального состава подвижной фазы <i>n</i> -гексан – изопропанол (60:40)						
		0	1	3	5	10	15	20
<i>Гептан</i>	Алифатические	8,56	8,56	8,61	8,79	9,12	9,07	9,31
<i>Гексан</i>			8,60	8,63	8,66	8,92	9,20	9,51
<i>Изобутанол</i>	Протонные		8,50	8,42	8,35	8,20	8,05	7,92
<i>n</i> - <i>Бутанол</i>			8,45	8,30	8,15	7,75	7,40	7,01
<i>Изопропанол</i>			8,50	8,40	8,30	8,05	7,80	7,59
<i>Вода</i>			7,85	7,35	7,18	—	—	—
<i>n</i> - <i>Пропанол</i>			8,50	8,30	8,10	7,70	7,30	7,00
<i>Этанол</i>			8,20	7,86	7,59	6,98	6,47	6,07
<i>Метанол</i>			8,12	7,58	7,08	6,05	5,27	4,70
<i>Пентановая к-та</i>			Карбоновые кислоты	8,24	7,82	7,40	—	—
<i>Пропионовая к-та</i>	8,25			7,57	6,88	—	—	—
<i>Хлороформ</i>	Галогеналканы		8,35	7,95	7,55	6,65	5,85	5,11
<i>Дихлорметан</i>			8,20	7,50	6,89	—	—	—
<i>1,2-Дихлорэтан</i>			8,11	7,25	6,50	4,92	3,80	2,99
<i>1,2-Дихлорпропан</i>			7,90	7,10	6,50	5,29	4,47	3,75
<i>Бензол</i>	Ароматические		8,20	7,61	6,84	5,61	4,74	4,02
<i>Толуол</i>			7,97	7,51	6,80	5,60	4,69	3,97
<i>n</i> - <i>Ксилол</i>			8,10	7,34	6,70	5,50	4,62	3,92
<i>Бутилацетат</i>	Сложные эфиры		7,90	7,00	6,14	4,70	3,72	3,02
<i>Этилацетат</i>			7,60	6,45	5,58	4,03	3,12	2,51
<i>Метил-трет-бутиловый эфир</i>	Простые эфиры	8,29	7,70	7,14	6,00	5,18	4,56	
<i>1,4-Диоксан</i>		7,70	6,29	—	—	—	—	
<i>Тetraгидрофуран</i>		7,50	6,10	5,10	3,51	2,56	1,98	
<i>Ацетон</i>	Высоко-полярные	8,56	6,81	5,52	4,36	2,88	2,11	
<i>Ацетонитрил</i>		6,1	4,5	3,5	2,38	1,79	1,43	
<i>Пропилен карбонат</i>		6,32	4,80	4,15	—	—	—	
<i>N,N</i> - <i>Диметил-ацетамид</i>		6,36	4,65	3,65	2,21	1,55	1,16	
<i>Диметилсульфоксид</i>		6,95	5,11	3,83	2,26	1,58	1,20	
<i>N,N</i> - <i>Диметил-формамид</i>		6,28	4,50	3,40	2,07	1,47	1,09	
<i>N</i> - <i>Метил-2-пирролидон</i>		6,32	4,37	3,34	1,93	1,32	0,96	

Галогеналканы

Галогеналканы на примере хлороформа, дихлорметана, 1,2-дихлорэтана и 1,2-дихлорпропана, обладают средней элюирующей силой, которая для данных представителей увеличивается с уменьшением гидрофобности молекулы растворителя (уменьшением длины углеводородной цепи и уменьшением числа атомов галогена в составе молекулы) (таблица 8, рисунок 13, приложение Б).

Ароматические растворители

Элюирующая сила исследованных ароматических растворителей увеличивается пропорционально числу метильных заместителей в составе ароматической системы в ряду: бензол < толуол < ксилол. Данный экспериментальный факт можно объяснить увеличением электронной плотности молекул ароматического растворителя при введении электронодонорных заместителей и конкурентным π -взаимодействием с образованием переносно-зарядового комплекса с 1,3-ДНБ (таблица 8, приложение Б).

Сложные эфиры

Сложные эфиры обладают сравнительно высокой элюирующей силой, что может быть связано с высоким дипольным моментом, вызванным наличием неподеленных электронных пар атомов кислорода и индуктивным эффектом углеводородных заместителей. Элюирующая сила сложных эфиров на примере этилацетата и бутилацетата увеличивается с уменьшением длины алкильной цепи аналогично спиртам и также может быть связана с увеличением относительной массы полярной части молекулы (таблица 8, приложение Б).

Простые эфиры

Простые эфиры на примере линейного представителя – метил-*трет*-бутилового эфира (МТБЭ), циклических представителей – тетрагидрофурана (ТГФ) и 1,4-диоксана демонстрируют сравнительно высокую элюирующую силу, что, очевидно, также связано с высоким дипольным моментом данных растворителей из-за наличия двух неподеленных электронных пар на атоме кислорода (таблица 8, рисунок 13, приложение Б). Элюирующая сила простых эфиров аналогично спиртам увеличивается от МТБЭ к ТГФ и 1,4-диоксану, что также может быть связано с уменьшением гидрофобной части молекулы.

Высокополярные растворители

Высокополярные растворители (ацетон, ацетонитрил и др.) продемонстрировали наибольшее влияние на коэффициент удерживания 1,3-ДНБ в зависимости от количества замещенного начального состава подвижной фазы (таблица 8, рисунок 13, приложение Б). При этом, кривая зависимости приобретает выраженную гиперболическую форму зависимости. Установленную закономерность можно объяснить высоким дипольным моментом высокополярных растворителей, что способствует долгому времени адсорбции на поверхности пиренэтильного селектора и блокированию возможности его взаимодействия с 1,3-ДНБ.

Выводы по главе 3.1

В ходе установления элюотропного ряда для параллельно-смещенных стэкинг- π -взаимодействий с использованием пиренэтильной стационарной фазы, подвижной фазы *n*-гексан – изопропанол (60:40) исследовано несколько групп наиболее применимых в различных режимах ВЭЖХ растворителей. Обнаружено, что наименьшей элюирующей силой обладают алканы и протонные растворители, такие как спирты и вода, позволяя реализовать наиболее сильные π -взаимодействия для обеспечения дополнительной селективности по отношению к веществам, содержащим ароматическую группу.

Наибольшей элюирующей силой обладают высокополярные растворители (такие как ацетон, ацетонитрил, диметилсульфоксид, *N,N*-диметилформамид и др.) и простые эфиры (тетрагидрофуран, 1,4-диоксан), что позволяет использовать их в небольшом количестве в качестве модифицирующей добавки в подвижную фазу для управления силой π -взаимодействий и хроматографической селективностью.

3.2 Выбор ароматического селектора для получения стационарной фазы, обеспечивающей реализацию сильных π -взаимодействий

Для определения структуры ароматического селектора, обеспечивающего наиболее сильные π -взаимодействия, проведен скрининговый эксперимент с использованием подхода Welch «иммобилизованный гость» [182] по удерживанию ряда ароматических веществ различного характера на пиренэтильной, фенильной и пентафторфенильной стационарных фазах (рисунок 14, таблица 9). В качестве подвижной фазы использован состав *n*-гексан – изопропанол (60:40), обеспечивающий достаточно сильное удерживание для точной оценки силы π -взаимодействий. Ароматические группы, демонстрирующие наиболее сильное удерживание, являются наиболее перспективными селекторами для создания новой стационарной фазы.

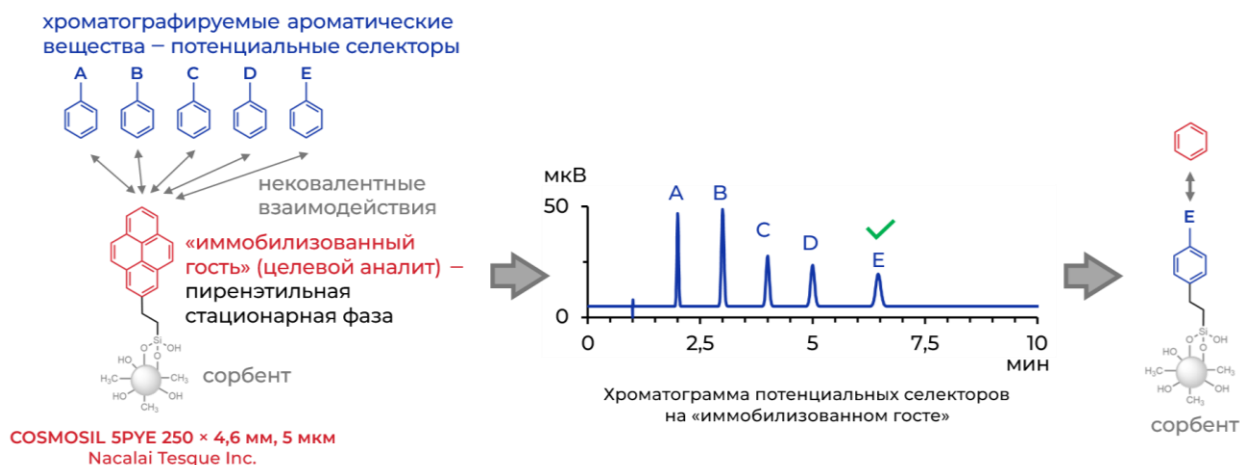


Рисунок 14 – Схема подхода «иммобилизованный гость» Welch для выбора ароматической группы стационарной фазы

Из представленных данных (таблица 9) можно сделать вывод, что пиренэтильная и пентафторфенильная стационарные фазы обеспечивают более сильное удерживание для всех типов веществ, содержащих ароматическую группу по сравнению с фенилгексильной стационарной фазой. Селектор пентафторфенильной стационарной фазы комплементарен по природе ароматической группы пиренэтильной фазе и обеспечивает более сильное удерживание для электрононасыщенных ароматических групп, но в целом демонстрирует значительно более слабое удерживание. Таким образом, для дальнейшего обсуждения результатов оценки силы π -взаимодействий использованы результаты, полученные на пиренэтильной стационарной фазе (рисунок 14, рисунок 15, таблица 9).

Таблица 9 – Значения коэффициентов удерживания k' ароматических веществ различной природы на исследованных стационарных фазах с ароматическими селекторами

Группа	Вещество	№	PYE	PHENYL	PFP
Ароматические системы с электронодонорным и заместителями	<i>2-изопропил-5-метилфенол</i>	1	0,20	0,04	0,25
	<i>фенол</i>	2	0,21	0,04	0,31
	<i>метилбензол</i>	3	0,25	0,13	0,38
	<i>1,2-диметилбензол</i>	4	0,27	0,15	0,39
	<i>2-метоксифенол</i>	5	0,33	0,13	0,43
	<i>метоксибензол</i>	6	0,34	0,19	0,44
	<i>N,N-диэтиланилин*</i>	7	0,38	0,25	0,51
	<i>дифениламин*</i>	8	0,38	0,20	0,32
	<i>анилин*</i>	9	0,47	0,21	0,88
	<i>1,2-диаминобензол*</i>	10	3,80	0,82	8,83
Конденсированные ароматические системы	<i>нафталин</i>	11	0,36	0,22	0,44
	<i>1-нафтиламин*</i>	12	0,52	0,25	0,68
	<i>фенантрен</i>	13	0,58	0,30	0,52
	<i>антрацен</i>	14	0,59	0,30	0,50
	<i>1-нитронафталин</i>	15	1,01	0,33	0,60
Ароматические системы с электроноакцепторными заместителями	<i>1,2-дихлорбензол</i>	16	0,35	0,30	0,40
	<i>бензонитрил</i>	17	0,63	0,23	0,59
	<i>нитробензол</i>	18	0,64	0,26	0,55
	<i>пиридин*</i>	19	1,28	0,37	2,32
	<i>пиразинамид*</i>	20	2,52	0,85	11,31
	<i>1,2-дицианобензол</i>	21	3,01	0,36	–
Нитробензойные кислоты	<i>2-нитробензойная кислота*</i>	22	0,44	0,18	–
	<i>3-нитробензойная кислота*</i>	23	0,50	0,13	3,26
	<i>4-нитробензойная кислота*)*</i>	24	0,49	0,14	3,10
Хиноны	<i>1-аминоантрахинон</i>	25	1,21	0,22	0,53
	<i>1-хлорантрахинон</i>	26	5,11	0,50	0,59
Ароматические системы, замещенные несколькими нитрогруппами	<i>2,4-динитроанилин</i>	27	1,22	0,17	0,64
	<i>N,N-диэтил-2,4-динитроанилин</i>	28	3,14	0,45	0,75
	<i>1,3-динитробензол</i>	29	8,16	0,45	0,60
	<i>N-диметил-2,4-динитроанилин</i>	30	8,31	0,53	0,90
	<i>2,4-динитротолуол</i>	31	8,67	0,44	0,60
	<i>2,4-динитрохлорбензол</i>	32	9,05	0,53	0,49
	<i>2,4-динитроанизол</i>	33	9,53	0,44	0,78
	<i>2,4-динитродифениламин</i>	34	10,18	0,65	0,74
	<i>N-бутил-2,4-динитроанилин</i>	35	22,6	0,53	0,76
	<i>N-бутил-2,4-динитронафтиламин</i>	36	9,55	–	–

Вещества, содержащие электрононасыщенные ароматические группы, замещенные одним или несколькими электронодонорными заместителями, не демонстрируют значительного удерживания (таблица 9). Для некоторых ароматических систем (отмечены символом «*»), содержащих в своем составе азот (гетероциклические или аминозамещенные ароматические соединения) наблюдается сильное удерживание, а также неправильная асимметричная форма пика, что может быть связано с реализацией других типов π -взаимодействий (катион $\cdots\pi$, водородные связи (NH) $\cdots\pi$ и др.) и нежелательными взаимодействиями с силанольными группами на поверхности сорбента.

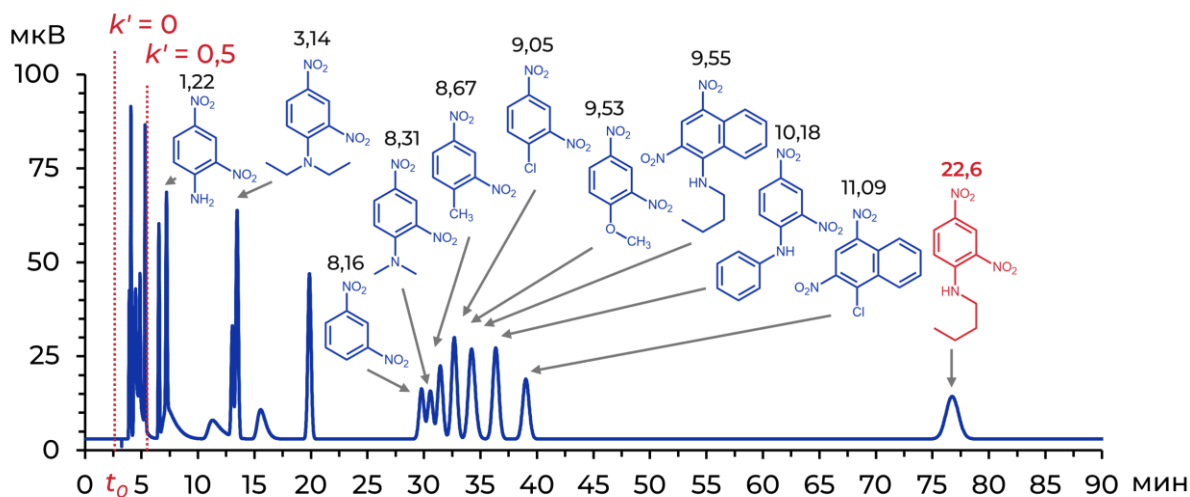


Рисунок 15 – Смоделированная на основе экспериментально полученных значений коэффициентов удерживания и асимметрии пиков исследованных потенциальных ароматических селекторов на пиренэтильной стационарной фазе

Для конденсированных ароматических групп удерживание незначительно увеличивается с увеличением числа ароматических сопряженных ароматических групп в ряду бензол > нафталин > антрацен, фенантрен. Однако, конденсированные ароматические группы, как и электроноизбыточные ароматические группы, демонстрируют низкое удерживание уже при использовании начального состава *n*-гексан – изопропанол (значение коэффициента удерживания $k' < 1$). Исключение составляет 1-нитронафталин, который демонстрирует несколько большее удерживание, связанное с электроноакцепторным характером нитрогруппы.

Ароматические группы, содержащие несколько слабых электроноакцепторных заместителей, а также нитробензойные кислоты не демонстрируют значительное удерживание. Нитрозамещенные ароматические кислоты приводят к пикам с высоким значением коэффициента асимметрии A_s , что может быть связано, предположительно, с ионообменными взаимодействиями.

Соединения класса хинонов демонстрируют относительно высокое значение $k' = 1,21$ и $5,11$ для 1-аминоантрахинона и 1-хлорантрахинона соответственно. Бóльшее удерживание для хлорпроизводного антрахинона может быть связано со слабым электронодонорным характером атома хлора и, как результат, более электронодефицитным характером сопряженной системы данного антрахинона.

Наибольший интерес представляют вещества, содержащие ароматическую группу, замещенную несколькими сильно электроноакцепторными заместителями, такими как нитрогруппы, что делает их перспективными для использования в качестве ароматических

селекторов. Вещества данной группы демонстрируют широкий диапазон удерживания в зависимости от природы заместителя (потенциальной линкерной группы), присутствующего в ароматической системе помимо нитрогрупп.

Наиболее сильное удерживание наблюдается для моно *N*-алкилзамещенных моноциклических динитроароматических соединений. Таким образом, в качестве ароматического селектора выбран моно *N*-алкилзамещенный 2,4-динитроанилин.

Выводы по главе 3.2

В ходе эксперимента с применением подхода Welch «иммобилизованный гость» по выбору ароматического селектора стационарной фазы установлено, что наиболее перспективными группами для использования в качестве ароматического селектора представляются ароматические группы, замещенные двумя и более нитрогруппами, а именно – моно *N*-алкилзамещенные производные 2,4-динитроанилина.

3.3 Получение стационарной фазы с 2,4-динитроанилиновым селектором

3.3.1 Подготовка силикагеля

Для получения стационарной фазы был использован силикагель, извлеченный из вышедших из строя колонок Phenomenex Luna C18(2) [183]. Для этого полностью пористый силикагель с привитыми октадецилсилильными группами с размерностью частиц около 5 мкм и диаметром пор около 10 нм подготавливался согласно процедуре, описанной в главе 2.2.1 (сжигание в муфельной печи при 600 °С, обработка соляной кислотой 10 % об. и сушка).

Для оценки поверхностных свойств силикагеля после данной обработки оценивалась удельная площадь поверхности и пористость силикагеля методом многослойной адсорбции Брунауэра, Эммета и Теллера (БЭТ) и средний размер пор методом Барретта-Джойнера-Халенды (БДХ) (таблица 10). Результаты исследования подтверждают сохранение поверхностных свойств, заявленных производителем и возможность использования силикагеля для дальнейшей работы [183].

Таблица 10 – Результаты определения параметров пористости и площади удельной поверхности обработанного силикагеля

	$S_{уд}$ (БЭТ), м ² /г	Средняя пористость силикагеля, см ³ /г	Средний размер пор, (БДХ) (4V/A), нм
<i>Заявленное значение</i> [183]	400	–	10
<i>Результат</i>	364	0,89	8,6

3.3.2 Расчет необходимого количества силикагеля и модификатора для модификации поверхности силикагеля

Для набивки колонки длиной 15 см и внутренним диаметром 0,46 см, необходима масса силикагеля, имеющего среднее значение пористости (таблица 10, уравнение 2 и 3):

$$m_{SiO_2} = L \cdot \pi \cdot r^2 \cdot \rho, \quad (2)$$

где L – длина колонки, см;

π – константа, 3,14...;

r – радиус колонки, см;

ρ – среднее полученное значение пористости обработанного силикагеля, см³/г.

$$m_{\text{SiO}_2} = 15 \cdot 3,14 \cdot 0,23^2 \cdot 0,88 = 2,19 \text{ г} \quad (3)$$

Общее количество силанольных групп на поверхности силикагеля, моль (уравнение 4):

$$n_{\text{ОН}} = \frac{S_{\text{уд}} \cdot m_{\text{SiO}_2} \cdot \alpha_{\text{ОН}}}{1000 \cdot 1000} = 0,0064 \text{ моль} \quad (4)$$

где $S_{\text{уд}}$ – среднее значение удельной площади поверхности (БЭТ) обработанного силикагеля, $365 \text{ м}^2/\text{г}$;

m_{SiO_2} – масса силикагеля, необходимого для набивки колонки, г;

$\alpha_{\text{ОН}}$ – общее количество силанольных групп на поверхности силикагеля, $8 \text{ мкмоль}/\text{м}^2$ [184];

1000 – коэффициент для перевода мкмоль в ммоль;

1000 – коэффициент для перевода ммоль в моль.

Модифицирующий реактив имеет 3 алкоксисилановых группы, способных ковалентно реагировать с силанольными группами силикагеля. Таким образом, для идеализированного случая, при котором происходит полное покрытие поверхности силикагеля модифицирующим реактивом, потребуется следующее количество модифицирующего реактива (уравнение 5):

$$n_{\text{модификатор}} = \frac{0,0064}{3} = 0,002 \text{ моль} \quad (5)$$

Однако, доля свободных силанольных групп на поверхности стационарной фазы после прививки функциональной группы составляет до 40–50 % от общего числа доступных силанольных групп [185, 186]. Таким образом, рассчитанное количество модификатора примерно в 2 раза больше необходимого и позволяет модифицировать поверхность силикагеля с высокой степенью покрытия.

3.3.3 Получение реактива с динитрозамещенными ароматическими группами для модификации поверхности стационарной фазы

Как установлено в ходе выбора ароматической группы стационарной фазы, наиболее перспективными являются ароматические группы, содержащие два и более электроноакцепторных заместителя, таких как нитрогруппы (глава 3.2).

Реакция нитрования ароматических соединений требует использования концентрированных кислот и тщательного контроля протекания реакции из-за образования взрывоопасных продуктов и полупродуктов.

Реакция нуклеофильного ароматического замещения SN_2Ar происходит при атаке нуклеофилом ароматической группы и сопровождается замещением уходящей группы. Скорость реакции значительно увеличивается при [187]:

- введении электроноакцепторных заместителей, оттягивающих электронную плотность электрофила;
- увеличении электроотрицательности электрофила (для галогенов увеличивается в ряду от иода к фтору);
- введении электроноакцепторных заместителей в пара- и орто- положении по отношению к электрофилу.

Ароматическая группа 1-хлор-2,4-динитробензола содержит две нитрогруппы и атом хлора, что приводит к его высокой реакционной способности в реакции нуклеофильного ароматического замещения SN_2Ar с аминами без необходимости использования нагрева, катализатора или жестких условий. Это позволяет получить целевой продукт с высоким выходом без дополнительной очистки [188–190]. При этом, 1-хлор-2,4-динитробензол (результаты входного контроля представлены в приложении Е) не обладает взрывоопасными свойствами при нормальных условиях. Однако, данная реакция относится к реакциям второго порядка, то есть скорость реакции увеличивается с увеличением концентрации амина, а реакция может протекать с выделением значительного количества тепла. В связи с этим, проведение данной реакции требует соблюдения особых правил безопасности: постепенного приливания реактивов, контроля температуры реакционной смеси, работы с небольшими количествами реактивов (2–5 г), работы в тяге с использованием средств индивидуальной защиты, таких как перчатки, халат и защитные очки.

Для прививки вышеупомянутого нитрозамещенного ароматического селектора на поверхность силикагеля выбран аминоксодержащий силанизирующий агент (3-аминопропил)триметоксисилан (АПТМС) (рисунок 16). Реакция протекает с присоединением только одной молекулы 1-хлор-2,4-динитробензола к молекуле АПТМС, что связано с низкой электронной плотностью атома азота образующегося *N*-аклилзамещенного 2,4-динитроанилина и его низкой реакционной способностью. Полученный модификатор, образующийся при реакции АПТМС с 1-хлор-2,4-динитробензолом, получил название АВЕ-241 (2,4-динитрозамещенная моноциклическая ароматическая группа), обуславливает гидрофобные свойства стационарной фазы и возможность работы в ОФХ.

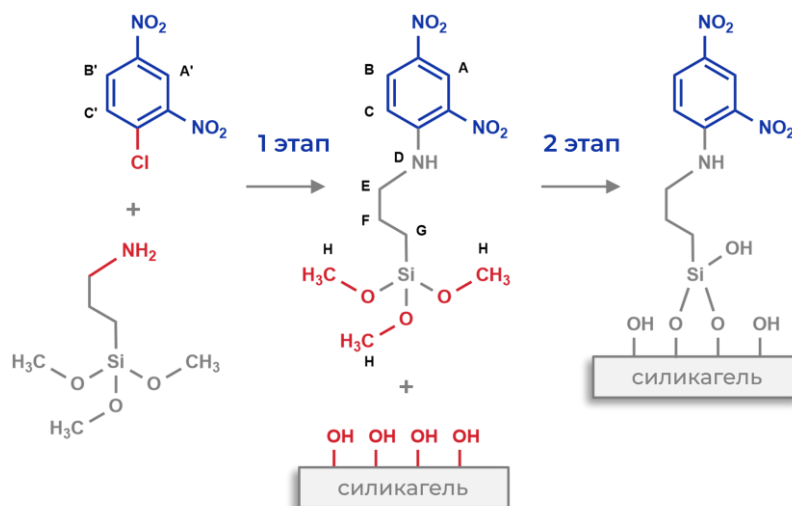


Рисунок 16 – Схема получения стационарной фазы АВЕ-241:

1 этап – 1-Хлор-2,4-динитробензол, АПТМС, триэтиламин, толуол, комнатная температура, УЗО; 2 этап – Модификатор АВЕ-241, силикагелевый сорбент, метанол, 6 ч, 80 °С.

Протекание реакции получения нитрозамещенного ароматического селектора проводили методом ВЭЖХ-УФ (рисунок 17). Для предотвращения возможной модификации поверхности стационарной фазы, используемой для анализа, а также ячейки кюветы УФ-детектора и других частей хроматографа и, как результат, их выхода из строя, раствор полученного селектора нейтрализовали пропионовой кислотой и затем гидролизовали силанизирующие группы. Для этого из реакционной массы отбирали аликвоту объемом 100 мкл, к аликвоте добавляли 200 мкл пропионовой кислоты для нейтрализации триэтиламина, 200 мкл воды для гидролиза силанольных групп и обрабатывали на ультразвуковой ванне в течение 1 минуты. Полученный испытуемый раствор помещали в вialу и сразу хроматографировали до возможного выпадения осадка продукта конденсации. В качестве раствора сравнения использовался толуольный раствор 1-хлор-2,4-динитробензола в концентрации 1 % от полученного испытуемого раствора.

В качестве растворителя для проведения реакции исследованы ацетонитрил, метанол и толуол. Ацетонитрил обеспечивает наиболее высокую скорость протекания реакции, однако гигроскопичен и имеет относительно низкую температуру кипения (82 °С), что может приводить к вскипанию реакционной смеси в случае слишком быстрого приливания реактивов. Метанол также имеет относительно низкую температуру кипения (65 °С) и гигроскопичен. Толуол имеет более высокую температуру кипения (110 °С), имеет меньшее сродство к воде и обеспечивает более низкую скорость протекания реакции и, как результат, безопасность получения модификатора.

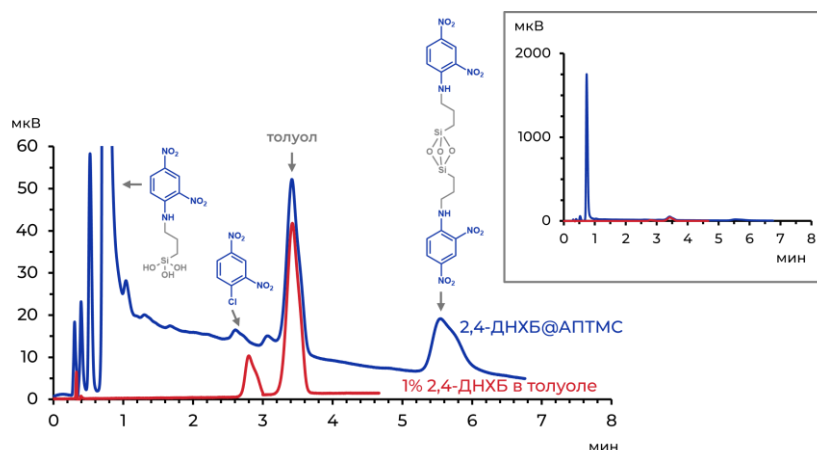


Рисунок 17 – Увеличенная хроматограмма контроля получения модифицирующего реагента АВЕ-241 методом ВЭЖХ-УФ: **красная линия** – раствор сравнения 1-хлор-2,4-динитробензола 1 %; **синяя линия** – испытуемый раствор. Вверху справа – хроматограмма в начальном масштабе.

3.3.4 Подтверждение структуры полученного модификатора с помощью метода ЯМР-спектроскопии

Для подтверждения структуры полученного модификатора АВЕ-241 использовался метод ЯМР-спектроскопии. Протекание реакции и образование ковалентной связи подтверждается изменением значений химических сдвигов сигнала протонов ароматической группы на ^1H ЯМР- (рисунок 16, таблица 11) и сигнала атомов углерода на ^{13}C ЯМР-спектрах (рисунок 18, таблица 12) для полученного модифицирующего реактива АВЕ-241 по сравнению с исходным 1-хлор-2,4-динитробензолом (приложение Г).

Таблица 11 – Результаты анализа 1-хлор-2,4-динитробензола и полученного модифицирующего реактива АВЕ-241 методом ^1H ЯМР-спектроскопии

Сигнал 1-хлор-2,4-динитробензола/АВЕ-241	Химический сдвиг, ppm	Интенсивность, H	Мультиплетность
<i>A/A</i>	8,82/8,96	1	s
<i>B/B</i>	8,50/8,25	1	d
<i>C/C</i>	7,96/7,15	1	d
<i>D</i>	—	—	—
<i>E</i>	3,50	1	t
<i>F</i>	1,85	1	m
<i>G</i>	0,80	1	t
<i>H</i>	3,60	4	s

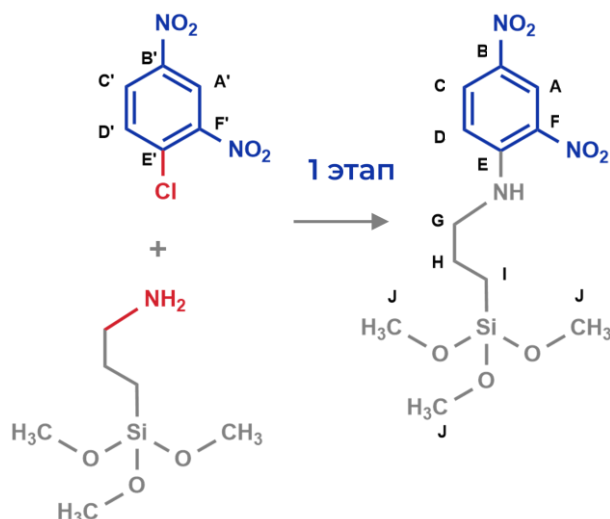


Рисунок 18 – Схема 1-го этапа получения стационарной фазы AWE-241

Таблица 12 – Результаты анализа 1-хлор-2,4-динитробензола и полученного модифицирующего реактива AWE-241 методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии

Сигнал 1-хлор-2,4-динитробензола/AWE-241	Химический сдвиг, ppm	
	1-хлор-2,4-динитро- бензол	AWE-241
A'/A	120,74	123,37
B'/B	146,63	135,36
C'/C	132,62	129,64
D'/D	127,32	114,41
E'/E	133,03	148,33
F'/F	147,86	129,95
G	—	46,07
H	—	21,72
I	—	8,75
J	—	48,50

3.3.5 Подтверждение ковалентной прививки модифицирующего реактива на поверхность силикагелевого сорбента методом синхронного термогравиметрического анализа

Подтверждение ковалентной прививки модифицирующего реактива, содержащего силанизирующие группы, на поверхность силикагелевого сорбента подтверждено методом синхронного термического анализа (СТА) (таблица 13, рисунок 19, приложение Д).

На кривой дифференциального термогравиметрического анализа (ДТГ) наблюдается несколько точек экстремума, соответствующих ступеням потери массы на кривой

термогравиметрического анализа (ТГ). Максимум при температуре 61,4 °С предположительно принадлежит адсорбированной на поверхности силикагеля воде; ступень, которой соответствует максимум при 223,3 °С предположительно принадлежит высококипящему растворителю, использованному для отмывки стационарной фазы от непрореагировавшего модифицирующего реактива (диметилсульфоксид, температура кипения 189 °С) и другим адсорбированным на поверхности сорбента органическим веществам. Падение массы в диапазоне 230–410 °С с максимумом при 329,4 °С предположительно принадлежит непрореагировавшему модифицирующему реактиву АВЕ-241 с гидролизованными метоксигруппами, адсорбированному на поверхности сорбента. Ступень с максимумом при температуре 567,3 °С принадлежит ковалентно привитому на поверхность силикагеля модифицирующему реактиву АВЕ-241. Потеря массы, соответствующая последней высокотемпературной ступени на кривой ТГ составила около 8,7 %, что позволяет сделать вывод о прививке модификатора АВЕ-241 со значением, характерным для коммерчески доступных стационарных фаз типа фенилгексил, С8 и С18.

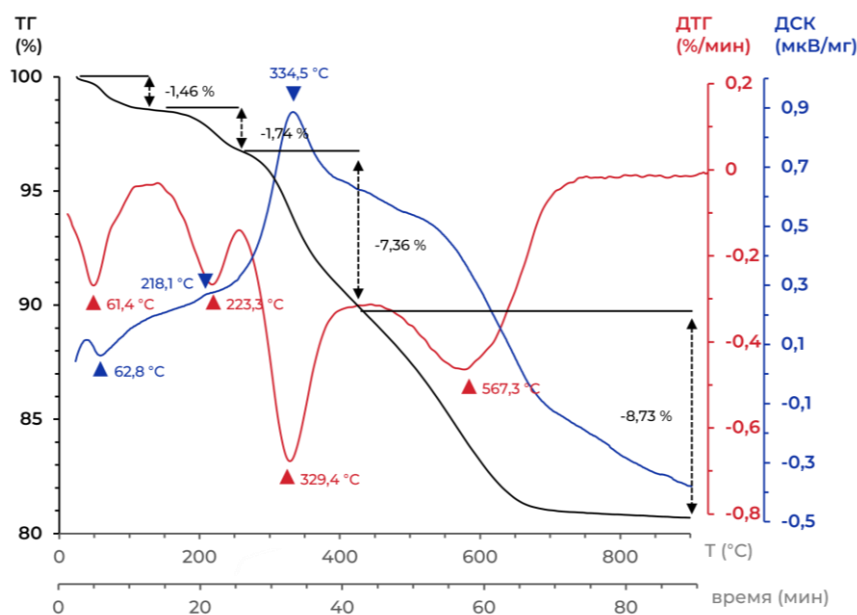


Рисунок 19 – Кривые синхронного термогравиметрического анализа образца модифицированного силикагеля АВЕ-241 @ SiO₂: кривая термического анализа (черная линия), кривая дифференциального термического анализа (красная линия) и кривая дифференциальной сканирующей калориметрии (синяя линия)

Таблица 13 – Условия проведения синхронного термогравиметрического анализа образца немодифицированного силикагеля и модифицированного силикагеля AWE-241@SiO₂

Параметр	Значение
тигель:	DSC/TG pan Al ₂ O ₃
атмосфера:	Ar 20/Air 80
диапазон:	25–900 °C (10 К/мин)
ТГ корр./диап. измер.:	820/5000 мг
ДСК коррекц./диап. измер.:	020/5000 мкВ

Для установления содержания и форм привитого реактива был проведен анализ образца немодифицированного силикагеля (рисунок 20). Из графиков зависимости видно, что кривая ДТГ не имеет точек экстремума в области выше 200 °C, а потеря массы наиболее вероятно соответствует удалению ОН-групп на поверхности силикагеля, что подтверждает принадлежность высокотемпературных ступеней потери массы для образца AWE-241@SiO₂ ковалентно привитому селектору.

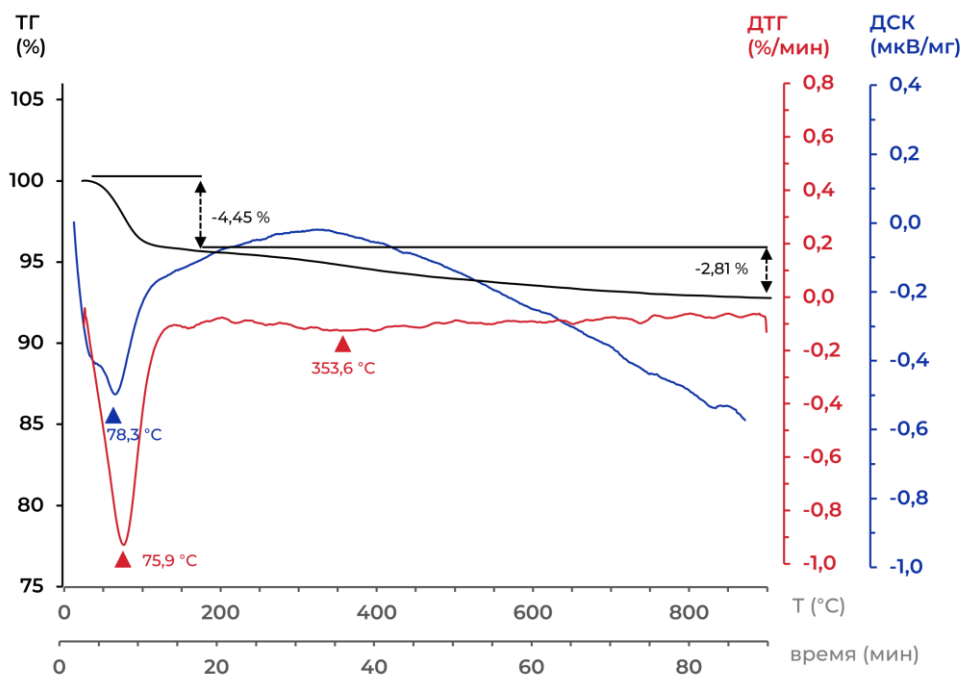


Рисунок 20 – Кривые синхронного термического анализа образца немодифицированного силикагеля: кривая термического анализа (**черная линия**), кривая дифференциального термического анализа (**красная линия**) и кривая дифференциальной сканирующей калориметрии (**синяя линия**)

3.3.6 Упаковка хроматографической колонки

Модифицированный силикагелевый сорбент упаковывался в пустую стальную трубку размером $150 \times 4,6$ мм традиционным суспензионным способом (рисунок 21) [191]. В литературе для упаковки обращенно-фазовых сорбентов в качестве типичных растворителей для приготовления суспензии используются изопропанол, метанол и др. [191]. Для упаковки сорбента AWE-241 в качестве растворителя для суспензии и упаковки колонки выбран состав тетрагидрофуран – изопропанол – толуол (1:1:1). Данный состав обладает достаточной гидрофобностью для смачивания частиц модифицированного силикагеля и, одновременно с этим, позволяет сольватировать динитроанилиновые группы. Кроме того, данный состав продавливающего растворителя обладает достаточной вязкостью для поддержания давления в системе около 600 бар при подаче растворителя со скоростью около 10 мл/мин для обеспечения более плотной упаковки.

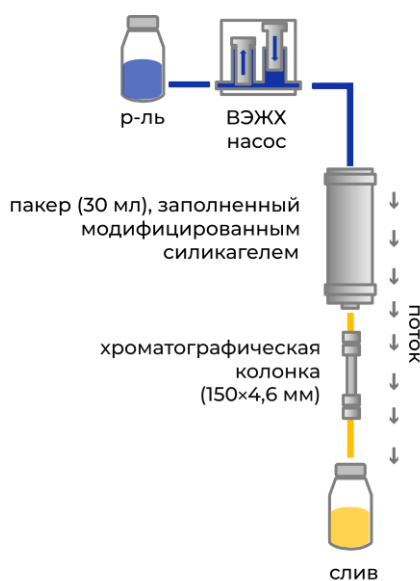


Рисунок 21 – Схема установки для упаковки колонки

3.3.7 Оценка качества упаковки хроматографической колонки

Качество упаковки сорбентом полученной колонки AWE-241 оценивали по значениям эффективности и асимметрии пиков модельной смеси кофеина и напроксена (таблица 14), которые содержат ароматические и полярные группы и являются потенциальными целевыми веществами для определения в смешанном режиме ВЭЖХ с π -взаимодействиями.

Таблица 14 – Хроматографические условия оценки качества упаковки хроматографической колонки условия

Стационарная фаза:	AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм
Подвижная фаза:	MeOH – CH ₃ CN – 0,1 % <i>o</i> -фосфорная кислота (55:5:40)
Температура колонки, °С:	35
Скорость потока подвижной фазы, мл/мин:	1
Длина волны УФ-детектора, нм:	230
Объем ввода пробы, мкл:	2
Концентрация вещества в растворе	2,5 мг/мл кофеина и 25 мг/мл напроксена в смеси CH ₃ CN – 0,1 % <i>o</i> -фосфорная кислота (50:50)

Эффективность N по пику кофеина и напроксена составила 4981 и 4657 теоретических тарелок соответственно, коэффициент асимметрии A_s , вычисленный на 5 % высоты пика от основания, составил 1,25 и 1,30 для кофеина и напроксена соответственно (рисунок 22, таблица 15). Сравнительно большие значения коэффициента удерживания для кофеина и напроксена при использовании подвижной фазы с высоким содержанием органического растворителя (60 % ацетонитрила и метанола суммарно) позволяют сделать вывод о прививке динитроароматического селектора на поверхность силикагеля, а также уникальной селективности, обеспечиваемой полученной стационарной фазой. Таким образом, упаковка колонки может быть признана удовлетворительной, а процедура прививки селектора – успешной.

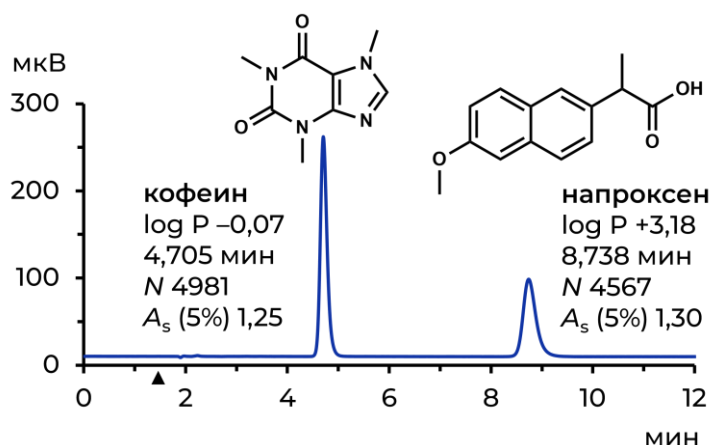


Рисунок 22 – Хроматограмма модельной смеси кофеина и напроксена, использованной для оценки качества упаковки хроматографической колонки AWE-241

Таблица 15 – Результаты оценки качества упаковки хроматографической колонки AWE-241

<i>Параметр</i>	Кофеин	Напроксен
<i>k'</i>	2,14	4,83
<i>N</i>	4 981	4 657
<i>A_s</i>	1,25	1,3

Выводы по главе 3.3

Получена стационарная фаза, содержащая *N*-алкилзамещенный 2,4-динитроанилиновый селектор. Процедура получения данной стационарной фазы отличается простотой проведения реакции. Контроль этапов получения стационарной фазы, содержащей данный селектор, проводился методами ВЭЖХ-УФ, ЯМР-спектроскопии и синхронного термогравиметрического анализа. Эффективность процедуры упаковки колонки полученным сорбентом подтверждена хроматографическим тестом с использованием кофеина и напроксена в качестве тестовых веществ. Результаты теста дополнительно подтверждают эффективность получения стационарной фазы и позволяют сделать предварительный вывод об уникальной селективности разработанной фазы.

3.4 Исследование хроматографической селективности полученной стационарной фазы

3.4.1 Вещества-маркеры для исследования хроматографической селективности полученной стационарной фазы

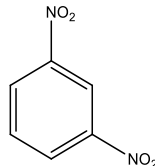
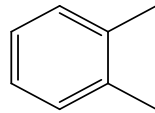
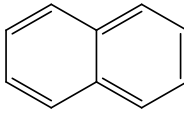
Существует большое разнообразие протоколов и соответствующих наборов веществ-маркеров, позволяющих оценить селективность, удерживание, возможность реализации различных типов нековалентных взаимодействий на стационарной фазе и других параметров разделения (эффективность, коэффициент асимметрии, разрешение и др.) [192]. Одним из наиболее распространенных тестов для оценки стационарной фазы в ОФХ является тест Танака [193]. Однако, на сегодняшний день не существует единого универсального теста, позволяющего оценить даже характеристики стационарной фазы, предназначенной для работы в ОФХ. Более того, для оценки мультимодальных стационарных фаз, как правило, используются индивидуальные протоколы и наборы веществ-маркеров, удовлетворяющих конкретной задаче и хроматографическому режиму [36, 38].

Для оценки силы π -взаимодействий и хроматографической селективности для стационарных фаз и хроматографических режимов, основанных на π -взаимодействиях, также не существует описанного подхода. Таким образом, для оценки возможности реализации π -взаимодействий в данной работе был подобран набор веществ-маркеров, содержащих ароматическую группу различного характера и позволяющих оценить силу реализуемых π -взаимодействий как для электрононасыщенных, так и электронодефицитных ароматических групп (таблица 16). Подобранные вещества-маркеры отличаются значениями коэффициента распределения октанол – вода $\log P$ и значениями дипольного момента.

Таблица 16 – Физико-химические свойства веществ-маркеров, содержащих ароматическую группу и использованных для оценки силы π -взаимодействий

Вещество	Характеристика	Структурная формула	$\log P$	Дипольный момент, D
Кофеин	Электронодефицитная ароматическая полярная группа		-0,07 [194]	3,90 [195]

Таблица 16 – Физико-химические свойства веществ-маркеров, содержащих ароматическую группу и использованных для оценки силы π -взаимодействий

Вещество	Характеристика	Структурная формула	log P	Дипольный момент, D
<i>1,3-Динитробензол</i>	Электронодефицитная ароматическая полярная группа		1,49 [196]	3,87 [196]
<i>o-Ксилол</i>	Электрононасыщенная ароматическая неполярная группа		3,16 [197]	0,45 [197]
<i>Нафталин</i>	Конденсированная электрононасыщенная ароматическая неполярная группа		3,37 [198]	0,0 [198]

o-Ксилол представляет собой моноциклическую ароматическую группу, не обеспечивающую реализацию сильных π -взаимодействий. Нафталин, имеющий схожее значение гидрофобности, представляет собой бициклическую конденсированную ароматическую группу, которая имеет электроноизбыточный характер и обеспечивает реализацию сильных π -взаимодействий. Данная пара веществ имеет низкие значения дипольного момента и не содержит полярные заместители. Это позволяет оценить вклад преимущественно параллельно-смещенных стэкинговых π -взаимодействий, а также их вклад в удерживание ароматических групп, имеющих электроноизбыточный характер.

Кофеин и 1,3-динитробензол представляют собой электронодефицитные ароматические группы, имеют близкие, относительно высокие значения дипольного момента, но различаются значением полярности. Данная пара позволяет оценить вклад π -взаимодействий и диполь-дипольных взаимодействий в удерживание электронодефицитных ароматических групп, обладающих полярным и неполярным характером.

3.4.2 Исследование влияния типа и количества органического растворителя на возможность реализации π -взаимодействий на полученной стационарной фазе

Один из наиболее простых способов управления удерживанием и селективностью – варьирование типа и соотношения растворителя в составе подвижной фазы. Элюотропный ряд для ОФХ основан преимущественно на значениях гидрофобности растворителя. Наиболее распространенными растворителями в ОФХ являются ацетонитрил и метанол. Менее распространенными в силу своих эксплуатационных характеристик растворителями,

являются изопропанол и тетрагидрофуран. Данные растворители являются довольно сильными элюентами в ОФХ и используются, как правило, в качестве добавки для управления селективностью [14]. Вода является наименее гидрофобным и поэтому самым слабым элюентом в ОФХ режиме. Как установлено в главе 3.1, элюотропный ряд для режима жидкостной хроматографии с параллельно-смещенными стэкингowymi π -взаимодействиями ортогонален элюотропному ряду для ОФХ (рисунок 23), что позволяет управлять селективностью и изменять порядок элюирования анализируемых веществ.

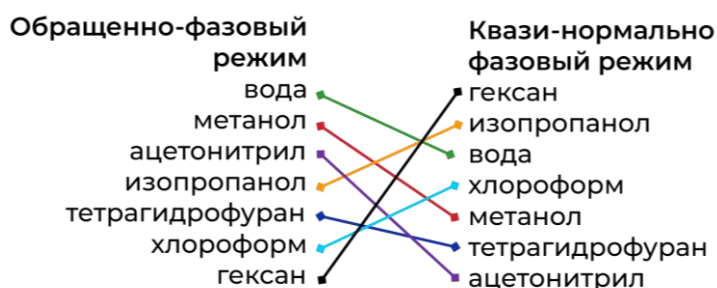


Рисунок 23 – Элюирующая сила для наиболее популярных растворителей, используемых в обращенно-фазовом и квази-нормально фазовом режимах ВЭЖХ

Для установления возможности реализации π -взаимодействий было исследовано влияние типа и содержания данных растворителей в подвижной фазе в диапазоне 20–95 % на удерживание веществ-маркеров при работе на разработанной стационарной фазе AWE-241 в смешанном ОФХ режиме с π -взаимодействиями (таблица 17).

Таблица 17 – Хроматографические условия эксперимента по исследованию влияния типа и содержания растворителя в составе подвижной фазы при работе на разработанной стационарной фазе AWE-241

Стационарная фаза:	AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм; XBridge C8 50 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Waters);
Подвижная фаза:	CH ₃ CN – формиат аммония (pH 3,5; 10 mM)
Температура колонки, °C:	30
Скорость потока, мл/мин:	1
Длина волны УФ-детектора, нм:	270
Объем ввода пробы, мкл:	1

Для выяснения вклада π -взаимодействий в смешанный ОФХ механизм разделения было также исследовано удерживание данных веществ-маркеров на октилсилильной (С8) стационарной фазе. Октилсилильная стационарная фаза обладает наиболее схожим значением гидрофобности селектора ($\log P = 4,02$ для октана и $2,86$ для *N*-пропилзамещенного 2,4-динитроанилина [199] из коммерчески доступных стационарных фаз для работы в ОФХ), но не обеспечивает реализацию π -взаимодействий. Результаты эксперимента представлены в виде зависимости коэффициента удерживания от типа и содержания органического растворителя (рисунок 24–31, таблица 18–25).

Для оценки возможности работы фазы AWE-241 в HILIC режиме при высоком содержании апротонного органического растворителя, такого как CH_3CN и ТГФ, во всем эксперименте в качестве водной составляющей использован буферный раствор формиата аммония (рН 3,5; 10 мМ), а его содержание в составе подвижной фазы исследовано вплоть до 5 % (таблица 17).

Влияние количества ацетонитрила в составе подвижной фазы на возможность реализации π -взаимодействий при работе на стационарной фазе AWE-241

Использование ацетонитрила в составе подвижной фазы не позволяет реализовать сильные π -взаимодействия для электрононасыщенных систем (*o*-ксилол и нафталин), которые имеют близкие значения коэффициента удерживания на обеих стационарных фазах во всем исследованном диапазоне содержания CH_3CN (рисунок 24, таблица 18).

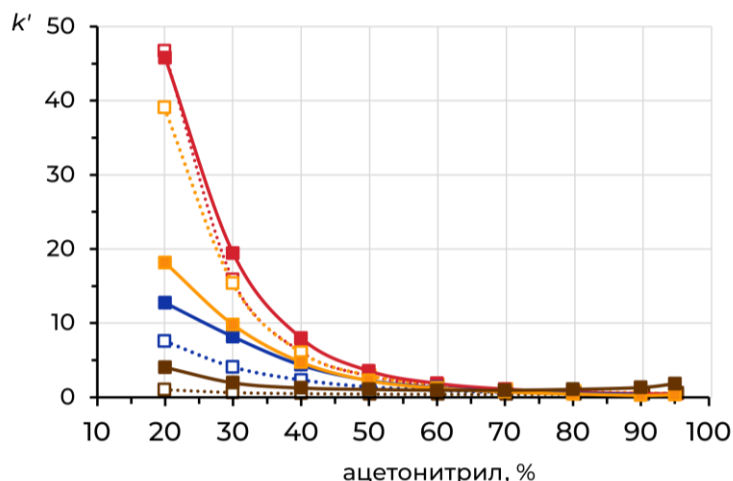


Рисунок 24 – Графики зависимости коэффициента удерживания веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и содержания ацетонитрила в составе подвижной фазы: сплошная линия с заполненными маркерами (—■—) – фаза AWE-241; пунктирная линия с незакрашенными маркерами (--□--) – фаза С8. Условные обозначения: ■ – кофеин; ■ – 1,3-динитробензол; ■ – нафталин; ■ – *o*-ксилол.

C8 стационарная фаза демонстрирует большее, чем AWE-241 удерживание для *o*-ксилола и нафталина, что связано с более гидрофобным характером октилсилильного селектора. Это связано с невозможностью реализации для данных веществ дополнительных диполь-дипольных и π -взаимодействий с *N*-алкилзамещенным 2,4-динитроанилиновым ароматическим селектором при использовании подвижной фазы на основе ацетонитрила.

Таблица 18 – Значения коэффициента удерживания k' веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и количества ацетонитрила в составе подвижной фазы

CH ₃ CN, %	Стационарная фаза	Вещество-маркер			
		Кофеин	1,3-ДНБ	<i>o</i> -Ксилол	Нафталин
20	AWE-241	4,03	12,74	18,14	45,77
	C8	1,05	7,57	39,08	46,70
30	AWE-241	1,94	8,17	9,78	19,42
	C8	0,65	4,07	15,36	15,85
40	AWE-241	1,25	4,35	4,73	7,97
	C8	0,52	2,32	6,04	6,13
50	AWE-241	1,06	2,28	2,24	3,54
	C8	0,45	1,38	2,93	2,88
60	AWE-241	0,95	1,31	1,23	1,86
	C8	0,42	0,92	1,71	1,65
70	AWE-241	0,95	0,81	0,74	1,09
	C8	0,42	0,65	1,09	1,04
80	AWE-241	1,07	0,55	0,45	0,69
	C8	0,45	0,51	0,77	0,74
90	AWE-241	1,32	0,40	0,27	0,47
	C8	0,51	0,44	0,58	0,57
95	AWE-241	1,84	0,39	0,35	0,45
	C8	0,59	0,42	0,52	0,51

Однако, для электронодефицитных ароматических групп, таких как кофеин и 1,3-динитробензол, наблюдаются более высокие значения коэффициента удерживания на стационарной фазе AWE-241 во всем исследованном диапазоне содержания CH₃CN (таблица 18, рисунок 24). Данную закономерность и значительное увеличение удерживание по сравнению с нафталином можно объяснить только реализацией диполь-дипольных взаимодействий и взаимодействий посредством водородных связей, а не стэкинг-взаимодействий.

Для удобства восприятия вклада π -взаимодействий результаты эксперимента представлены в виде графиков зависимости отношения коэффициентов удерживания $k'_{\text{AWE-241}}/k'_{\text{C8}}$ от содержания органического растворителя в составе подвижной фазы (таблица 19, рисунок 25). Значения отношения коэффициентов удерживания $k' > 1$ указывают

на большее удерживание на стационарной фазе AWE-241 и, соответственно, вклад π -взаимодействий в удерживание. Для нафталина и *o*-ксилола наблюдается удерживание, обусловленное преимущественно обращенно-фазовым механизмом, в то время как для кофеина и 1,3-динитробензола существенен вклад π -взаимодействий и диполь-дипольных взаимодействий.

Таблица 19 – Значения отношения коэффициентов удерживания $k'_{\text{AWE-241}}/k'_{\text{C8}}$ веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и количества ацетонитрила в составе подвижной фазы

CH ₃ CN, %	Вещество-маркер			
	Кофеин	1,3-ДНБ	<i>o</i> -Ксилол	Нафталин
20	3,85	1,68	0,46	0,98
30	2,97	2,01	0,64	1,22
40	2,42	1,88	0,78	1,30
50	2,36	1,66	0,77	1,23
60	2,26	1,43	0,72	1,12
70	2,28	1,25	0,68	1,05
80	2,38	1,09	0,59	0,94
90	2,60	0,91	0,46	0,82
95	3,10	0,94	0,67	0,89

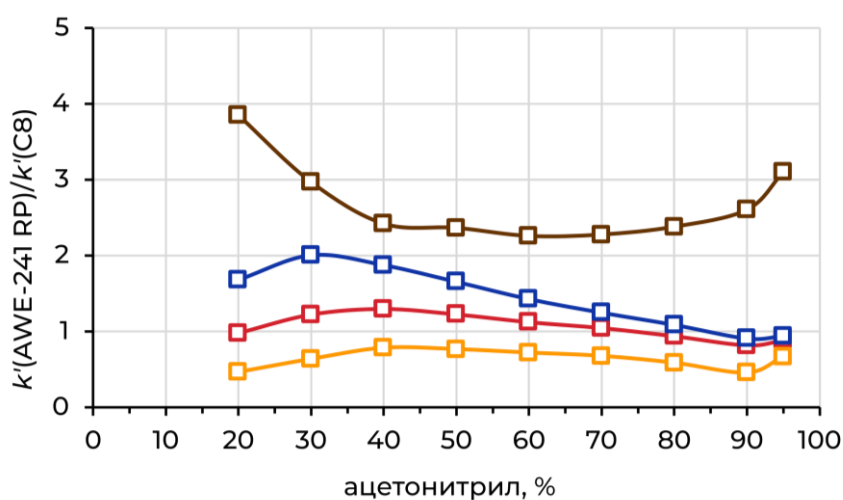


Рисунок 25 – Графики зависимости отношения коэффициентов удерживания $k'_{\text{AWE-241}}/k'_{\text{C8}}$ веществ-маркеров от содержания ацетонитрила в составе подвижной фазы. Условные обозначения: ■ – кофеин; ■ – 1,3-динитробензол; ■ – нафталин; ■ – *o*-ксилол.

Влияние количества метанола в составе подвижной фазы на возможность реализации π -взаимодействий при работе на стационарной фазе AWE-241

Метанол обладает средней элюирующей силой как в ОФХ режиме [14], 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 изменения порядка элюирования *o*-ксилола, кофеина и 1,3-динитробензола (таблица 20, рисунок 26). При этом, *o*-ксилол удерживается значительно сильнее на C8 стационарной фазе за счет более гидрофобного октильного селектора, обеспечивающего реализацию только ОФХ режима. Данное явление, а также более высокие значения удерживания электронодефицитных ароматических групп, таких как 1,3-динитробензол и кофеин по сравнению с *o*-ксилолом при работе на стационарной фазе AWE-241, говорят о значительном вкладе π -взаимодействий в механизм удерживания. Это обеспечивает увеличенную селективность и, как результат, «гибкость» реализуемого смешанного ОФХ-режима с π -взаимодействиями при работе на стационарной фазе AWE-241, в том числе для веществ, содержащих полярные группы и имеющих недостаточное удерживание в ОФХ режиме (кофеин).

Таблица 20 – Значения коэффициента удерживания k' веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и количества метанола в составе подвижной фазы

MeOH, %	Стационарная фаза	Вещество-маркер			
		Кофеин	1,3-ДНБ	<i>o</i> -Ксилол	Нафталин
20	AWE-241	13,63	12,35	13,86	55,47
	C8	2,95	5,58	43,42	57,70
30	AWE-241	9,59	9,84	11,40	37,99
	C8	1,43	3,33	21,97	26,94
40	AWE-241	6,57	7,86	7,31	21,90
	C8	0,85	2,06	10,77	11,75
50	AWE-241	4,96	5,55	4,06	11,19
	C8	0,61	1,23	4,65	4,57
60	AWE-241	3,61	3,55	2,26	5,37
	C8	0,51	0,84	2,29	2,14
70	AWE-241	2,88	2,31	1,32	2,80
	C8	0,46	0,62	1,25	1,16
80	AWE-241	2,59	1,55	0,83	1,59
	C8	0,46	0,51	0,79	0,74
90	AWE-241	2,56	1,07	0,57	0,97
	C8	0,47	0,46	0,58	0,56

Нелинейный характер зависимости отношения коэффициентов удерживания свидетельствуют о комбинированном механизме удерживания и максимальном вкладе π -взаимодействий при содержании органического растворителя в подвижной фазе около 50 % (рисунок 27, таблица 21).

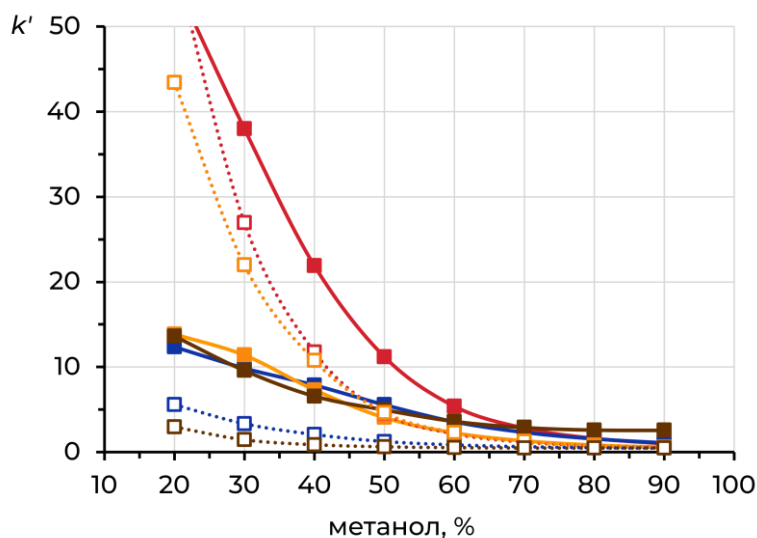


Рисунок 26 – Графики зависимости коэффициента удерживания веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и содержания метанола в составе подвижной фазы: сплошная линия с заполненными маркерами (—■—) – АВЕ-241; пунктирная линия с незакрашенными маркерами (--□--) – С8. Условные обозначения: ■ – кофеин; ■ – 1,3-динитробензол; ■ – нафталин; ■ – о-ксилол.

Таблица 21 – Значения отношения коэффициентов удерживания $k'_{\text{АВЕ-241}}/k'_{\text{С8}}$ веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и количества метанола в составе подвижной фазы

MeOH, %	Вещество-маркер			
	Кофеин	1,3-ДНБ	о-Ксилол	Нафталин
20	4,62	2,21	0,32	0,96
30	6,69	2,95	0,52	1,41
40	7,70	3,81	0,68	1,86
50	8,14	4,50	0,87	2,45
60	7,04	4,25	0,99	2,51
70	6,21	3,73	1,06	2,42
80	5,66	3,06	1,05	2,16
90	5,45	2,35	0,98	1,73

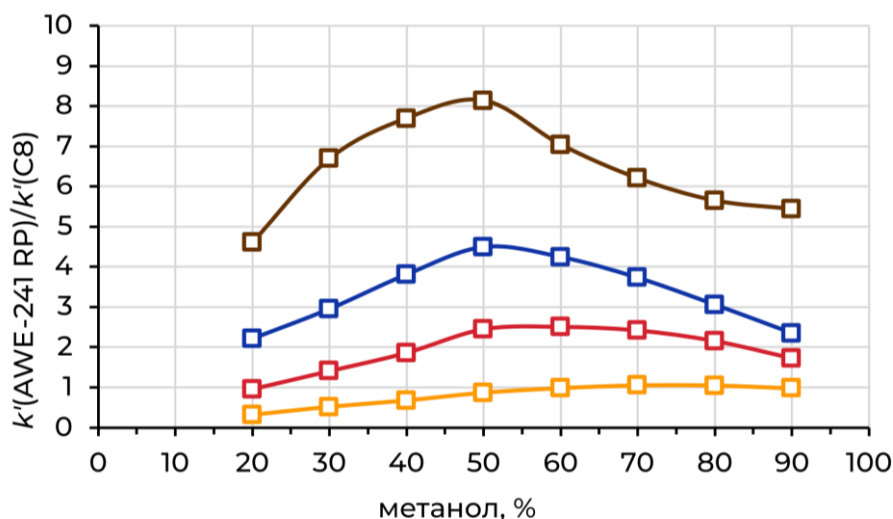


Рисунок 27 – Графики зависимости отношения коэффициентов удерживания $k'_{AWE-241}/k'_{C8}$ веществ-маркеров от содержания метанола в составе подвижной фазы. Условные обозначения: ■ – кофеин; ■ – 1,3-динитробензол; ■ – нафталин; ■ – о-ксилол.

Влияние количества тетрагидрофурана в составе подвижной фазы на возможность реализации π -взаимодействий при работе на стационарной фазе AWE-241

Тетрагидрофуран имеет высокое значение гидрофобности ($\log P$) и, как следствие, высокую элюирующую силу в ОФХ режиме [14]. Одновременно с этим, тетрагидрофуран в значительной степени подавляет π -взаимодействия, что делает его сильным растворителем в смешанном ОФХ режиме с π -взаимодействиями. Об этом свидетельствует экспоненциальный рост удерживания для всех исследуемых веществ, кроме кофеина, при уменьшении содержания ТГФ в подвижной фазе ниже 20 % об. и элюция данных веществ в соответствии с их значениями гидрофобности (таблица 22, рисунок 28).

Таблица 22 – Значения коэффициента удерживания k' веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и количества тетрагидрофурана в составе подвижной фазы

ТГФ, %	Стационарная фаза	Вещество-маркер			
		Кофеин	1,3-ДНБ	о-Ксилол	Нафталин
20	AWE-241	1,65	24,03	41,23	> 80
	C8	0,56	10,49	40,84	43,52
30	AWE-241	0,70	5,97	6,97	8,56
	C8	0,44	5,65	12,74	11,20
40	AWE-241	0,52	2,82	2,85	3,33
	C8	0,35	2,75	4,75	3,90

Таблица 22 – Значения коэффициента удерживания k' веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и количества тетрагидрофурана в составе подвижной фазы

ТГФ, %	Стационарная фаза	Вещество-маркер			
		Кофеин	1,3-ДНБ	<i>o</i> -Ксилол	Нафталин
50	AWE-241	0,44	1,40	1,33	1,51
	C8	0,31	1,38	2,00	1,71
60	AWE-241	0,40	0,98	0,97	1,01
	C8	0,30	0,85	1,16	1,00
70	AWE-241	0,41	0,53	0,52	0,55
	C8	0,30	0,57	0,75	0,66
80	AWE-241	0,47	0,32	0,30	0,32
	C8	0,33	0,44	0,53	0,49
90	AWE-241	0,63	0,24	0,25	0,23
	C8	0,38	0,37	0,42	0,40
95	AWE-241	0,80	0,62	0,23	0,23
	C8	0,42	0,37	0,41	0,41

Близкие значения коэффициентов удерживания *o*-ксилола на фазах AWE-241 и C8 свидетельствуют о реализации преимущественно ОФХ режима удерживания для данного вещества (таблица 23, рисунок 29). Относительно низкое по сравнению с другими растворителями увеличение удерживания кофеина может быть связано с комбинацией физико-химических свойств тетрагидрофурана. ТГФ обладает высокой элюирующей силой в режиме с параллельно-смещенными стэкинговыми π -взаимодействиями, более гидрофобным характером и является акцептором водородной связи.

Таблица 23 – Значения отношения коэффициентов удерживания $k'_{AWE-241}/k'_{C8}$ веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и количества тетрагидрофурана в составе подвижной фазы

ТГФ, %	Вещество-маркер			
	Кофеин	1,3-ДНБ	<i>o</i> -Ксилол	Нафталин
20	2,97	2,29	1,01	1,89
30	1,60	1,06	0,55	0,76
40	1,48	1,03	0,60	0,85
50	1,42	1,01	0,67	0,88
60	1,32	1,15	0,83	1,01
70	1,34	0,92	0,70	0,84
80	1,43	0,72	0,57	0,66
90	1,67	0,65	0,58	0,58
95	1,88	1,67	0,56	0,56

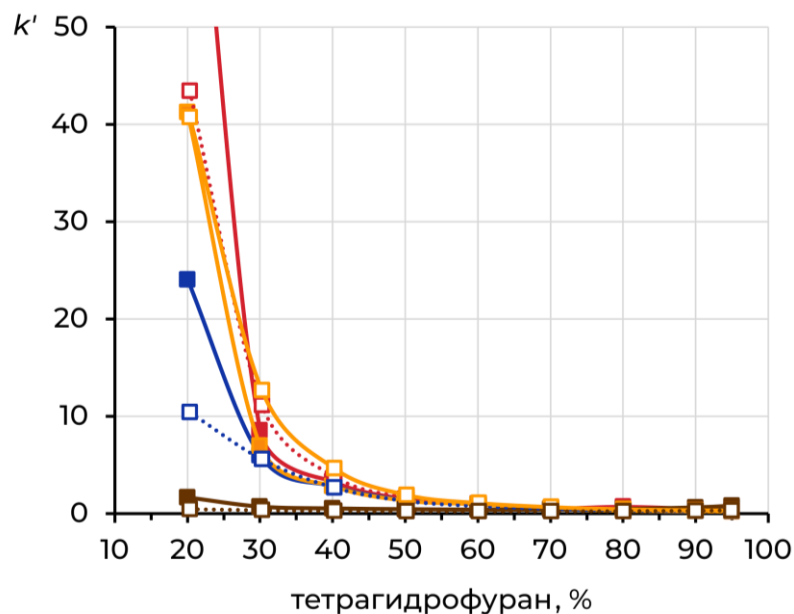


Рисунок 28 – Графики зависимости коэффициента удерживания веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и содержания тетрагидрофурана в составе подвижной фазы: сплошная линия с закрашенными маркерами (—■—) – AWE-241; пунктирная линия с незакрашенными маркерами (--□--) – C8.

Условные обозначения: ■ – кофеин; ■ – 1,3-динитробензол; ■ – нафталин; ■ – *o*-ксилол.

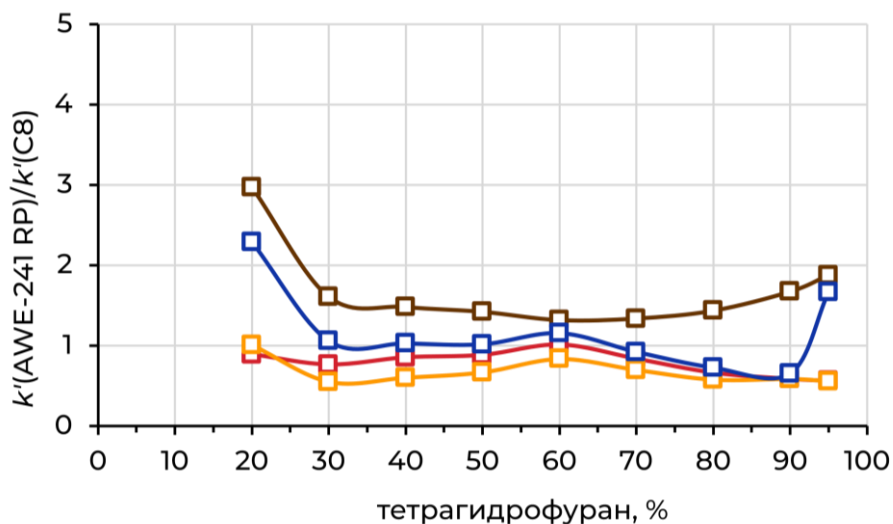


Рисунок 29 – Графики зависимости отношения коэффициентов удерживания $k'_{\text{AWE-241 RP}}/k'_{\text{C8}}$ веществ-маркеров от содержания тетрагидрофурана в составе подвижной фазы. Условные обозначения: ■ – кофеин; ■ – 1,3-динитробензол; ■ – нафталин; ■ – *o*-ксилол.

Влияние количества изопропанола в составе подвижной фазы на возможность реализации π -взаимодействий при работе на стационарной фазе AWE-241

При использовании подвижной фазы состава ИПС – формиат аммония (рН 3,5; 10 мМ) наблюдается значительно более сильное удерживание для всех веществ-маркеров, за исключением *o*-ксилола, по сравнению с подвижной фазой на основе CH₃CN (рисунок 30, таблица 24). Данное явление наблюдается во всем диапазоне содержания органического растворителя, несмотря на более высокую элюирующую силу ИПС в ОФ-ВЭЖХ режиме. Для нафталина, представляющего собой бициклическую ароматическую группу, наблюдается экспоненциальный рост удерживания при уменьшении содержания органического растворителя по сравнению с *o*-ксилолом, несмотря на близкие значения log P (3,90 для *o*-ксилола и 3,96 для нафталина). Данная зависимость обусловлена синергическим эффектом дисперсионных взаимодействий, гидрофобного эффекта и π -взаимодействий для нафталина и демонстрирует вклад π -взаимодействий в механизм удерживания (рисунок 30).

Таблица 24 – Значения коэффициента удерживания k' веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и количества изопропанола в составе подвижной фазы

ИПС, %	Стационарная фаза	Вещество-маркер			
		Кофеин	1,3-ДНБ	<i>o</i> -Ксилол	Нафталин
20	AWE-241	6,92	16,25	25,13	> 80
	C8	0,74	3,09	37,46	41,68
30	AWE-241	3,48	9,83	10,56	24,74
	C8	0,51	1,73	11,71	10,44
40	AWE-241	2,37	5,22	3,75	7,83
	C8	0,43	1,01	3,47	3,15
50	AWE-241	2,02	3,23	1,85	3,67
	C8	0,39	0,66	1,51	1,40
60	AWE-241	1,82	2,14	1,05	2,03
	C8	0,38	0,54	0,94	0,90
70	AWE-241	1,83	1,60	0,73	1,34
	C8	0,40	0,47	0,71	0,68
80	AWE-241	2,07	1,33	0,83	0,98
	C8	0,42	0,42	0,56	0,55
90	AWE-241	2,90	1,26	0,48	0,81
	C8	0,49	0,41	0,49	0,48
95	AWE-241	4,69	1,35	0,45	0,75
	C8	0,57	0,42	0,46	0,46

При высоком содержании органического растворителя (выше 90 %), такого как ИПС, наблюдается выраженное увеличение удерживания для веществ, обладающих высоким дипольным моментом и содержащих ароматическую группу и высокополярные группы, таких как кофеин и 1,3-динитробензол (таблица 24, таблица 25, рисунок 30). При этом кривая зависимости коэффициента удерживания от содержания ИПС в подвижной фазе принимает параболическую форму. Данное явление можно объяснить реализацией механизма удерживания за счет водородных связей и диполь-дипольных взаимодействий. Более высокие значения отношения коэффициентов удерживания $k'_{\text{AWE-241}}/k'_{\text{C8}}$ для кофеина по сравнению с 1,3-динитробензолом, несмотря на большую полярность и меньший дипольный момент кофеина, дополнительно свидетельствуют о реализации удерживания за счет водородных связей (рисунок 31).

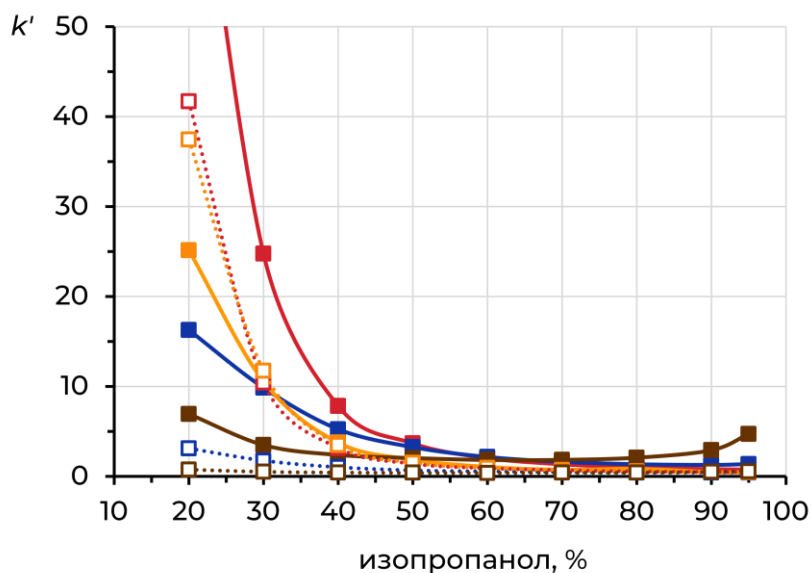


Рисунок 30 – Графики зависимости коэффициента удерживания веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и содержания изопропанола в составе подвижной фазы: сплошная линия с закрашенными маркерами (—■—) – AWE-241; пунктирная линия с незакрашенными маркерами (---□---) – C8.

Условные обозначения: ■ – кофеин; ■ – 1,3-динитробензол; ■ – нафталин; ■ – o-ксилол.

Таблица 25 – Значения отношения коэффициентов удерживания $k'_{\text{AWE-241}}/k'_{\text{C8}}$ веществ-маркеров в зависимости от типа стационарной фазы и количества изопропанола в составе подвижной фазы

ИПС, %	Вещество-маркер			
	Кофеин	1,3-ДНБ	о-Ксилол	Нафталин
20	9,35	5,26	0,67	1,90
30	6,87	5,67	0,90	2,37
40	5,57	5,19	1,08	2,49
50	5,22	4,89	1,23	2,62
60	4,73	3,98	1,11	2,27
70	4,55	3,40	1,03	1,97
80	4,93	3,14	1,49	1,80
90	5,87	3,04	0,98	1,68
95	8,16	3,25	0,98	1,62

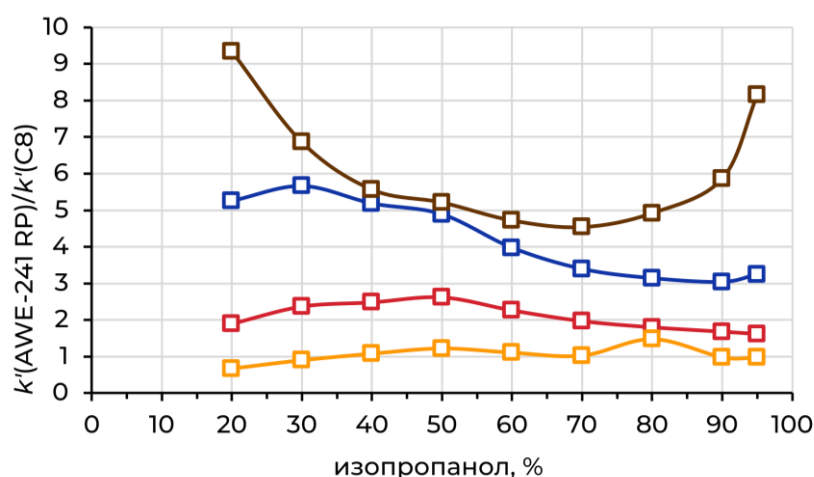


Рисунок 31 – Графики зависимости отношения коэффициентов удерживания $k'_{\text{AWE-241}}/k'_{\text{C8}}$ веществ-маркеров от содержания изопропанола в составе подвижной фазы. Условные обозначения: ■ – кофеин; ■ – 1,3-динитробензол; ■ – нафталин; ■ – о-ксилол.

3.4.3 Исследование разработанной стационарной фазы в сравнении с коммерчески доступными аналогами

Разработанная стационарная фаза AWE-241 исследована в сравнении с коммерчески доступными стационарными фазами: октилсилильной, октадецилсилильной, фенилгексильной, пентафторфенильной и пиренэтильной (таблица 26, таблица 27). В качестве подвижной фазы выбран состав MeOH – 0,1 % H_3PO_4 (65:35), позволяющий

реализовать относительно сильные π -взаимодействия и обеспечивающий некоторое удерживание для всех веществ-маркеров и исследованных стационарных фаз.

Октилсилильная и октадецилсилильная стационарные фазы обеспечивают удерживание веществ в соответствии с их значениями гидрофобности (значениями $\log P$) в ряду кофеин < 1,3-динитробензол < нафталин, *o*-ксилол (рисунок 32, таблица 28). Полярные вещества, такие как кофеин и 1,3-динитробензол, демонстрируют недостаточное удерживание в данных условиях ($k' < 1,0$). Одновременно с этим, гидрофобные вещества, имеющие близкие значения гидрофобности, такие как *o*-ксилол и нафталин, демонстрируют недостаточное разрешение или не разделяются при работе на данных стационарных фазах при использовании вышеуказанных хроматографических условий (рисунок 32, таблица 28).

Таблица 26 – Параметры исследованных стационарных фаз

Стационарная фаза	Селектор	Доля углеродной нагрузки, %	$S_{уд}$, м ² /г	Значение $\log P$ селектора
<i>XBridge C8</i> 50 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Waters)	октильный	13	185	4,02
<i>Spherisorb ODS-2</i> 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Waters) [200]	октадецильный	11,5	200	8,47
<i>AWE-241</i> 150 × 4,6 мм, 5 мкм	<i>N</i> -пропилзамещенный 2,4-динитроанилиновый	8,7	365	2,86
<i>Luna PFP(2)</i> 150 × 4,6 мм, 3 мкм (Phenomenex) [201]	пентафторфенил- пропильный	11,5	400	4,09
<i>Zorbax Eclipse Plus</i> <i>Phenyl-Hexyl Rapid</i> <i>Resolution</i> 150 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Agilent Technologies) [202]	фенилгексильный	9,0	160	4,71
<i>Cosmosil 5PYE</i> 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Nacalai Tesque Inc.) [203]	пиренэтильный	18	330	5,24

Таблица 27 – Хроматографические условия для исследования разработанной стационарной фазы AWE-241 с помощью веществ-маркеров в сравнении с коммерчески доступными аналогами

Стационарная фаза:	<ul style="list-style-type: none"> – XBridge C8 50 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Waters) – Spherisorb ODS-2 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Waters) – AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм – Luna PFP(2) 150 × 4,6 мм, 3 мкм (Phenomenex) – Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Rapid Resolution 150 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Agilent Technologies) – Cosmosil 5PYE 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Nacalai Tesque Inc.)
Подвижная фаза:	MeOH – 0,1 % H ₃ PO ₄ (65:35)
Скорость потока:	1 мл/мин
Длина волны УФ-детектора:	270 нм
Температура колонки:	35 °С

Таблица 28 – Значения коэффициента удерживания веществ-маркеров на исследованных стационарных фазах

Вещество-маркер	Коэффициент удерживания k'					
	C8	ODS	AWE-241	Phenyl	PFP	PYE
<i>Кофеин</i>	0,45	0,55	2,46	0,46	0,64	11,66
<i>1,3-Динитробензол</i>	0,82	1,20	2,17	1,92	1,28	20,32
<i>о-Ксилол</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

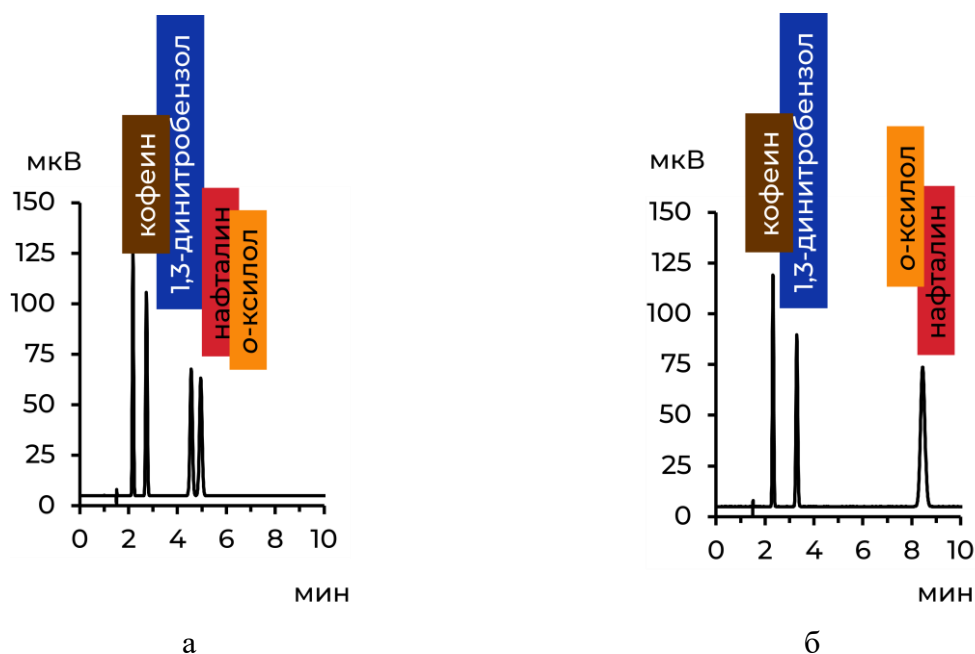


Рисунок 32 – Смоделированные на основе экспериментально полученных значений k' хроматограммы модельной смеси веществ-маркеров на стационарных фазах: а – C8; б – ODS.

Наиболее популярные коммерчески доступные стационарные фазы, содержащие ароматические группы, такие как пентафторфенильная и фенилгексильная фазы, также не обеспечивают реализацию сильных π -взаимодействий в данных условиях. Об этом свидетельствует аналогичный порядок элюирования веществ-маркеров по сравнению с C8 и ODS фазами, а также недостаточное удерживание кофеина (рисунок 33а и б, таблица 28). И фенилгексильная, и пентафторфенильная фазы демонстрируют удерживание в соответствии со значениями гидрофобности веществ-маркеров. При этом фенилгексильная фаза демонстрирует несколько большее удерживание по сравнению с пентафторфенильной, что связано с более гидрофобным гексильным линкером данной фазы.

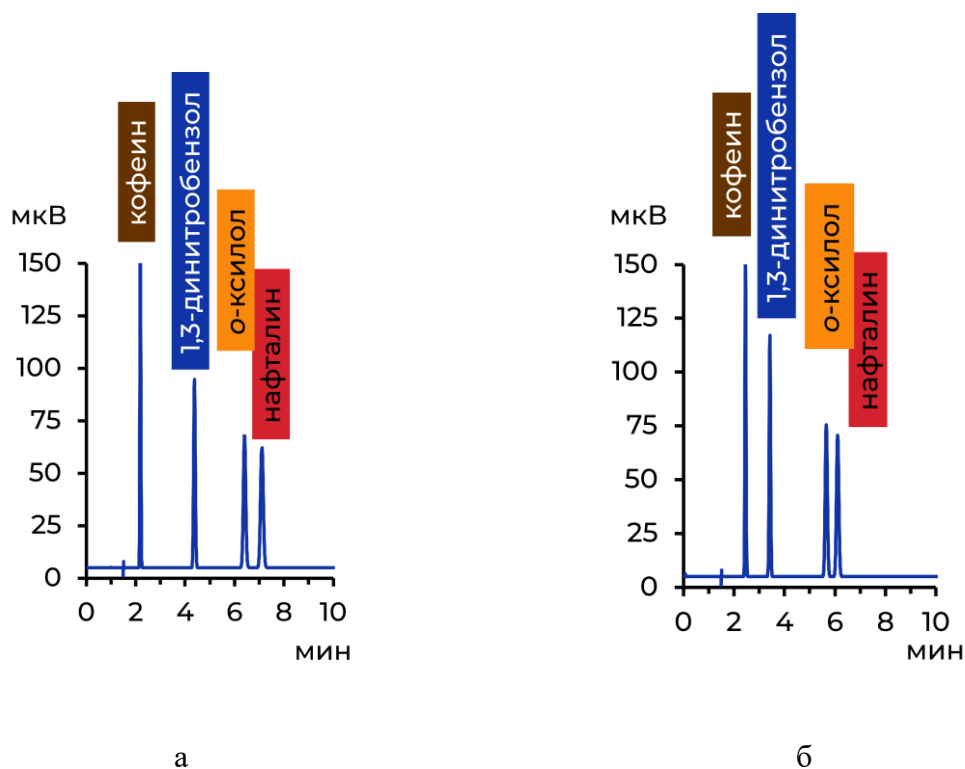


Рисунок 33 – Смоделированные на основе экспериментально полученных значений k' хроматограммы модельной смеси веществ-маркеров на стационарных фазах: а – Phenyl; б – PFP.

Использование разработанной стационарной фазы AWE-241 обеспечивает ортогональную селективность для исследованных веществ-маркеров, порядок элюирования которых определяется в первую очередь природой ароматической группы вещества-маркера (рисунок 34, таблица 28). Более того, разработанная стационарная фаза AWE-241 обладает универсальным характером, позволяя удерживать как электрононасыщенные конденсированные ароматические соединения (нафталин), так и соединения, содержащие электронодефицитные ароматические группы (кофеин, 1,3-динитробензол). Однако, для моноароматических соединений, не содержащих полярные группы и имеющих низкий дипольный момент, таких как *о*-ксилол, не реализуются достаточно сильные взаимодействия с участием ароматической группы. При этом, удерживание обусловлено преимущественно гидрофобным эффектом и дисперсионными взаимодействиями.

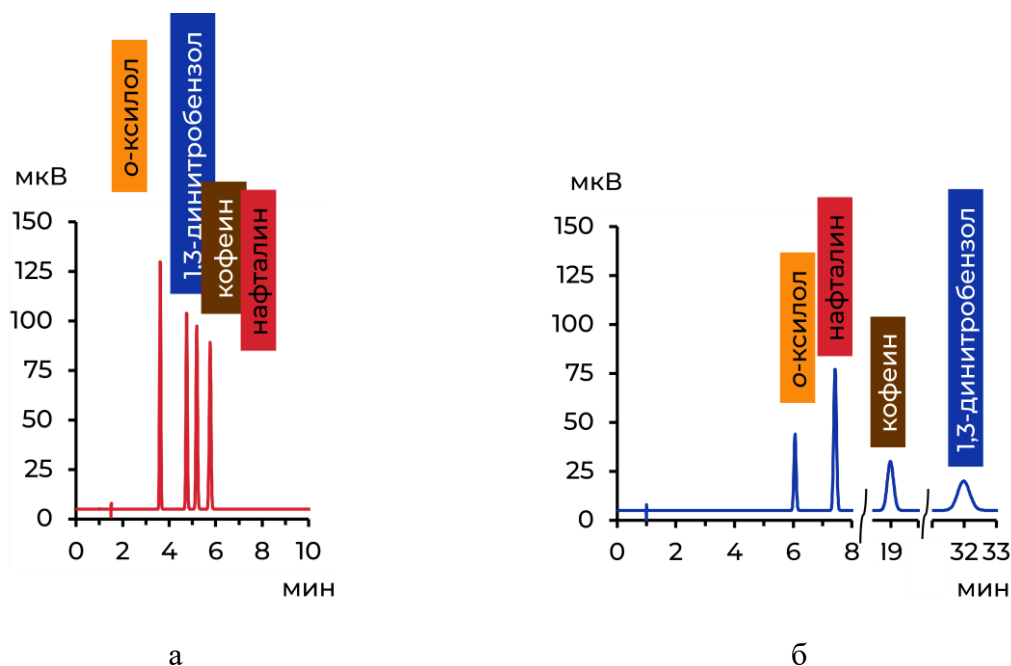


Рисунок 34 – Смоделированные на основе экспериментально полученных значений k' хроматограммы модельной смеси веществ-маркеров на стационарных фазах: а – АВЕ-241; б – РУЕ.

Пиренэтильная стационарная фаза обеспечивает значительно более сильное удерживание для электронодефицитных ароматических групп, таких как кофеин и 1,3-динитробензол. Однако, данная фаза не обладает универсальным характером, поскольку электрононасыщенные ароматические соединения (нафталин, *o*-ксилол) удерживаются сравнительно слабо, преимущественно за счет дисперсионных взаимодействий и гидрофобного эффекта (рисунок 34, таблица 28). Удерживание нафталина и *o*-ксилола несколько выше по сравнению с другими фазами, что связано с более гидрофобным пиренэтильным селектором данной стационарной фазы.

Дополнительно была исследована возможность удерживания веществ, содержащих полярные группы и ароматическую группу, не обладающую электронодефицитным характером, на примере новокаина. Новокаин представляет собой ароматическую группу, содержащую полярные заместители ($\log P = (-0,07)$ при рН 7,0; ($\log P = (-1,79)$ при рН 3,0 [199]), не обладающие сильным электроакцепторным характером. В связи с этим, для удерживания новокаина при использовании стандартных C8 и C18 стационарных фаз требуется использование подвижной фазы с высоким содержанием водной составляющей или с высоким значением рН. Разработанная стационарная фаза АВЕ-241 продемонстрировала значительно более высокое удерживание в сравнении не только с C8 и C18 стационарными фазами, но и с коммерчески доступными аналогами, содержащими ароматические группы (таблица 29, рисунок 35). Более того, стационарная фаза АВЕ-241

при работе в одинаковых условиях демонстрирует двукратное увеличение удерживания по сравнению с пиренэтильной стационарной фазой. Использование подвижной фазы с высоким содержанием органической составляющей (более 60 % метанола и ацетонитрила суммарно) оставляет возможность для дальнейшего увеличения удерживания и управления селективностью.

Таблица 29 – Значения коэффициента удерживания новокаина на исследованных стационарных фазах

Стационарная фаза	Коэффициент удерживания k'
<i>XBridge C8</i>	0,41
<i>Spherisorb ODS-2</i>	0,13
<i>ZORBAX Phenyl-hexyl</i>	0,07
<i>Luna PFP(2)</i>	0,30
<i>COSMOSIL 5PYE</i>	1,28
<i>AWE-241</i>	2,44

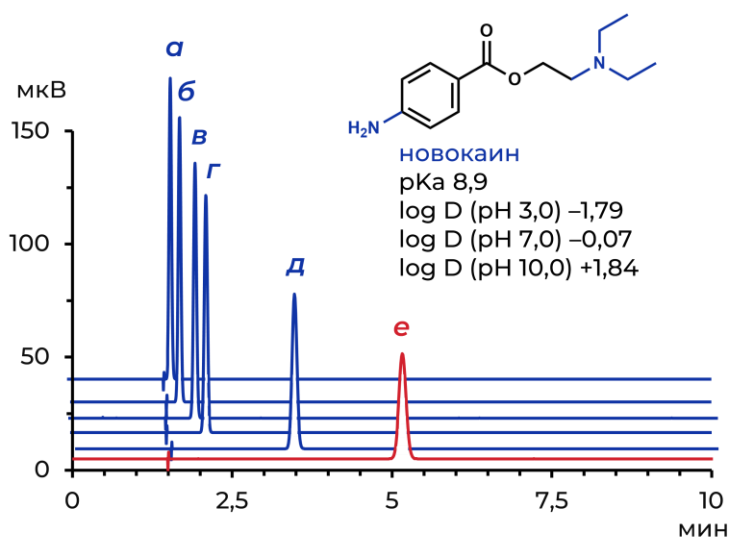


Рисунок 35 – Смоделированные на основе экспериментально полученных значений k' хроматограммы новокаина на исследованных стационарных фазах; подвижная фаза MeOH – фосфат аммония (рН 2,7; 50 мМ) – CH₃CN (50:40:10); температура колонки 30 °С; длина волны УФ-детектора 294 нм.

- а – ZORBAX Phenyl-hexyl 150 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Agilent Technologies) (синяя линия);
- б – Spherisorb ODS2 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Waters) (синяя линия);
- в – Luna PFP(2) 150 × 4,6 мм, 3 мкм (Phenomenex) (синяя линия);
- г – XBridge C8 50 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Waters) (синяя линия);
- д – COSMOSIL 5PYE 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Nacalai Tesque Inc.) (синяя линия);
- е – AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм (красная линия).

Выводы по главе 3.4

Исследована хроматографическая селективность разработанной фазы AWE-241 в сравнении с C8 стационарной фазой при использовании подвижной фазы на основе наиболее распространенных в ОФХ органических растворителей, таких как ацетонитрил, метанол, изопропанол и тетрагидрофуран. Ацетонитрил и тетрагидрофуран являются одними из наиболее сильных элюентов в смешанном ОФХ режиме с π -взаимодействиями, реализуемом при работе на данной стационарной фазе, из-за сравнительно высокой гидрофобности данных растворителей и их способности в значительной степени подавлять π -взаимодействия. Метанол обладает средней элюирующей силой, так как имеет меньшее значение гидрофобности, позволяя одновременно с этим реализовать селективные π -взаимодействия. Изопропанол обладает высоким значением гидрофобности и, как следствие, высокой элюирующей силой в ОФХ, однако позволяет реализовать селективные π -взаимодействия. Это обеспечивает значительное удерживание некоторых веществ, содержащих ароматическую группу и полярные заместители, при одновременной элюции гидрофобных веществ.

Разработанная стационарная фаза AWE-241 исследована в сравнении с коммерчески доступными C8, C18 стационарными фазами, а также коммерчески доступными фазами, содержащими ароматические группы (фенильная, пентафтор-фенильная, пиренэтильная). Стационарная фаза AWE-241 обеспечивает более высокое удерживание и селективность по сравнению со всеми исследованными коммерчески доступными стационарными фазами (за исключением пиренэтильной) по отношению к веществам, содержащим конденсированную ароматическую группу (на примере нафталина) или ароматическую группу, содержащую полярные заместители (на примере кофеина и 1,3-динитробензола). Комплементарной по характеру фазе AWE-241 и обеспечивающей большее удерживание по отношению к электронодефицитным ароматическим группам является пиренэтильная стационарная фаза.

3.5 Практическое применение разработанной стационарной фазы

3.5.1 Определение действующих веществ, содержащих ароматическую группу, в многокомпонентных лекарственных препаратах

Как было показано ранее, разработанная фаза АВЕ-241 за счет реализации π -взаимодействий обеспечивает удерживание мало- и среднеполярных веществ, имеющих недостаточное удерживание при работе в ОФХ режиме. Это позволяет более специфично определять полярные вещества, содержащие ароматическую группу, а также избежать необходимости градиентного элюирования при одновременном определении слабополярных и гидрофобных веществ, содержащих ароматическую группу.

Данное преимущество фазы АВЕ-241 и возможность ее практического применения продемонстрирована на примере определения активных действующих веществ и их родственных примесей для многокомпонентных лекарственных препаратов «Пенталгин», «Пенталгин НЕО» и «Цефекон Н».

Пенталгин

Удерживание и разделение слабополярных действующих веществ лекарственного препарата «Пенталгин», таких как кофеин, парацетамол и фенирамин (таблица 30) представляет собой сложную задачу при работе как в ОФ-ВЭЖХ, так и в НПЛС режимах. При уменьшении содержания органического растворителя в составе подвижной фазы с целью увеличения удерживания данных веществ, элюция с поверхности сорбента гидрофобных компонентов, таких как дротаверин и напроксен, требует использования градиентного элюирования.

Разработанная стационарная фаза АВЕ-241 обеспечивает ортогональную селективность и более сильное удерживание для полярных веществ по сравнению с коммерчески доступной октилсилильной стационарной фазой при работе в схожих хроматографических условиях за счет реализации смешанного ОФХ режима с π -взаимодействиями (таблица 31, таблица 32, рисунок 36). Это обеспечивает большую селективность и, как результат, лучшее разрешение для полярных соединений, таких как кофеин, парацетамол и фенирамин при одновременном элюировании гидрофобных соединений за приемлемое время анализа (k' последнего пика < 10).

Таблица 30 – Действующие вещества лекарственного препарата «Пенталгин»

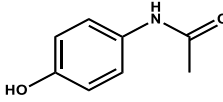
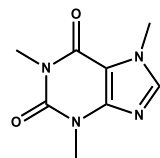
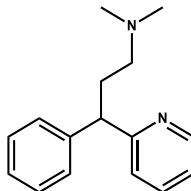
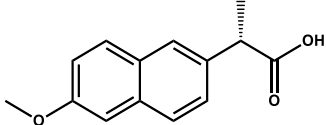
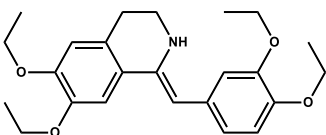
Лекарственный препарат	Действующее вещество, содержание в дозированной единице	Структурная формула	Log D (pH 3,0) [199]
«Пенталгин Таблетки, покрытые пленочной оболочкой»	Парацетамол, 325 мг		+ 0,91
	Кофеин, 50 мг		- 0,55
	Фенирамина малеат, 10 мг		- 1,14
	Напроксен, 100 мг		+ 2,96
	Дротаверина гидрохлорид, 40 мг		+ 1,01

Таблица 31 – Коэффициенты удерживания действующих веществ и родственных примесей лекарственного препарата «Пенталгин Таблетки, покрытые пленочной оболочкой»

Компонент	Log D (pH 3,0) [199]	Коэффициент удерживания k'	
		C8	AWE-241
Кофеин	- 0,55	0,2	1,17
Парацетамол	+ 0,91	0,4	0,58
Фенирамин	- 1,14	0,4	2,43
Дротаверин	+ 1,01	13,4	8,7
Напроксен	+ 2,96	20,4	2,83

Таблица 32 – Хроматографические условия для определения действующих веществ комбинированного лекарственного препарата «Пенталгин Таблетки, покрытые пленочной оболочкой»

Стационарная фаза:	XBridge C8 50 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Waters)
Подвижная фаза:	CH ₃ CN – 0,1 % H ₃ PO ₄ (75:25)
Стационарная фаза:	AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм
Подвижная фаза:	ИПС – CH ₃ CN – фосфат аммония (рН 2,3; 50 мМ) (30:20:50)
Скорость потока:	1 мл/мин
Длина волны УФ-детектора:	240 нм
Температура колонки:	30 °С

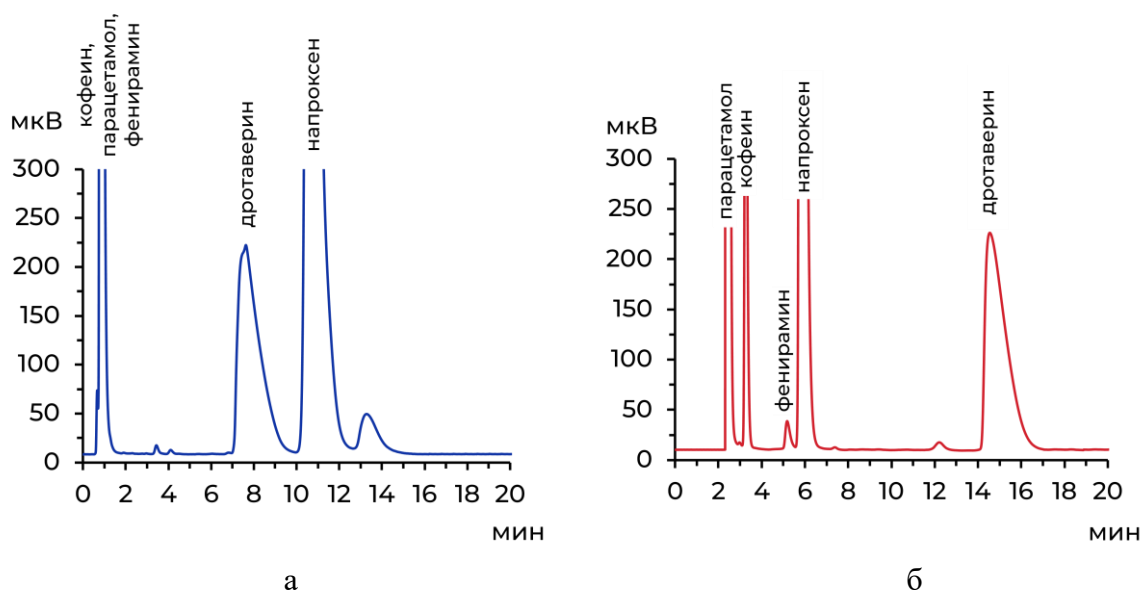


Рисунок 36 – Хроматограммы лекарственного препарата «Пенталгин Таблетки, покрытые пленочной оболочкой»: а – на октилсилильной стационарной фазе (синяя линия); б – разработанной стационарной фазе AWE-241 (красная линия)

Пенталгин НЕО

В состав многокомпонентного лекарственного препарата «Пенталгин НЕО» также входят полярные (кофеин, парацетамол) и гидрофобные (напроксен) вещества (таблица 33) что делает сложным одновременное количественное определение данных компонентов в изократическом режиме элюирования.

Разработанная стационарная фаза AWE-241 обеспечивает ортогональную селективность и более сильное удерживание для полярных веществ по сравнению с коммерчески доступной октадецилсилильной стационарной фазой (C18) при работе в схожих хроматографических условиях за счет реализации смешанного ОФХ режима с π -взаимодействиями (таблица 34, рисунок 37, таблица 35). Использование состава подвижной фазы с различным содержанием метанола приводит к обращению порядка элюирования пиков при работе на стационарной фазе AWE-241. Это обеспечивает большую селективность и, как результат, лучшее разрешение для полярных соединений, таких как кофеин и парацетамол, при одновременном элюировании гидрофобных соединений, таких как напроксен, за приемлемое время анализа (k' последнего пика < 10).

Таблица 33 – Действующие вещества лекарственного препарата «Пенталгин НЕО»

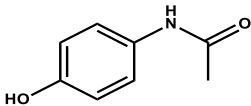
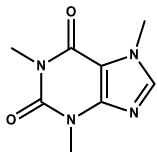
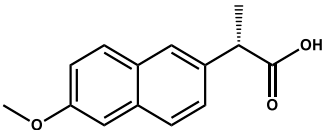
Лекарственный препарат	Действующее вещество, содержание в дозированной единице	Структурная формула	Log D (pH 3,0) [199]
«Пенталгин НЕО Таблетки, покрытые пленочной оболочкой»	Парацетамол, 325 мг		+ 0,91
	Кофеин, 50 мг		- 0,55
	Напроксен, 220 мг		+ 2,96

Таблица 34 – Хроматографические условия для определения действующих веществ комбинированного лекарственного препарата «Пенталгин НЕО Таблетки, покрытые пленочной оболочкой»

Стационарная фаза:	Spherisorb ODS-2 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Waters)
	AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм
Скорость потока:	1 мл/мин
Длина волны УФ-детектора:	230 нм
Температура колонки:	30 °С

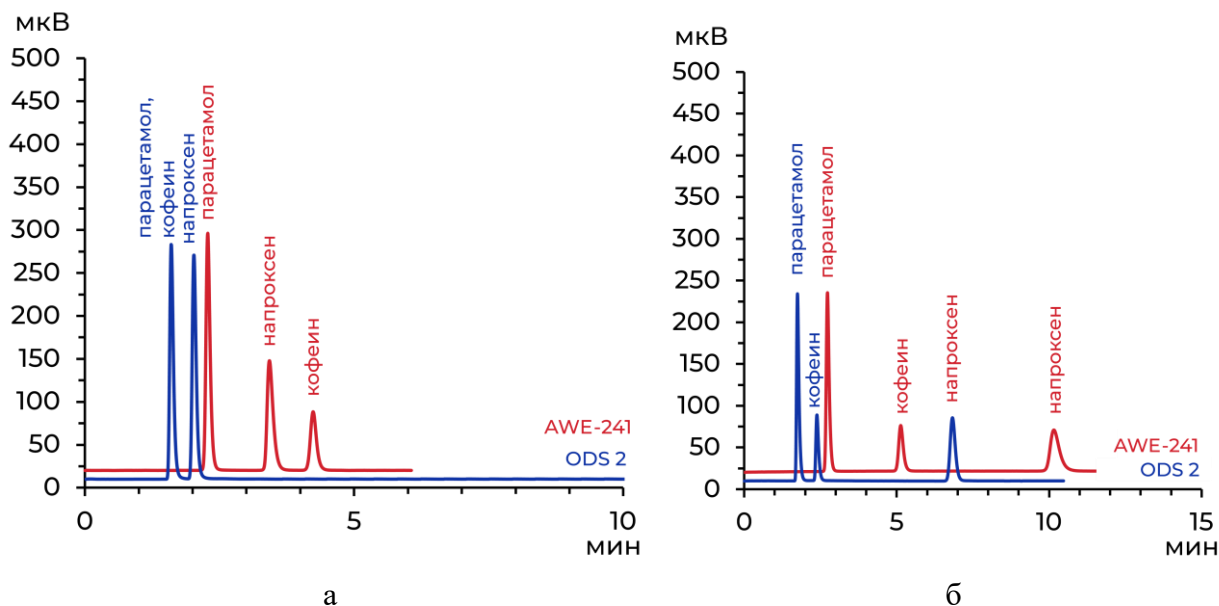


Рисунок 37 – Хроматограммы лекарственного препарата «Пенталгин НЕО Таблетки, покрытые пленочной оболочкой»: а – при использовании подвижной фазы состава метанол – 0,1 % *о*-фосфорная к-та (90:10); б – при использовании подвижной фазы состава метанол – 0,1 % *о*-фосфорная к-та (60:40). Условные обозначения: **синяя линия** – стационарная фаза ODS-2; **красная линия** – стационарная фаза AWE-241.

Таблица 35 – Хроматографические условия для определения действующих веществ комбинированного лекарственного препарата «Пенталгин НЕО Таблетки, покрытые пленочной оболочкой»

Компонент	Log D (pH 3,0) [199]	Коэффициент удерживания k'			
		90% MeOH		60% MeOH	
		ODS 2	AWE-241	ODS 2	AWE-241
<i>Парацетамол</i>	- 0,55	0,07	0,52	0,17	0,82
<i>Кофеин</i>	+ 0,91	0,07	1,83	0,59	2,42
<i>Напроксен</i>	+ 2,96	0,35	1,29	3,55	5,77

Цефекон Н

Лекарственный препарат «Цефекон Н Суппозитории ректальные» содержит одновременно гидрофобные (напроксен, салициламид) и полярные (кофеин) действующие вещества и их родственные примеси (теофиллин, салициловая кислота, таблица 36), которые не представляется возможным разделить за приемлемое время при работе на классической стационарной фазе типа C8 в изократическом режиме ОФХ (таблица 37, рисунок 38, таблица 38).

Таблица 36 – Действующие вещества лекарственного препарата «Цефекон Н»

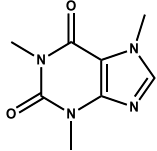
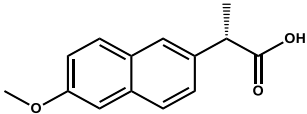
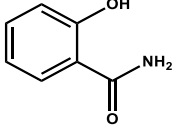
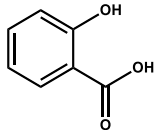
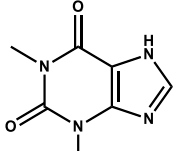
Лекарственный препарат	Действующее вещество, содержание в дозированной единице	Структурная формула	Log D (pH 3,0) [199]
«Цефекон Н Суппозитории ректальные»	Кофеин, 50 мг		- 0,55
	Напроксен, 75 мг		+ 2,96
	Салициламид, 600 мг		+ 1,17
	Салициловая кислота (примесь)		+ 1,56
	Теofilлин (примесь)		- 0,77

Таблица 37 – Хроматографические условия для определения действующих веществ и их родственных примесей в комбинированном лекарственном препарате «Цефекон Н Суппозитории ректальные»

Стационарная фаза:	XBridge C8 50 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Waters)
Подвижная фаза:	CH ₃ CN – 0,1 % H ₃ PO ₄ (25:75)
Скорость потока:	2 мл/мин
Стационарная фаза:	AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм
Подвижная фаза:	ИПС – 0,1 % H ₃ PO ₄ (40:60)
Скорость потока:	1 мл/мин
Длина волны УФ-детектора:	240 нм
Температура колонки:	30 °С

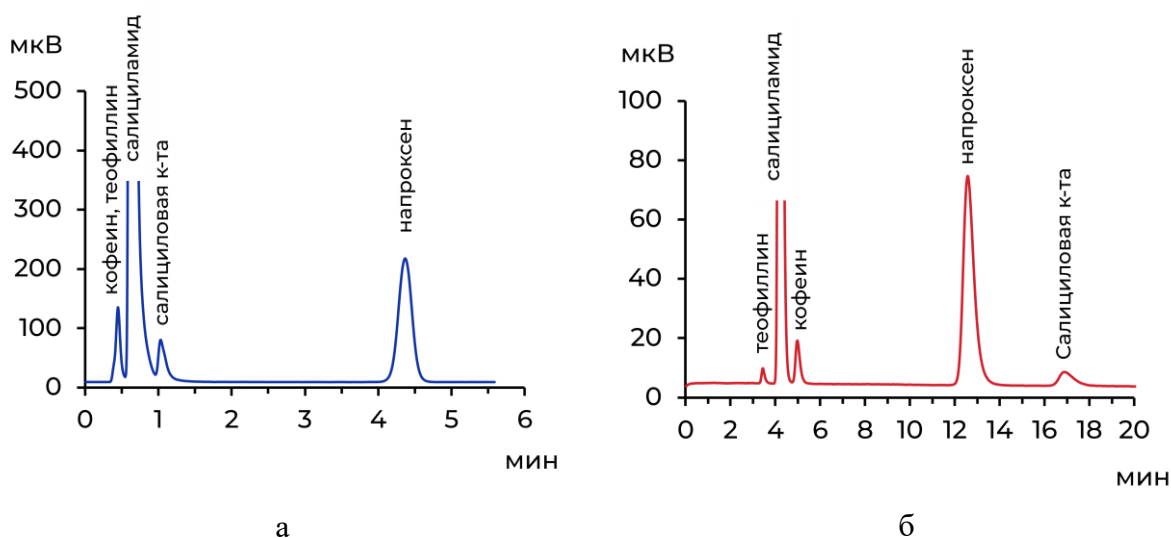


Рисунок 38 – Хроматограммы лекарственного препарата «Цефекон Н Суппозитории ректальные»: а – на октилсилильной стационарной фазе (синяя линия); б – разработанной стационарной фазе АВЕ-241 (красная линия)

Разработанная фаза обеспечивает оптимальную селективность для одновременного определения смеси полярных веществ, в том числе имеющих близкие значения гидрофобности (на примере кофеина и теофиллина), содержащих ароматическую группу, и гидрофобных веществ (рисунок 38).

Таблица 38 – Коэффициенты удерживания действующих веществ и родственных примесей лекарственного препарата «Цефекон Н Суппозитории ректальные»

Компонент	Log D (pH 3,0) [199]	Коэффициент удерживания k'	
		С8	АВЕ-241
<i>Теофиллин</i>	- 0,77	0,9	1,3
<i>Кофеин</i>	- 0,55	0,9	1,8
<i>Салициламид</i>	+ 1,17	1,8	2,4
<i>Салициловая кислота</i>	+ 1,56	18,2	10,3
<i>Напроксен</i>	+ 2,96	3,4	7,3

3.5.2 Возможность определения активных фармацевтических субстанций в лиофилизованной сыворотке крови с помощью разработанной стационарной фазы

В результате эксперимента по установлению элюотропного ряда для хроматографического режима с π -взаимодействиями установлено, что изопропанол — один из наиболее слабых элюентов, обеспечивающих реализацию специфических π -взаимодействий (рисунок 13).

Вместе с тем, изопропанол — один из наиболее сильных растворителей в ОФХ, обеспечивающий элюцию гидрофобных веществ. Это обстоятельство делает возможным использование разработанной стационарной фазы AWE-241 для специфичного определения физиологически активных веществ, содержащих ароматическую группу и высокополярные группы, при одновременном элюировании липофильных компонентов матрицы около «мёртвого времени» ($k' < 1$). Липофильные компоненты матрицы могут включать такие компоненты, как гидрофобные вспомогательные вещества некоторых лекарственных форм (свечи, суппозитории, мази, крема), липиды плазмы крови и других биологических объектов, а также липофильные компоненты пищевых продуктов (жиры молока, масла и др.).

Процедура пробоподготовки включает минимально необходимые этапы по осаждению белков плазмы крови (рисунок 39) и основана на протоколе [204]. Данная возможность продемонстрирована на примере определения АФС мелоксикама (рисунок 40) и нитразепама (рисунок 41) в лиофилизованной сыворотке крови на уровне 0,1 мг/мл (таблица 39).

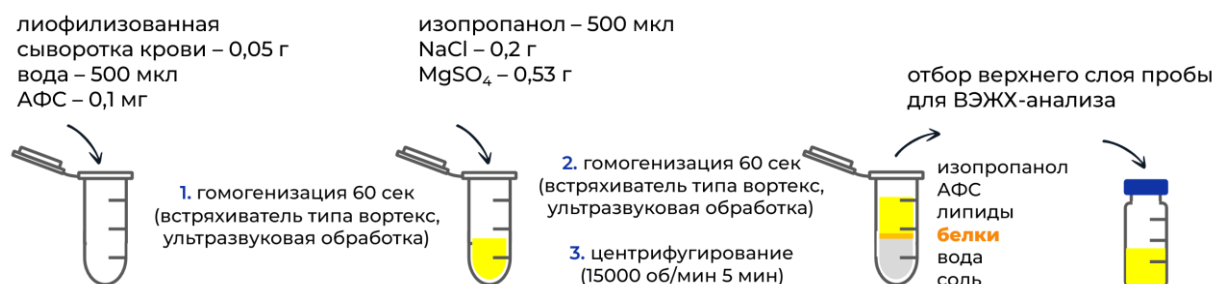


Рисунок 39 – Схема процедуры пробоподготовки модельного раствора АФС в лиофилизованной сыворотке крови

Таблица 39 – Хроматографические условия определения активных фармацевтических субстанций в присутствии матрицы лиофилизованной сыворотки крови

Стационарная фаза:	AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм
Подвижная фаза:	ИПС – 0,1 % H ₃ PO ₄ (90:10)
Скорость потока:	1 мл/мин
Температура колонки:	30 °С
Объем ввода пробы:	10 мкл
Концентрация АФС:	0,1 мг/мл

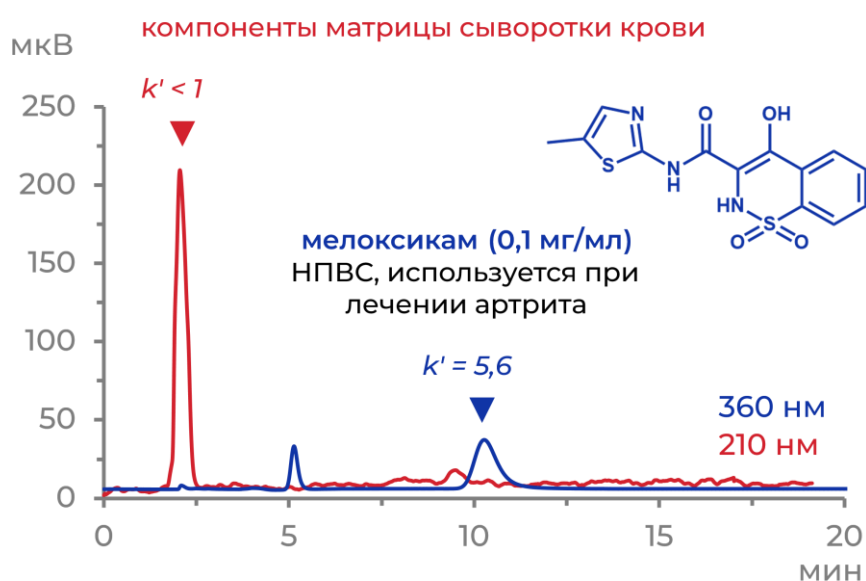


Рисунок 40 – Хроматограммы АФС мелоксикама в присутствии липофильных компонентов лиофилизованной сыворотки крови: **красная линия** – хроматограмма бланка лиофилизованной сыворотки крови (длина волны УФ-детектора 210 нм); **синяя линия** – хроматограмма модельной смеси АФС мелоксикама на уровне 0,1 мг/мл в лиофилизованной сыворотки крови (длина волны УФ-детектора 360 нм)

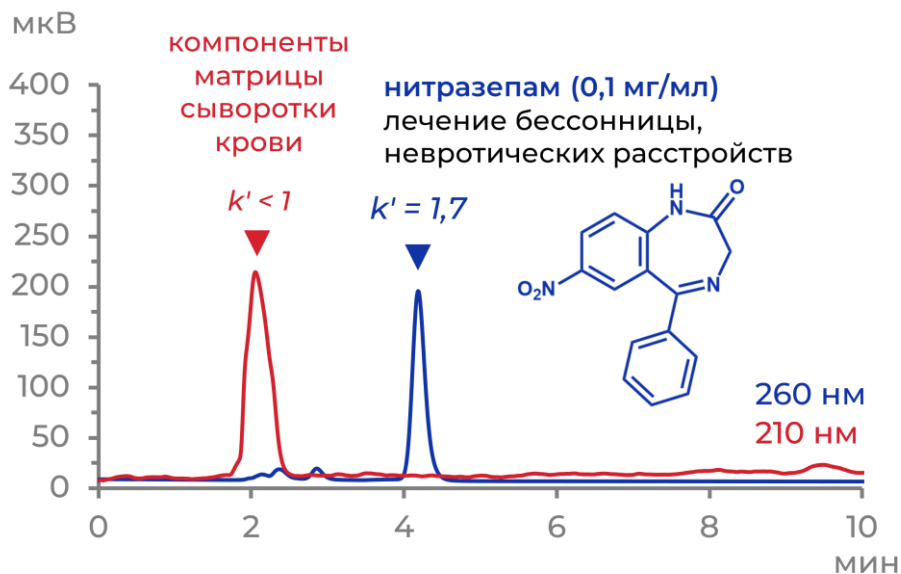


Рисунок 41 – Хроматограммы АФС нитразепама в присутствии липофильных компонентов лиофилизованной сыворотки крови: **красная линия** – хроматограмма бланка лиофилизованной сыворотки крови (длина волны УФ-детектора 210 нм); **синяя линия** – хроматограмма модельной смеси АФС нитразепама на уровне 0,1 мг/мл в лиофилизованной сыворотки крови (длина волны УФ-детектора 260 нм)

Использование разработанной стационарной фазы в сочетании с подвижной фазой, содержащей высокое количество изопропанола (более 90 % об.), позволяет устранить мешающее влияние липофильных компонентов. При этом обеспечивается специфичное определение АФС, содержащих ароматическую группу и полярные функциональные группы. Детектирование образца бланка матрицы лиофилизованной сыворотки крови на длине волны 210 нм подтверждает элюцию всех гидрофобных компонентов около «мертвого времени». Детектирование АФС, содержащих ароматическую группу, на определенной длине волны дополнительно обеспечивает высокую специфичность определения целевых компонентов.

Так как нафталин при использовании подвижной фазы на основе изопропанола не демонстрирует значительного удерживания (таблица 24), адсорбция АФС в данных хроматографических условиях происходит, предположительно, в значительной степени за счет диполь-дипольных взаимодействий и взаимодействий посредством водородных связей с высокополярными группами между сорбентом и аналитом (рисунок 40, рисунок 41).

Кроме того, продемонстрирована возможность определения ряда других активных фармацевтических субстанций при использовании подвижной фазы с высоким содержанием изопропанола (хроматографические условия – таблица 39), что также делает потенциально возможным определение данных АФС и широкого ряда других веществ в присутствии липофильных компонентов матрицы. При условии элюции гидрофобных компонентов матрицы около «мертвого времени» $k' < 1$, для специфичного отделения пика целевого вещества, содержащего ароматическую группу, достаточно коэффициента удерживания $k' > 1$. При увеличении содержания ИПС в составе подвижной фазы или замене части подвижной фазы еще более слабым в режиме жидкостной хроматографии с π -взаимодействиями элюентом, например, гексаном, можно дополнительно увеличить удерживание веществ, содержащих ароматическую группу. Для значений коэффициента удерживания k' и значений гидрофобности $\log D$ не наблюдается корреляции (таблица 40), что говорит о сложном механизме разделения, не основанном на исключительно дисперсионных взаимодействиях и гидрофобном эффекте.

Таблица 40 – Исследованные активные фармацевтические субстанции, содержащие ароматическую группу и полярные функциональные группы

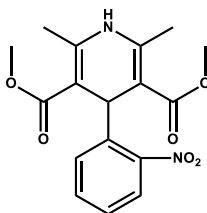
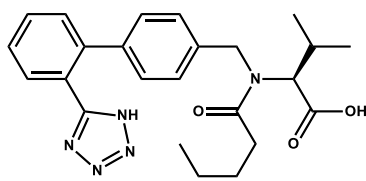
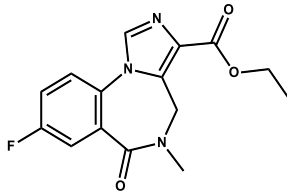
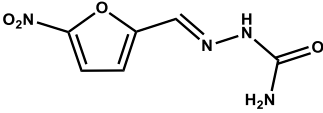
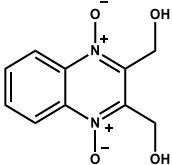
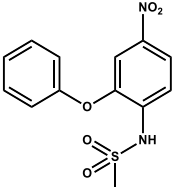
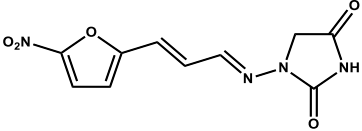
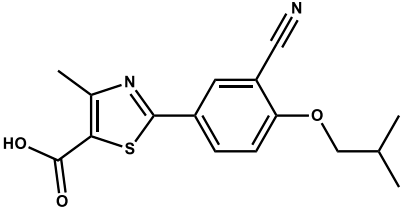
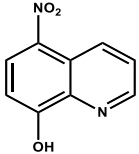
Название	Структурная формула	Log D (pH 3,0) [199]	k'
Нифедипин		0,58	1,2
Валсартан		4,01	1,3
Флумазенил		1,18	1,4

Таблица 40 – Исследованные активные фармацевтические субстанции, содержащие ароматическую группу и полярные функциональные группы

Название	Структурная формула	Log D (pH 3,0) [199]	k'
Фурацилин		-0,14	1,3
Диоксидин		-2,17	1,6
Нимесулид		1,79	2,2
Фуразидин		0,07	3,1
Фебуксостат		2,08	6,3
Нитроксолин		1,76	9,4

Выводы по главе 3.5

Показана высокая актуальность и практическая значимость разработанной стационарной фазы. *N*-Алкилзамещенная 2,4-динитроанилиновая группа обеспечивает уникальную селективность по отношению к полярным веществам, содержащим ароматическую группу, решая проблему недостаточного удерживания и селективности полярных веществ при работе в ОФХ режиме. К данной группе веществ относится большое

количество активных фармацевтических субстанций и их примесей, что позволяет использовать данную стационарную фазу для более селективного определения данных веществ в фармацевтической области, а также в других сферах использования ВЭЖХ-анализа.

Продемонстрирована возможность применения разработанной стационарной фазы для специфичного определения различных активных фармацевтических субстанций и других потенциальных веществ, содержащих ароматическую группу и полярные группы, в присутствии липофильных компонентов матрицы. Данное преимущество обусловлено уникальной способностью ароматического селектора разработанной стационарной фазы специфично удерживать вещества, содержащие ароматические группы, замещенные полярными группами. Для реализации данного преимущества требуется использование подвижной фазы на основе гидрофобных растворителей, таких как изопропанола или алканов, позволяющих реализовать сильные π -взаимодействия.

3.6 Метрологическая оценка параметров методики определения действующих веществ лекарственного препарата, разработанной с использованием стационарной фазы AWE-241

3.6.1 Возможность одновременного определения веществ различной гидрофобности обращенно-фазовом режиме жидкостной хроматографии

Для воспроизводимого и точного определения веществ коэффициент удерживания должен составлять более 1,5, но не менее 1,0. С другой стороны, слишком длительное удерживание веществ нецелесообразно и коэффициент удерживания должен составлять менее 9, так как дальнейшее увеличение удерживания не приводит к приросту параметра разрешения R_s , приводя лишь к возрастанию стоимости анализа (рисунок 42) [14]. В некоторых случаях данный диапазон может быть расширен до $0,5 < k' < 20$. Однако, в области с $k' < 1,0$ могут элюироваться компоненты, не имеющие достаточного разделения (рисунок 42). Кроме того, разделение в данной области зачастую неробастно и подвержено влиянию незначительных изменений хроматографических условий.

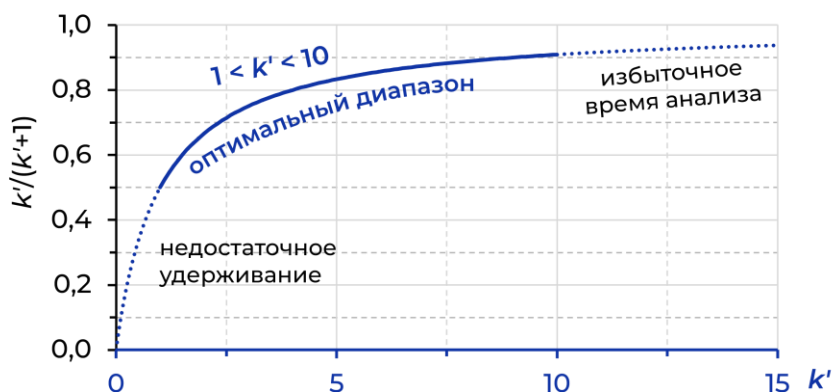


Рисунок 42 – График вклада коэффициента удерживания в параметр разрешения R_s

Преимущество разработанной стационарной фазы AWE-241 продемонстрировано на примере определения компонентов лекарственного препарата «Ибуклин» (парацетамол и ибупрофен). Фаза AWE-241 не только обеспечивает более длительное удерживание и возможность селективного определения полярных веществ, содержащих ароматическую группу на примере парацетамола, но и позволяет одновременно определять полярные и гидрофобные вещества, содержащие ароматическую группу, на примере парацетамола и ибупрофена, обеспечивая оптимальные значения k' без необходимости градиентного элюирования (таблица 41).

Таблица 41 – Значения коэффициентов удерживания k' парацетамола и ибупрофена на исследованных стационарных фазах

Стационарная фаза	Коэффициент удерживания k'	
	Парацетамол	Ибупрофен
<i>AWE-241</i>	1,67	9,33
<i>Октилсилильная</i>	0,61	81,71
<i>Октадецилсилильная</i>	0,54	142,05
<i>Пентафторфенильная</i>	0,85	93,03
<i>Фенилгексильная</i>	0,42	138,47
<i>Пиренэтильная</i>	0,98	139,54
<i>Рекомендуемые требования</i>	> 1	< 10

В существующих работах для совместного определения полярных и гидрофобных веществ, таких как парацетамол и ибупрофен, используют неоптимальные хроматографические условия (таблица 42), которые могут приводить к ускоренному выходу хроматографической колонки из строя (рН выше 7,0), не обеспечивая при этом достаточное удерживание для парацетамола [205–211], или требуют использования градиентного элюирования [212].

Таблица 42 – Работы по совместному определению парацетамола и ибупрофена методом ВЭЖХ и их недостатки

<i>Работа</i>	Недостаток	Ссылка
<i>A Study of Method Development, Validation, and Forced Degradation for Simultaneous Quantification of Paracetamol and Ibuprofen in Pharma-ceutical Dosage Form by RP-HPLC Method</i>	1. Подвижная фаза: фосфат калия (10 мМ, рН 6,8) – CH ₃ CN (65:35); 2. Коэффициент удерживания парацетамола: k' 0,31	[205]
<i>Ibuprofen and Paracetamol Tablets – Assay and Related Substances Method as per IP Monograph</i>	1. Подвижная фаза: фосфат натрия (75 мМ; рН 7,0) – CH ₃ CN – MeOH (75:24,5:0,5); 2. Коэффициент удерживания парацетамола: k' 0,52	[206]
<i>Validated RP-HPLC Method for Estimation of Dexibuprofen and Paracetamol in Combined Tablet Dosage Form</i>	1. Подвижная фаза: CH ₃ CN – вода (рН 7,8, доведенный триэтиламино) 50:50; 2. Коэффициент удерживания парацетамола: k' 0,29	[207]
<i>The Simultaneous Determination of Ibuprofen and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations by</i>	1. Подвижная фаза: CH ₃ CN – фосфатный буфер (рН 6,0; 40 мМ) 30:70;	[208]

Таблица 42 – Работы по совместному определению парацетамола и ибупрофена методом ВЭЖХ и их недостатки

<i>Работа</i>	Недостаток	Ссылка
<i>High-performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection</i>	2. Коэффициент удерживания парацетамола: $k' 0,4$	
<i>Development and validation of a stability indicating RP-UPLC method for the determination of paracetamol and ibuprofen in tablet</i>	1. Подвижная фаза: CH_3CN – фосфат калия (20 мМ; pH 7,35) 65:35; 2. Коэффициент удерживания парацетамола: $k' 0,24$	[209]
<i>Development and validation of a RP-HPLC for simultaneous determination of Ibuprofen and Paracetamol in solid dosage forms: Application to dissolution studies</i>	1. Коэффициент удерживания парацетамола: $k' 0,1$	[210]
<i>Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of Paracetamol and Ibuprofen in fixed dose combinations</i>	1. Подвижная фаза: метанол – фосфат натрия (50 мМ; pH 7,0) 65:35; 2. Коэффициент удерживания парацетамола: $k' 0,22$	[211]
<i>A rapid and sensitive reversed phase-HPLC method for simultaneous determination of ibuprofen and paracetamol in drug samples and their behaviors in simulated gastric conditions</i>	1. Подвижная фаза: фосфат аммония (50 мМ, pH 7,5) – MeOH; 2. Режим элюирования: градиентный	[212]

Для апробации разработанной стационарной фазы была разработана методика одновременного хроматографического определения действующих веществ лекарственного препарата «Ибуклин, 400 мг + 325 мг таблетки, покрытые пленочной оболочкой» – парацетамола и ибупрофена (таблица 43) и проведена оценка ключевых метрологических характеристик разработанной методики. Для апробации использовались рекомендации по межгосударственной стандартизации РМГ-61 2010 [213].

Таблица 43 – Хроматографические условия разработанной методики определения действующих веществ лекарственного препарата «Ибуклин»

Стационарная фаза:	AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм
Подвижная фаза:	MeOH – фосфат аммония (50 мМ, pH 3,2) (40:60)
Скорость потока:	1 мл/мин
Длина волны УФ-детектора:	220 нм
Температура колонки:	+ 30 °С
Объем ввода пробы:	40 мкл

3.6.2 Линейность

Линейность зависимости отклика УФ-детектора от концентрации действующего вещества исследована с помощью активных фармацевтических субстанций (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, по 3 параллели для каждой точки (рисунок 43, рисунок 44, таблица 44). Коэффициент корреляции R^2 составил 0,9998 для ибупрофена и 0,9999 для парацетамола.

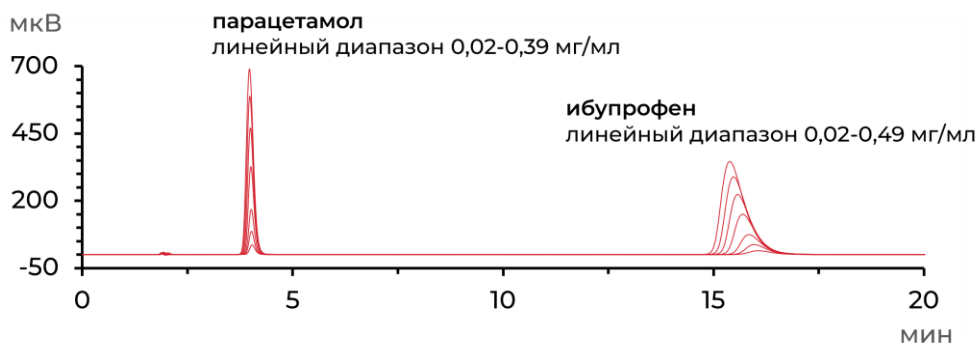


Рисунок 43 –Хроматограммы модельных смесей парацетамола и ибупрофена, использованные для построения градуировочных зависимостей

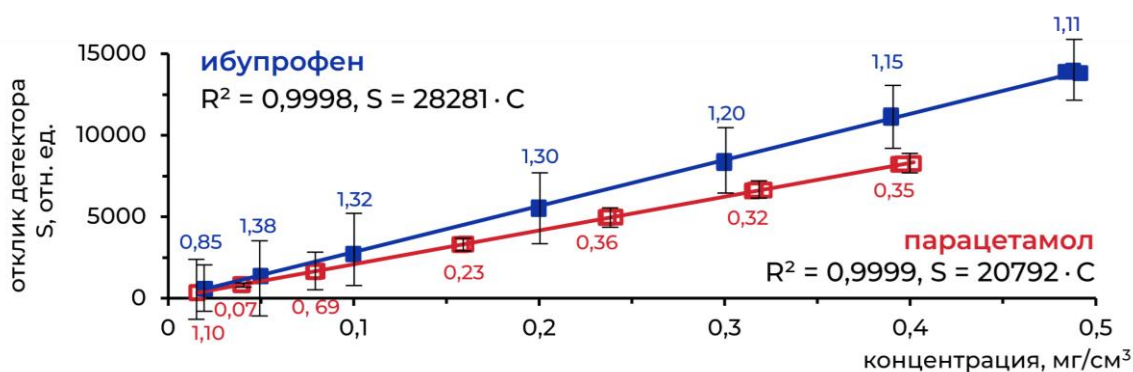


Рисунок 44 – Градуировочные зависимости для определения парацетамола (□ красный цвет) и ибупрофена (■ синий цвет) ($n=3$; $P=0,95$)

Таблица 44 – Параметры градуировочных зависимостей для модельных растворов парацетамола и ибупрофена, и характеристики их хроматографического определения ($n = 3$; $P = 0,95$)

Соединение	Определяемые концентрации, мг/мл	Линейное уравнение и коэффициент корреляции	RSD_r , %
Парацетамол	0,40	$S = 20792 \cdot C,$ $R^2 = 0,9999$	0,35
	0,32		0,32
	0,24		0,36
	0,16		0,23
	0,08		0,69
	0,04		0,07
	0,02		1,10
Ибупрофен	0,49	$S = 28281 \cdot C,$ $R^2 = 0,9998$	0,63
	0,39		0,76
	0,30		0,77
	0,20		0,86
	0,10		0,37
	0,05		0,80
	0,02		0,79

3.6.3 Предел количественного определения (ПКО) и предел обнаружения (ПО)

Пределы количественного определения и пределы обнаружения для парацетамола и ибупрофена определяли с помощью АФС (таблица 45, рисунок 45). В высокоэффективной жидкостной хроматографии чаще всего используется способ расчета ПО и ПКО на основе отношения интенсивности сигнала S (высоты пика) к средней интенсивности шума N базовой линии. При этом отношение S/N должно быть более 10 для ПКО и более 3 для ПО [214].

Для расчета ПО и ПКО на основе отношения S/N применяется несколько методов, один из которых – с использованием протокола ASTM [215, 216]. Значения ПО и ПКО получали с помощью программного обеспечения ChemStation for LC Systems на основе отношения значений сигнал/шум S/N на основе метода ASTM. ПКО составил 0,64 мкг/мл для парацетамола и 1,95 мкг/мл для ибупрофена, ПО составил 0,32 мкг/мл для парацетамола и 0,66 мкг/мл для ибупрофена.

Таблица 45 – Полученные значения определения ПО и ПКО для парацетамола и ибупрофена

Вещество	Полученное значение	ПО	ПКО
Парацетамол	МКГ/МЛ	0,32	0,64
	<i>S/N</i>	5,4	9,9
Ибупрофен	МКГ/МЛ	0,66	1,95
	<i>S/N</i>	3,5	9,9

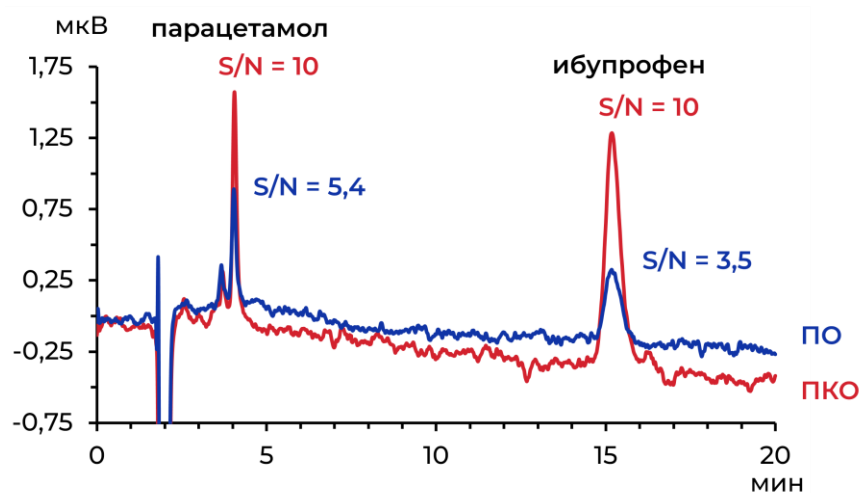


Рисунок 45 – Хроматограммы парацетамола и ибупрофена на уровнях ПО (синяя линия) и ПКО (красная линия)

3.6.4 Повторяемость и прецизионность

Показатели внутрилабораторной прецизионности и повторяемости оценивались с использованием АФС парацетамола и ибупрофена с использованием рекомендаций РМГ-61 2010 [213].

Для оценки повторяемости (6 параллелей, 1 аналитик) использовались значения относительных среднеквадратических отклонений (*RSD*), полученные в условиях повторяемости, с использованием критерия Кохрена $S_{r,m}$ для оценки наличия выбросов (таблица 46). Для оценки повторяемости в условиях внутрилабораторной прецизионности два аналитика независимо хроматографировали на двух разных хроматографах по 6 испытуемых растворов, в разные дни. Для оценки использовались значения *RSD* результатов анализа, полученные в условиях внутрилабораторной прецизионности с использованием критерия Граббса $S_{R,m}$ для оценки наличия выбросов (таблица 46).

Таблица 46 – Результаты оценки повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения парацетамола и ибупрофена

Соединение	RSD _{повт}	RSD _{внутрилаб прециз}
<i>Парацетамол</i>	0,7895	0,9392
<i>Ибупрофен</i>	0,5308	0,6645

3.6.5 Правильность

Правильность определения методики контролировали методом добавок с использованием АФС парацетамола и ибупрофена (рисунок 46). Правильность методики оценивали на основании рассчитанных значений коэффициента Стьюдента $t_{\text{эксп}}$ (уравнение 6), которые составили 0,08 для парацетамола и 2,17 для ибупрофена ($t_{\text{табл}} = 2,78$; $n = 5$; $P = 0,95$). Для парацетамола и ибупрофена определены значения найденных концентраций и доверительные интервалы (таблица 47).

Таблица 47 – Параметры оценки правильности методики количественного определения парацетамола и ибупрофена

Соединение	Коэффициента Стьюдента $t_{\text{эксп}}$ ($t_{\text{табл}} = 2,78$; $n = 5$; $P = 0,95$)	Концентрация «найдено» в растворе без добавки, мг/см ³	Концентрация «найдено» в растворе с добавкой, мг/см ³
<i>Парацетамол</i>	0,08	0,105	0,227
<i>Ибупрофен</i>	2,17	0,168	0,35

$$t_{\text{эксп}} = \frac{|\bar{X} - \mu|}{S_d} \cdot \sqrt{n}, \quad (6)$$

где \bar{X} – среднее арифметическое полученных параллельных измерений, мг/см³;
 μ – опорное значение раствора без добавки, мг/см³;
 S_d – стандартное отклонение для полученных параллельных измерений;
 n – число параллельных измерений.

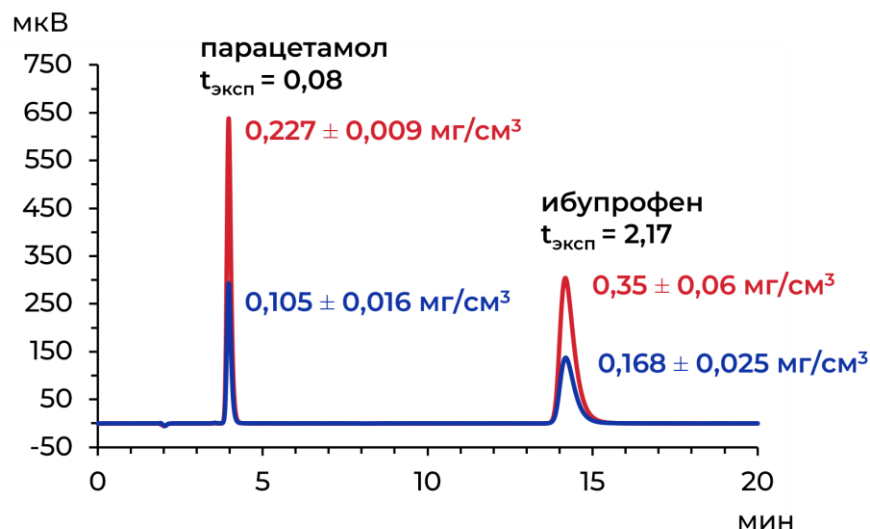


Рисунок 46 – Хроматограммы АФС парацетамола и ибупрофена, использованные для оценки правильности: **синяя линия** – испытуемый раствор; **красная линия** – испытуемый раствор с добавкой

3.6.6 Сравнение стационарных фаз AWE-241 и ODS по возможности количественного определения парацетамола и ибупрофена

Для оценки возможности получения равноценных результатов с помощью разработанной стационарной фазы определены значения критериев Стьюдента для показателей «введено-найдено» парацетамола и ибупрофена на трех уровнях концентраций, полученных на разработанной стационарной фазе AWE-241 и коммерчески доступной октадецилсилильной фазе ODS-2 (таблица 48).

Таблица 48 – Хроматографические условия определения парацетамола и ибупрофена на стационарной фазе AWE-241 в сравнении с коммерчески доступной фазой ODS

Стационарная фаза:	Spherisorb ODS-2 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Waters)
Подвижная фаза:	MeOH – фосфат аммония (50 мМ, pH 3,2) (52:48)
Стационарная фаза:	AWE-241 150 × 4,6 мм, 5 мкм
Подвижная фаза:	MeOH – фосфат аммония (50 мМ, pH 3,2) (40:60)
Скорость потока:	1 мл/мин
Длина волны УФ-детектора:	220 нм
Температура колонки:	+ 30 °С
Объем ввода пробы:	40 мкл

Результаты сравнения (таблица 49), демонстрируют сложность одновременного определения полярных и гидрофобных соединений при работе на наиболее распространенных стационарных фазах типа ODS в изократическом режиме ОФХ. Так, для методики одновременного определения парацетамола и ибупрофена при работе на фазе ODS использована подвижная фаза с более высоким содержанием метанола для сокращения времени удерживания ибупрофена до более оптимального ($k' = 16,12$). Однако, использование подвижной фазы данного состава не обеспечивает робастных условий определения ибупрофена из-за чувствительности методики к незначительным изменениям соотношения органического растворителя и водной составляющей подвижной фазы ($RSD t_R$ ибупрофена 9,09). При этом, данные условия не обеспечивают достаточное время удерживания для парацетамола ($k' = 0,29$), что может приводить к недостаточному его разрешению с другими ранозольюруемыми веществами.

Рассчитанные значения $t_{эксп}$ свидетельствуют о возможности использования стационарной фазы AWE-241 для получения равноценных с фазой ODS-2 результатов количественного определения парацетамола и ибупрофена за более короткое время анализа (k' ибупрофена 9,33). При этом, для ибупрофена наблюдается более воспроизводимое время удерживания ($RSD t_R$ ибупрофена 0,26). Одновременно с этим, парацетамол демонстрирует более длительное время удерживания ($k' = 1,67$), за счет реализации π -взаимодействий с 2,4-динитроанилиновым селектором, что обеспечивает возможность более специфичного его определения.

Таблица 49 – Результаты оценки количественного определения парацетамола и ибупрофена по показателю «введено-найдено» для стационарных фаз AWE-241 и ODS-2

	Введено, мг	ODS-2			AWE-241			$t_{эксп}$ ($t_{табл} = 4,3$ $P = 0,95$; $f=n-1=2$)	$t_{эксп}$ ($t_{табл} = 2,57$ $P = 0,95$; $f=n-1=5$)
		$RSD t_R$	k'	Найдено, мг	$RSD t_R$	k'	Найдено, мг		
Парацетамол	0,402	0,02	0,29	0,403	0,05	1,67	0,400	1,47	
	0,161			0,162			0,162		
	0,080			0,083			0,081		
Ибупрофен	0,502	9,09	16,12	0,504	0,26	9,33	0,502	1,73	
	0,201			0,201			0,200		
	0,100			0,100			0,100		
								2,45	

Выводы по главе 3.6

Для исследования возможности получения стабильных достоверных результатов анализа с помощью разработанной стационарной фазы AWE-241 проведена метрологическая оценка ключевых параметров разработанной методики количественного определения действующих веществ двухкомпонентного лекарственного препарата «Ибуклин». В сравнении с коммерчески доступными стационарными фазами, фаза AWE-241 обеспечивает более высокое удерживания для полярных веществ (на примере парацетамола) и оптимальное время удерживания для гидрофобных веществ (ибупрофен) при работе в изократическом режиме элюирования.

Оценены параметры линейности, правильности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, пределы количественного определения и обнаружения.

4. Выводы

1. На основании результатов проведенных исследований установлен подробный систематизированный элюотропный ряд для режима жидкостной хроматографии с параллельно-смещенными стэкинговыми π -взаимодействиями с использованием 1,3-динитробензола как вещества-маркера π -взаимодействий, пиренэтильной стационарной фазы; и подвижной фазы состава *n*-гексан – изопропанол (60:40). Полученные результаты позволяют регулировать силу стэкинговых π -взаимодействий при помощи типа и количества растворителя, что может быть использовано для реализации более высокой селективности в отношении веществ, содержащих ароматическую группу.

2. Протонные (вода и спирты) и алифатические (гексан) растворители 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 небольшом количестве в качестве добавки для управления силой π -взаимодействий и селективностью.

3. С помощью подхода Welch «иммобилизованный гость» исследована способность различных веществ, содержащих ароматическую группу, выступать в качестве селекторов стационарной фазы для реализации π -взаимодействий. В результате эксперимента обнаружено, что наиболее перспективными с данной точки зрения являются ароматические группы, содержащие несколько сильно электроноакцепторных заместителей. Наиболее перспективным из них является моно *N*-алкилзамещенный 2,4-динитроанилин, обеспечивающий реализацию наиболее сильных π -взаимодействий.

4. Получена стационарная фаза AWE-241 на основе силикагеля, содержащая привитый *N*-пропилзамещенный 2,4-динитроанилиновый селектор, для работы в смешанном режиме жидкостной хроматографии с π -взаимодействиями. Процедура получения отличается простотой и дешевизной. Контроль получения стационарной фазы методами ВЭЖХ-УФ, ЯМР-спектроскопии и синхронного термогравиметрического анализа свидетельствуют об успешности получения стационарной фазы.

5. С помощью веществ-маркеров исследована хроматографическая селективность разработанной стационарной фазы для наиболее популярных в ОФ-ВЭЖХ растворителей (CH₃CN, ТГФ, ИПС, MeOH) в сравнении с коммерчески доступными стационарными фазами: C8, C18, фенилгексильной, пентафторфенильной, пиренэтильной. Продемонстрировано, что фаза AWE-241 обеспечивает высокое удерживание и, как результат, обладает высокой селективностью по отношению к веществам, содержащим ароматическую и полярные группы, в особенности электронодефицитным (кофеин, 1,3-динитробензол) или конденсированным (нафталин) ароматическим группам.

6. Показана возможность одновременного селективного определения ароматических веществ различной полярности в изократическом режиме элюирования на примере действующих веществ и их родственных примесей в многокомпонентных лекарственных препаратах («Пенталгин НЕО», «Пенталгин», «Цефекон Н» и «Ибуклин»). При использовании разработанной стационарной фазы достигается более высокое удерживание k' и разрешение R_s полярных компонентов, а также элюция гидрофобных компонентов за более короткое время анализа ($k' < 10$) при работе в изократическом режиме элюирования.

7. Продемонстрирована возможность специфичного определения активных фармацевтических субстанций, содержащих ароматическую группу и полярные функциональные группы ($k' > 1$) в присутствии липофильных компонентов на примере лиофилизированной сыворотки крови при работе в изократическом режиме элюирования. Данная особенность возможна при использовании гидрофобного растворителя, позволяющего реализовать сильные π -взаимодействия, такого как изопропанол или *n*-гексан.

8. Для оценки стабильности стационарной фазы и достоверности получаемых с помощью данной фазы результатов проведена оценка основных метрологических параметров разработанной методики одновременного определения действующих веществ лекарственного препарата «Ибуклин» парацетамол и ибупрофен по показателям: линейность, правильность, прецизионность, определение пределов обнаружения и количественного определения с использованием РМГ-61 2010.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ОФХ (RPLC)	Обращенно-фазовая хроматография
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
АФС	Активная фармацевтическая субстанция
ГЛФ	Готовая лекарственная форма
УФ (UV)	Ультрафиолетовый
C8	Октилсилильная стационарная фаза
C18	Октадецилсилильная стационарная фаза
НФХ	Нормально фазовая хроматография
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography (хроматография гидрофильных взаимодействий)
ИХ	Ионная хроматография
SEC	Size exclusion chromatography (эксклюзионная хроматография)
QNP	Квази-нормально фазовая хроматография
ИПР	Ион-парный реагент
CH ₃ CN	Ацетонитрил
MMC	Mixed-mode chromatography, multimodal chromatography (хроматография смешанных режимов, мультимодальная хроматография)
ИОХ (IEX)	Ионообменная хроматография
NPM	Non-aqueous polar mode (неводный полярный режим хроматографии)
PFP	Pentafluorophenyl (пентафторфенильный)
PYE	Pyrenethyl (пиренэтильный)
ЭАГ	Электроноакцепторная группа
СКФ	Сверхкритическая флюидная хроматография
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ЛС	Лекарственное средство
ТГФ	Тетрагидрофуран
РЕЕК	polyether ether ketone (полиэфир эфир кетон)
PTFE	polytetrafluoroethylene (политетрафторэтилен)
МС	Масс-спектрометрия
PD	Parallel displaced (параллельно смещенный)
НЭП	Неподеленная электронная пара
ЭАГ	Электроноакцепторная группа
НСМО	Низшая свободная молекулярная орбиталь

ВЗМО	Высшая занятая молекулярная орбиталь
МТБЭ	Метил <i>трет</i> -бутиловый эфир
ИПС	Изопропанол
1,3-ДНБ	1,3-Динитробензол
АПТМС	(3-аминопропил)триметоксисилан (АПТМС)
N	Эффективность колонки, число теоретических тарелок
A_s	Коэффициент асимметрии хроматографического пика
k'	Коэффициент удерживания
БЭТ	метод Брунауэра-Эммета-Теллера
БДХ	метод Барретта-Джойнера-Халенды
ЯМР	Спектроскопия ядерного магнитного резонанса
СТА	Синхронный термический анализ
ДТГ	Дифференциальный термогравиметрический анализ
ТГ	Термогравиметрический анализ
Log P	Логарифм коэффициента распределения «октанол-вода»
Log D	Логарифм коэффициента распределения «октанол-вода» с учетом рН среды и pK_a вещества
$S_{r,m}$	Повторяемость
$S_{R,m}$	Внутрилабораторная прецизионность
$t_{\text{эксп}}$	Экспериментально полученное значение коэффициента Стьюдента
$t_{\text{табл}}$	Табличное значение коэффициента Стьюдента
RSD	Относительное среднеквадратическое отклонение
n	Число параллельных измерений
P	Доверительный уровень
ПО	Предел обнаружения
ПКО	Предел количественного определения

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fanali S. Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation / S. Fanali, P.R. Haddad, C. Poole et al. – Amsterdam, Netherlands : Elsevier, 2013. – 520 P. ISBN 978-0124-15807-8.
2. Vitha M.F. Chromatography: principles and instrumentation / M.F. Vitha – Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2017. – 280 P. ISBN 978-1119-27089-8.
3. Moldoveanu S.C. Essentials in Modern HPLC Separations / S.C. Moldoveanu, V. David – Amsterdam, Netherlands : Elsevier, 2022. – 716 P. ISBN 978-0323-91177-1.
4. Hyde A. Chromatographic separation technologies: an overview of the Bioanalysis Zone survey / A. Hyde // Bioanalysis. – 2020. – V. 12. – N 8. – P. 505–508. DOI: 10.4155/bio-2020-0111.
5. Bradley L.R. Food Analysis: High-Performance Liquid Chromatography / eds. by S.S. Nielsen // – Cham, Switzerland : Springer, 2017, – 672 P. ISBN 978-0323-91177-1.
6. Kazakevich Y. HPLC for Pharmaceutical Scientists / Y. Kazakevich, R. LoBrutto Dolan – Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., 2007. – 1136 P. ISBN 978-0-470-08795-4
7. Lunn G. Methods for Pharmaceutical Analysis / G. Lunn, N.R. Schmuff – Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., 1997. – 1609 P. ISBN 978-0-471-18176-7.
8. Ahuja S. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC / S. Ahuja, M. Dong – Cambridge, Massachusetts, USA : Academic Press, 2005. – 600 P. ISBN 978-0120-88547-3.
9. Pragst F. High performance liquid chromatography in forensic toxicological analysis / F. Pragst, eds. by M.J. Bogusz – Amsterdam, Netherlands : Elsevier, 2008. – 1046 P. ISBN 978-0444-52214-6.
10. Bayne S. Forensic Applications of High Performance Liquid Chromatography / S. Bayne, M. Carlin – Boca Raton, Florida, US : – CRC Press, 2010. – 276 P. ISBN 978-1420-09191-5.
11. Moldoveanu S.C. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis / S.C. Moldoveanu, V. David – Amsterdam, Netherlands : Elsevier, 2017. – 588 P. ISBN: 978-0-12-803684-6.
12. Balaban A.T. Aromaticity as a Cornerstone of Heterocyclic Chemistry / A.T. Balaban, D.C. Oniciu, A.R. Katritzky // American Chemical Society. – 2004. – V. 104. – N 5. – P. 2777-2812. DOI: 10.1021/cr0306790.
13. Swartz M. HPLC detectors: a brief review / M. Swartz // Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies s. – 2010. – V. 33. – N 9-12. – P. 1130-1150. DOI: 10.1080/10826076.2010.484356.

14. Снайдер Ллойд Р., Киркленд Джозеф Дж., Долан Джон У. Введение в современную жидкостную хроматографию М.: ТЕХНОСФЕРА, 2020. – 960 с. + 17 с. цв. вкл. ISBN 978-5-94836-600-5.

15. Carr P.W. Contributions to reversed-phase column selectivity. I. Steric interaction / P.W. Carr, J.W. Dolan, U.D. Neue et al. // *Journal of Chromatography A*. – 2011. – V. 1218. – N 13. – P. 1724-1742. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.047.

16. Marchand D.H. Contributions to reversed-phase column selectivity. II. Cation exchange / D.H. Marchand, P.W. Carr, D.V. McCalley et al. // – 2011. – V. 1218. – N 40. – P. 7110-7129. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.07.085.

17. Carr P.W. Contributions to reversed-phase column selectivity: III. Column hydrogen-bond basicity / P.W. Carr, J.W. Dolan, J.G. Dorsey et al. // *Journal of Chromatography A*. – 2015. – V. 1395. – P. 57-64. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.03.044.

18. Rafferty J.L. Retention Mechanism in Reversed-Phase Liquid Chromatography: A Molecular Perspective / J.L. Rafferty, L. Zhang, J.I. Siepmann et al. // *Analytical Chemistry*. – 2007. – V. 79. – N 17. – P. 6551-6558. DOI: 10.1021/ac0705115.

19. Why Is the C18 Column Mostly Used in HPLC? [Электронный ресурс] // Hawach Scientific. – 2025. – Режим доступа: <https://www.hawachhplccolumn.com/news/why-is-c18-column-mostly-used-in-hplc/#:~:text=Conclusion.%20The%20C18%20column%20is%20popular%20in,moderately%20polar%20compounds%20across%20various%20industries%20effectively.>

20. Why C18 Column Is Widely Used in HPLC [Электронный ресурс] // uHPLCs. – 2025. – Режим доступа: <https://uhplcs.com/why-c18-column-is-widely-used-in-hplc/>

21. Israelachvili J.N. Van der Waals Forces in Intermolecular and Surface Forces 3rd ed. / Jacob N. Israelachvili – New York and Burlington, MA, US : Academic Press, 2011. – P. 107–132. ISBN 9780123751829. DOI: 10.1016/B978-0-12-375182-9.10006-5.

22. Auclair J. The Role of Ion Pairing Agents in Liquid Chromatography (LC) Separations / J. Auclair, A.S. Rathore // *LCGC North America*. – 2023. – V. 41. – N 7. – P. 268-273. DOI: 10.56530/lcgc.na.mc8166h1.

23. Dolan J.W. Ion Pairing — Blessing or Curse? / J.W. Dolan // *LCGC Europe*. – 2008. – V. 21. – N 5. – P. 258-263.

24. Gritti F. Retention Loss of Reversed-Phase Columns Using Highly Aqueous Mobile Phases: Fundamentals, Mechanism, and Practical Solutions / F. Gritti, T. Walter // *LCGC North America*. – 2021. – V. 39. – N 1. – P. 33-40. DOI: 10.56530/lcgc.na.zm6986c6.

25. Gritti F. Kinetic mechanism of water dewetting from hydrophobic stationary phases utilized in liquid chromatography / F. Gritti, D. Brousmiche, M. Gilar, T.H. Walter, K. Wyndham // *Journal of Chromatography A*. – 2019. – V. 1956. – P. 41-53. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.02.051.
26. Przybyciel M. Phase Collapse in Reversed-Phase Liquid Chromatography / M. Przybyciel, R.E. Majors // *LCGC North America*. – 2002. – V. 20. – N 6. – P. 516-523.
27. O'Sullivan G.P Polar-Embedded and Polar-Endcapped Stationary Phases for LC / G.P. O'Sullivan, N.M. Scully, J.D. Glennon // *Analytical Letters*. – 2014. – V. 43. – N 10-11. – P. 1609-1629. DOI: 10.1080/00032711003653973.
28. O'Gara J.E. Embedded-Polar-Group Bonded Phases for High Performance Liquid Chromatography / J.E. O'Gara, D.P. Walsh, C.H. Phoebe et al. // *LCGC*. – 2001. – V. 19. – N 6. – P. 632-642.
29. Kadlecová Z. How ligand and particle types affect retention and separation of structurally diverse biologically active compounds in HPLC / Z. Kadlecová, K. Kalíková // *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*. – 2021. – V. 152. – N 9. – P. 1081-1088. DOI: 10.1007/s00706-021-02807-6.
30. Layne J. Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases / J. Layne // *Journal of Chromatography A*. – 2002. – V. 957. – P. 149-164. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00193-0.
31. Rimmer C.A. Shape selectivity in embedded polar group stationary phases for liquid chromatography / C.A. Rimmer, L.C. Sander // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2009. – V. 394. – P. 285-291. DOI: 10.1007/s00216-009-2649-4.
32. Liu X. Development of a polar-embedded stationary phase with unique properties / X. Liu, A. Bordunov, M. Tracy et al. // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – V. 1119. – P. 120-127. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.12.097.
33. Wang P.G. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications / P.G. Wang, W. He – Boca Raton, Florida, US : – CRC Press, 2017. – 616 P. ISBN 978-1138-11339-8.
34. Kumar A. Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography / A. Kumar, J.C. Heaton, D.V. McCalley // *Journal of Chromatography A*. – 2013. – V. 1276. – P. 33-46. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.037.
35. Wan Q. Mixed-Mode Chromatography: Principles, Methods, and Applications / Q. Wan – Singapore : Springer, 2021. – 495 P. ISBN 978-981-16-5485-5.

36. Lämmerhofer M. Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes / M. Lämmerhofer, M. Richter, J. Wu et al. // *Journal of Separation Science*. – 2008. – V. 31. – N 14. – P. 2572-2588. DOI: 10.1002/jssc.200800178.

37. Lämmerhofer M. Multi-modal applicability of a reversed-phase/weak-anion exchange material in reversed-phase, anion-exchange, ion-exclusion, hydrophilic interaction and hydrophobic interaction chromatography modes / M. Lämmerhofer, R. Nogueira, W. Lindner // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2011. – V. 400. – N 8. – P. 2517-2530. DOI: 10.1007/s00216-011-4755-3.

38. Lemasson E. Characterization of Retention Mechanisms in Mixed-Mode HPLC with a Bimodal Reversed-Phase/Cation-Exchange Stationary Phase / E. Lemasson, Y. Richer, S. Bertin // *Chromatographia*. – 2018. – V. 81. – N 3. – P. 387-399. DOI: 10.1007/s10337-018-3477-5.

39. Mansour F.R. Multimodal liquid chromatography of small molecules / F.R. Mansour, N.D. Danielson // *Analytical methods*. – 2013. – V. 5. – N 19. – P. 4955. DOI: 10.1039/c3ay40302e.

40. Kennedy L.A. Multimodal liquid chromatography columns for the separation of proteins in either the anion-exchange or hydrophobic-interaction mode / L.A. Kennedy, W. Kopaciewicz, F.E. Regnier // *Journal of Chromatography A*. – 1986. – V. 359. – P. 73-84. DOI: 10.1016/0021-9673(86)80063-2.

41. Bischoff R. Nucleic acid resolution by mixed-mode chromatography / R. Bischoff, L.W. McLaughlin // *Journal of Chromatography A*. – 1984. – V. 296. – P. 329-337. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)96427-1.

42. Halfpenny A.P. Mixed mode chromatography via column switching for the simultaneous HPLC analysis of ionic and non-ionic nucleic acid constituents / A.P. Halfpenny, P.R. Brown // *Chromatographia*. – 1986. – V. 21 – N 6. – P. 317-320. DOI: 10.1007/BF02311602.

43. Zhang K. Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications / K. Zhang, X. Liu // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2016. – V. 128. – P. 73-88. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.05.007.

44. Acclaim Trinity P1 Column Product Manual [Электронный ресурс] // Thermo Scientific. – 2025. – Режим доступа: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Man-065306-Acclaim-Trinity-P1-Man065306-EN.pdf>

45. Acclaim Trinity P2 Column Product Manual [Электронный ресурс] // Thermo Scientific. – 2025. – Режим доступа: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-065561-Acclaim-Trinity-P2-Column-Man065561-EN.pdf>

46. Пат. US9314712B2 США, B01D15/325. Functionalized substrates with ion-exchange properties / Liu X., Pohl C.A., Chen J., Woodruff L.A., заявитель и патентообладатель Dionex Corporation, Калифорния; 19.04.2016, Appl. №.: 12/118,447. – 42 с.

47. Пат. US9310344B2 США, G01N30/482. HILIC/anion-exchange/cation-exchange multimodal media / Liu X., Pohl C.A., Chen J., заявитель и патентообладатель Dionex Corporation, Калифорния; 12.04.2016, Appl. №.: 13/918,481. – 45 с.

48. Penner N.A. Investigation of the properties of hypercrosslinked polystyrene as a stationary phase for high-performance liquid chromatography / N.A. Penner, R.N. Nesterenko, M.M. Plyin et al. // *Chromatographia*. – 1999. – V. 50. – N 9-10. – P. 611-620. DOI: 10.1007/bf02493669.

49. Davankov V.A. Hypercrosslinked polystyrene as a novel type of high-performance liquid chromatography column packing material / V.A. Davankov, C.S. Sychov, M.M. Plyin et al. // *Journal of Chromatography A*. – 2003. – V. 987. – N 1-2. – P. 67-75. DOI: 10.1016/s0021-9673(02)01914-3.

50. Sychov C.S. Elucidation of retention mechanisms on hypercrosslinked polystyrene used as column packing material for high-performance liquid chromatography / C.S. Sychov, M.M. Plyin, V.A. Davankov et al. // *Journal of Chromatography A*. – 2004, . – V. 1030. – N 1-2. – P. 17-24. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.10.098.

51. Prokopov S.V. Quasi-normal phase chromatography of nitrogen-containing adamantane derivatives / S.V. Prokopov, E.V. Tyrina, V.A. Davankov, et al. // *Physical Chemistry of Separation Processes: Chromatography*. – 2013. – V. 87. – N 1. – P. 114-119. DOI: 10.1134/s0036024413010184.

52. Сычев К.С. Применение сверхсшитого полистирола в высокоэффективной жидкостной хроматографии и твердофазной экстракции : Дис. ... канд. хим. наук : 05.11.11 : Москва, 2004 142 с.

53. COSMOSIL NPE [Электронный ресурс] // Nacalai Tesque Inc. – 2025. – Режим доступа: <https://www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/index/07.html>

54. COSMOSIL μ NAP [Электронный ресурс] // Nacalai Tesque Inc. – 2025. – Режим доступа: <https://www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/index/05.html>

55. COSMOSIL PBr [Электронный ресурс] // Nacalai Tesque Inc. – 2025. – Режим доступа: <https://www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/index/PBr.html>

56. COSMOSIL PYE [Электронный ресурс] // Nacalai Tesque Inc. – 2025. – Режим доступа: <https://www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/index/06.html>

57. Kiseleva M.G. Phenylaminopropyl silica – a new specific stationary phase for high-performance liquid chromatography of phenols / M.G. Kiseleva, P.N. Nesterenko // *Journal of Chromatography A*. – 2000. – V. 898. – P. 23–34. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00872-4.

58. Verzele M. Anthracene Silica Gel, a New Polycyclic-Aromatic-Bonded Stationary Phase / M. Verzele, N. Van de Velde // *Chromatographia*. – 1985. – V. 20. – N 4. – P. 239–241. DOI: 10.1007/BF02259695.

59. Yu Q.-W. Preparation of pyrenebutyric acid bonded silica stationary phases for the application to the separation of fullerenes / Q.-W. Yu, B. Lin, H.-B. He // *Journal of Chromatography A*. – 2005. – V. 1083. – N 1–2. – P. 23–31. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.104.

60. Lochmüller C.H. Organization and distribution of molecules chemically bound to silica / C.H. Lochmüller, A.S. Colborn, M.L. Hunnicutt // *Analytical Chemistry*. – 1983. – V. 55. – N 8. – P. 1344–1348. DOI: 10.1021/ac00259a036.

61. Félix G. HPLC on pentafluorobenzamidopropyl silica gel / G. Félix, C. Bertrand // *Journal of High Resolution Chromatography*. – 1985. – V. 8. – N 7. – P. 362–363. DOI: 10.1002/jhrc.1240080709.

62. Félix G. Separation of polyaromatic hydrocarbons on caffeine-bonded silica gel / G. Félix, C. Bertrand // *Journal of Chromatography A*. – 1985. – V. 319. – P. 432–435. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)90585-0.

63. Félix G. A new caffeine bonded phase for separation of polyaromatic hydrocarbons and petroleum asphaltene by high-performance liquid chromatography / G. Félix, C. Bertrand, F. Van Castel // *Chromatographia*. – V. 20. – N 3. – P. 155–160. DOI: 10.1007/bf02262704.

64. Jadaud P. Retention of polycyclic aromatic hydrocarbons on an improved tetrachlorophthalimidopropyl silica / P. Jadaud, M. Caude, R. Rosset // *Journal of Chromatography A*. – 1987. – V. 393. – N 1. – P. 39–49. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)94202-5.

65. Nondek L. Liquid chromatography on chemically bonded electron donors and acceptors / L. Nondek // *Journal of Chromatography A*. – 1986. – V. 373. – P. 61–80. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)80208-3.

66. Holstein W. Donor-Acceptor Complex Chromatography (DACC) Part II. Review of Papers / W. Holstein, H. Hemetsberger // *Chromatographia*. – 1982. – V. 15. – N 4. – P. 251–257. DOI: 10.1007/bf02265658.

67. Holstein W. Donator-Acceptor Komplex Chromatographie Tetrachlorphthalimidopropylsilica, eine neue, chemisch gebundene Phase, geeignet zur Trennung von Kohleverflüssigungsprodukten und anderen technischen aromatischen Gemischen mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie / Holstein W. // *Chromatographia*. – 1981. – V. 14. – N 8. – P. 468–477. DOI: 10.1007/BF02263537.

68. Lochmüller C.H. Photoacoustic spectroscopy of chemically bonded chromatographic stationary phases / C.H. Lochmüller, S.F. Marshall, D.R. Wilder // *Analytical Chemistry*. – 1980. – V. 52. – N 1. – P. 19–23. DOI: 10.1021/ac50051a006.

69. Marshall A. Synthesis of silica-immobilized 8-quinolinol with (aminophenyl)trimethoxysilane / A. Marshall, H.A. Mottola // *Analytical Chemistry*. – 1983. – V. 55. – N 13. – P. 2089–2093. DOI: 10.1021/ac00263a019.

70. Kuroda N. Preparation and Characterization of Modified 3-Aminopropylsilyl Silica Phases with 1,8-Naphthalic Anhydrides in HPLC / N Kuroda, A. Sako, K. Ohyama et al // *Journal of Chromatographic Science*. – 2005. – V. 43. – N 3. – P. 116. DOI: 10.1093/chromsci/43.3.116.

71. Yamada Y. Molecular-shape selectivity by naphthalimido-modified silica stationary phases: Insight into the substituents effect of naphthalene on shape recognition and π - π interactions via electrostatic potential / Y. Yamada, K. Ohyama, G. Onodera et al // *Journal of Chromatography A*. – 2015. – V. 1425. – P. 173-179. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.11.030.

72. Gros. Q. Characterization of stationary phases in supercritical fluid chromatography including exploration of shape selectivity / Q. Gros, J. Molineau, A. Noireau et al. // *Journal of Chromatography A*. – 2021. – V. 1639. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.461923.

73. West C. A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography / C. West, E. Lesellier // *Journal of Chromatography A*. – 2008. – V. 1191. – N 1-2. – P. 21-39. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.02.108.

74. Ashu-Arrah B.A. Synthesis, characterisation and chromatographic evaluation of pentafluorophenyl and phenyl bonded silica phases prepared using supercritical carbon dioxide as a reaction solvent / B.A Ashu-Arrah, J. D. Glennon, K. Albert // *Journal of Chromatography A*. – 2013. – V. 1273. – P. 34-43. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.11.041.

75. West C. An attempt to estimate ionic interactions with phenyl and pentafluorophenyl stationary phases in supercritical fluid chromatography / C. West, E. Lemasson, S. Khater et al. // *Journal of Chromatography A*. – 2015. – V. 1412, – P. 126-138. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.009

76. McClain R. Design, synthesis and evaluation of stationary phases for improved achiral supercritical fluid chromatography separations / R. McClain, M.H. Hyun, Y. Li et al // *Journal of Chromatography A*. – 2013. – V. 1302. – P. 163-173. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.06.038.

77. Fu Q. Supercritical fluid chromatography based on reversed-phase/ion chromatography mixed-mode stationary phase for separation of spirooxindole alkaloids / Q. Fu, W. Dong, D. Ge // *Journal of Chromatography A*. – 2023. – V. 1705. – P. 461-463. DOI: 10.1016/j.chroma.2023.464163.

78. West C. An attempt to estimate ionic interactions with phenyl and pentafluorophenyl stationary phases in supercritical fluid chromatography / C. West, E. Lemasson, S. Khater et al. // *Journal of Chromatography A*. – 2015. – V. 1412, – P. 126-138. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.009

79. West C. Characterization of Novel Polymer-Based Pyridine Stationary Phases for Supercritical Fluid Chromatography / C. West, E. Lemasson, K. Nagai et al. // *Chromatographia*. – 2019. – V. 82. – P. 143-152. DOI: 10.1007/s10337-018-3598-x.

80. West C. Current trends in supercritical fluid chromatography / C. West // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2018. – V. 410. – P. 6441–6457. DOI: 10.1007/s00216-018-1267-4.

81. Francotte E.R. Practical Aspects and Applications of Preparative Supercritical Fluid Chromatography in book: *Supercritical Fluid Chromatography* / E.R. Francotte, ed. C.F. Poole – Amsterdam, Netherlands : Elsevier, 2017. – P. 275-316. ISBN 978012809207.

82. Aral H. Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography / H. Aral, K.S. Çelik, R. Altındağ et al. // *Talanta*. – 2017. – V. 174. – P. 703–714. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.07.014.

83. Aral T. Synthesis of a mixed-model stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: HILIC and reversed-phase applications / T. Aral, H. Aral, B. Ziyadanoğulları et al. // *Talanta*. – 2015. – V. 131. – P. 64–73. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.07.060.

84. Aral H. HPLC Separation of Different Groups of Small Polar Compounds on a Novel Amide-Embedded Stationary Phase / H. Aral, T. Aral, K.S. Çelik et al. // *Chromatographia*. – 2014. – V. 77. – N 11-12. – P. 771-781. DOI: 10.1007/s10337-014-2678-9.

85. Ferreira C. de C. Synthesis and evaluation of a pentafluorobenzamide stationary phase for HPLC separations in the reversed phase and hydrophilic interaction modes /

C. de C. Ferreira M.R.G. Sato, G.S. da Silva // *Journal of Separation Science*. – 2018. – V. 41. – N 20. – P. 3855-3862. DOI: 10.1002/jssc.201800522.

86. Mallik A.K. Facile preparation of embedded polar group-containing pentafluorophenyl stationary phases for highly selective separations of diverse analytes / A.K. Mallik, L. Montero, S.W. Meckelmann et al. // *Journal of Chromatography A*. – 2024. – V. 1717. DOI: 10.1016/j.chroma.2024.464688.

87. Matsumoto K. Heterocyclic Supramolecules II [Text] / K. Matsumoto, N. Hayashi // *Topics in Heterocyclic Chemistry*. — Springer, 2009. - Vol. 18. – P. 1-36.

88. Shurig V. The Reciprocal Principle of Selectand-Selector-Systems in Supramolecular Chromatography / V. Shurig // *Molecules*. – 2016. – V. 21. – N 11. – P. 1–35. DOI: 10.3390/molecules21111535.

89. Nondek L. Liquid chromatography of aromatic hydrocarbons on a chemically bonded stationary phase of the charge-transfer type / L. Nondek, J. Málek // *Journal of Chromatography A*. – 1978. – V. 155. – N 1. – P. 187–190. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)83949-7.

90. Ghosh P. Prediction of Chromatographic Retention Times for Aromatic Hydrocarbons / P. Ghosh, B. Chawla, P.V. Joshi, S.B. Jaffe // *Energy & Fuels*. – 2006. – V. 20. – N. 2. – P. 609–619. DOI: 10.1021/ef0502305

91. Putman J.C. Dual-Column Aromatic Ring Class Separation with Improved Universal Detection across Mobile-Phase Gradients via Eluate Dilution / J.C. Putman, S.M. Rowland, D.C. Podgorski et al // *Energy & Fuels*. – V. 31. – N 11. – P. 12064–12071. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.7b02589.

92. Ayres J.T. Column Chromatography with a Polynitrostyrene Resin Stationary Phase / Ayres J.T., C.K. Mann // *Analytical Chemistry*. – 1964. – V. 36. – N 11. – P. 2185–2186. DOI: 10.1021/ac60217a003.

93. Smets G. Formation de Complexes Moleculaires sur hauts Polymeres / G. Smets, V. Balogh, Y. Castrill // *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*. – 1964. – V. 4. – N 2. – P. 1467–1480. DOI: 10.1002/polc.5070040257.

94. Welch K.J. HPLC with electron-acceptor groups bonded to mercaptopropyl silica / K.J. Welch, N.E. Hoffman // *Journal of High Resolution Chromatography*. – 1986. – V. 9 – N 7. – P. 417–419. DOI: 10.1002/jhrc.1240090714.

95. Klaar H. Donor-acceptor complex chromatography preparation of a chemically bonded acceptor-ligand and its chromatographic investigation / H. Klaar, H. Hemetsberger, H. Ricken // *Chromatographia*. – 1980. – V. 13. – P. 277–286. DOI: 10.1007/BF02265642.

96. Lochmüller C.H. High-performance liquid chromatographic behavior of some chemically bonded nitroaromatic type stationary phases / C.H. Lochmüller, R.R. Ryall, C.W. Amoss // *Journal of Chromatography A*. – 1979. – V. 178. – N 1. – P. 298-301. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)89719-8.

97. PrincetonSFC DNP (Dinitrophenyl) 100Å [Электронный ресурс] // Princeton Chromatography Inc. – 2025. – Режим доступа: <https://psi-hplc.com/collections/products/products/dnp-dinitrophenyl?variant=29692693151804>

98. Chromegabond LC Columns [Электронный ресурс] // MZ-Analysentechnik. – 2026. – Режим доступа: <https://uvison.com/chromatography-supplies/perkinelmer/perkinelmer-consumables/perkinelmer-chromegabond-dnap-ii-lc-columns-250-mm-10-mm-i.d.-5-um-157221-dnap-ii>

99. SUMIPAX DI-NO2 SG-05 series [Электронный ресурс] // Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.. – 2026. – Режим доступа: <https://www.scas.co.jp/en/instruments-products/hplc-column/sumipax-series/sumipax-di-no2-sg-05.html>

100. Schürig V. Differentiation of enantiomers, Part I [Text] / V. Schürig (Eds.) // *Topic in Current Chemistry*. – Springer, 2014. – V. 340. – 280 P. ISBN 978-3-319-03238-2.

101. Tan X. Preparation of a new chiral stationary phase for HPLC based on the (R)- 1-phenyl-2-(4-methylphenyl)ethylamine amide derivative of (S)-valine and 2-chloro-3,5-dinitrobenzoic acid: Enantioseparation of amino acid derivatives and pyrethroid insecticides / X. Tan, S. Hou, J. Jiang et al. // *Journal of Separation Science*. – 2007. – V. 30. – N 12. – P. 1888-1892. DOI: 10.1002/jssc.200600497.

102. Tan X. Synthesis of novel chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. / X. Tan, S.C. Hou, Q.H. Bian et al. // *Chinese Chemical Letters*. – 2007. – V. 18. – N 4. – P. 461-464. DOI: 10.1016/j.ccllet.2007.02.010.

103. Malyshev O.R. Convenient synthesis of π -acceptor chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography from halogen-substituted 3,5-dinitrobenzoylamides / O.R. Malyshev, M. G. Vinogradov // *Journal of Chromatography A*. – V. 859. – N 2. – P. 143-151. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00871-7.

104. Welch C.J. Evolution of chiral stationary phase design in the Pirkle laboratories / C.J. Welch // *Journal of Chromatography A*. – 1994. – V. 666. – N 1-2. – P. 3-26. DOI: 10.1016/0021-9673(94)80367-6.

105. Mikeš F. Resolution of optical isomers by high-performance liquid chromatography: A comparison of two selector-selectand systems / F. Mikeš, G. Boshart // *Journal of Chromatography A*. – 1978. – V. 149. – P. 455-464. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)81004-3.

106. Mikeš F. Resolution of optical isomers by high-performance liquid chromatography, using coated and bonded chiral charge-transfer complexing agents as stationary phases / F. Mikeš, G. Boshart, E. Gil-Av // *Journal of Chromatography A*. – 1976. – V. 122. – P. 205-221. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)82245-1.

107. Nepali K. Nitro Group Containing Drugs / K. Nepali, H.-Y. Lee, J.-P. Liou // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – V. 62. – N 6. – P. 2851-2893. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00147.

108. Rudakov O.B. Acetonitrile as Top Solvent for Liquid Chromatography and Extraction / O.B. Rudakov, L.V. Rudakova, V.F. Selemenev // *Journal of Analytical Chromatography and Spectroscopy*. – 2023. – V. 6. – P. 1-19. DOI: 10.24294/jacs.v6i1.883.

109. Yang M. Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π - π interactions with a reversed-phase phenyl column / M. Yang, S. Fazio, D. Munch et al // *Journal of Chromatography A*. – 2005. – V. 1097. – P. 124-129. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.08.028.

110. Croes K. Relevance of π - π and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography / K. Croes, A. Steffens, D. Marchand et al. // *Journal of Chromatography A*. – 2005. – V. 1098. – N 1-2. – P. 123-130. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.08.090.

111. Stevenson P.G. Effects of π - π Interactions on the Separation / P.G. Stevenson, S. Kayillo, G.R. Dennis et al. // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2008. – V. 31. – P. 324-347. DOI: 10.1080/10826070701780607.

112. Gamez P. The anion- π interaction: naissance and establishment of a peculiar supramolecular bond / P. Gamez // *Inorganic Chemistry Frontiers*. – 2014. – V. 1. – N 1. – P. 35-43. DOI: 10.1039/C3QI00055A.

113. Jandera P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review / P. Jandera // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – V. 692. – P. 1-25. DOI: 10.1016/j.aca.2011.02.047.

114. Lupo S., Carrol F. Method Development and Column Selection: How the FluoroPhenyl Phase Provides the Power of HILIC and Reversed-Phase Modes in One Column [Электронный ресурс] / RESTEK Pure Chromatography. – 2025. – Режим доступа: <https://www.restek.com/en/technical-literature-library/articles/method-development-and-column-selection-how-the-fluorophenyl-phase-provides-the-power-of-HILIC-and-reversed-phase-modes-in-one-column/>

115. Šmídová B. The pentafluorophenyl stationary phase shows a unique separation efficiency for performing fast chromatography determination of high bush blueberry anthocyanins

/ B. Šmídová, D. Šatinský, K. Dostálová, P. Solich // *Talanta*. – 2017. – V. 166. – P. 249–254. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.01.061.

116. Richheimer S.L. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method using a pentafluorophenyl bonded phase for analysis of tocopherols / S.L. Richheimer, M.C. Kent, M.W. Bernart // *Journal of Chromatography A*. – 1994. – V. 677. – P. 75-80. DOI: 10.1016/0021-9673(94)80546-6.

117. Grebenstein N. Rapid baseline-separation of all eight tocopherols and tocotrienols by reversed-phase liquid-chromatography with a solid-core pentafluorophenyl column and their sensitive quantification in plasma and liver / N. Grebenstein, J. Frank // *Journal of Chromatography A*. – 2012. – V. 1243. – P. 39-46. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.04.042.

118. Brindle R. Stationary phases with chemically bonded fluorine ligands: A new approach for environmental analysis of π -electron containing solutes / R. Brindle, K. Albert, // *Journal of Chromatography A*. – 1997. – V. 757. – P. 3-20. DOI: 10.1016/S0021-9673(96)00682-6.

119. Zhang Y. A versatile polar-embedded polyphenyl phase for multimodal separation in liquid chromatography / Y. Zhanga, Q. Li, B. Dai et al // *Journal of Chromatography A*. – 2018. – V 3553. – pp. 81-89. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.04.025.

120. Needham S. The high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry analysis of diverse basic pharmaceuticals on cyanopropyl and pentafluorophenylpropyl stationary phases / S. Needham, P. Brown // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2000. – V. 23. – P. 597-605. DOI: 10.1016/s0731-7085(00)00348-4.

121. Cervinkova B. Rapid determination of lipophilic vitamins in human serum by ultra-high performance liquid chromatography using a fluorinated column and high-throughput miniaturized liquid-liquid extraction / B. Cervinkova, L.K. Krcmova, S. Klabackova et al. // *Journal of Separation Science*. – 2017. – V. 40. – P. 3375-3382. DOI: 10.1002/jssc.201700492.

122. Stevenson P.G. Effects of π - π interactions on the separation of PAHs on phenyl-type stationary phases / P.G. Stevenson, S. Kayillo, G.R. Dennis et al. // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2008. – V. 31. – P. 324-347. DOI: 10.1080/10826070701780607.

123. Yang M. Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π - π interactions with a reversed-phase phenyl column / M. Yang, S. Fazio, D. Munch // *Journal of Chromatography A*. – 2005. – V. 1097. – P. 124-129.

124. Li R. Hydrophilic interaction chromatography separation mechanisms of tetracyclines on amino-bonded silica column: *Liquid Chromatography* / R. Li, Y. Zhang,

C.C. Lee et al. // *Journal of Separation Science*. – 2011. – V. 34. – P. 1508-1516. DOI: 10.1002/jssc.201100130.

125. Сычев К.С. Применение сверхсшитого полистирола в высокоэффективной жидкостной хроматографии и твердофазной экстракции : Дис. ... канд. хим. наук : 05.11.11 : Москва, 2004 142 с.

126. Steed J.W. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry* / J.W. Steed, D.R. Turner, K.J. Wallace – West Sussex, England : Wiley, 2007. – 297 P. – ISBN 978-0-470-85866-0.

127. Knowles R.R. Attractive noncovalent interactions in asymmetric catalysis: Links between enzymes and small molecule catalysts / R.R Knowles, E. Jacobsen // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – V. 107. – N 48. – P. 20678–20685. DOI: 10.1073/pnas.1006402107.

128. Metrangolo P. *Halogen Bonding in Supramolecular Chemistry* / P. Metrangolo, F. Meyer, T. Pilati et al. // *Angewandte Chemie International Edition in English*. – 2008. – V. 47 – N 33. – P. 6114-6127. DOI: 10.1002/anie.200800128.

129. Headen T.F. Structure of π - π Interactions in Aromatic Liquids / T.F. Headen, C.A. Howard, N.T. Skipper et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – V. 132. – N 16. – P. 5735-5742. DOI: 10.1021/ja909084e.

130. Jin M.Y. Engineered non-covalent π interactions as key elements for chiral recognition / M.Y. Jin, Q. Zhen, D. Xiao // *Nature Communications*. – 2022. – V. 13. – P. 3276-3284. DOI: 10.1038/s41467-022-31026-8.

131. Janiak C. A critical account on π -stacking in metal complexes with aromatic nitrogen-containing ligands / C. Janiak // *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. – 2000. – V. 21. – P. 3885–3896. DOI: 10.1039/b003010o.

132. Hunter C.A. The nature of π - π interactions / C.A. Hunter, J.K.M. Sanders, // *Journal of the American Chemical Society*. – 1990. – V. 112. – P. 5525–5534. DOI: 10.1021/ja00170a016.

133. Dwivedi P.C. Electron Donor-Acceptor Complexes of Some Aromatic Hydrocarbons with Chlorosubstituted Quinones / P.C. Dwivedi, R. Agarwal // *Indian Journal of Chemistry*. – 1985. – V. 24A. – P. 1015-1017.

134. Sinnokrot M.O. Unexpected Substituent Effects in Face-to-Face π -Stacking Interactions / M.O. Sinnokrot, C.D. Sherrill // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2003. – V. 107. – N 41. – P. 8377–8379.

135. Hunter C.A. Arene—Arene Interactions: Electrostatic or Charge Transfer? / C.A. Hunter // *Angewandte Chemie International Edition in English*. – 1993. – V. 32. – P. 1584-1586.

136. Cozzi F. Interaction between stacked aryl group in 1,8-diarylnaphtalenes: Dominance of polar/ π over charge-transfer effects / F. Cozzi, J. S. Siegel // *Pure and Applied Chemistry*. – 1995. – V. 67. – N 5. – P. 683-689.

137. Cozzi F. Dominance of polar/ π over charge-transfer effects in stacked phenyl interactions / F. Cozzi, M. Cinquini, R. Annuziata et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1993. – V. 115. – N 12. – P. 5330–5331. DOI: 10.1021/ja00065a069.

138. Ferguson S.B. Cyclophane-arene inclusion complexation in protic solvents: solvent effects versus electron donor-acceptor interactions / S.B. Ferguson, E. M. Sanford, E. M Seward et al // *Journal of the American Chemical Society*. – 1991. – V. 113. – N 14. – P. 5410–5419. DOI: 10.1021/ja00014a037.

139. Hunter C.A. Meldola Lecture. The role of aromatic interactions in molecular recognition / C.A. Hunter // *Chemical Society Reviews*. – 1994. – V. 23. – N 2. – P. 101-109. DOI: 10.1039/cs994230010.

140. Nishio M. The CH/ π hydrogen bond in chemistr. Conformation, supramolecules, optical resolution and interactions involving carbohydrates / M. Nishio // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2011. – V. 13. – P. 13873–13900. DOI: 10.1039/c1cp20404a.

141. Curtiss L.A. Studies of molecular association in H₂O and D₂O vapors by measurement of thermal conductivity / L.A. Curtiss, D.J. Frurip, M.J. Blander // *The Journal of Chemical Physics*. – 1979. – V. 71. – N 6. – P. 2703-2711. DOI: 10.1063/1.438628.

142. Tsuzuki S. Origin of the Attraction and Directionality of the NH/ π Interaction: Comparison with OH/ π and CH/ π Interactions / S. Tsuzuki, K. Honda, T. Uchimaru // *Journal of the American Chemical Society*. – 2000. – V. 122. – N 46. – P. 11450-11458. DOI: 10.1021/ja001901a.

143. Tsuzuki S. Effects of the higher electron correlation correction on the calculated intermolecular interaction energies of benzene and naphthalene dimers: comparison between MP2 and CCSD(T) calculations / S. Tsuzuki, T. Uchimaru, K. Matsumura et al. // *Chemical Physics Letters*. – 2000. – V. 319. – N 5-6. – P. 547–554. DOI: 10.1016/s0009-2614(00)00170-6.

144. Tsuzuki, S. Effects of basis set and electron correlation on the calculated interaction energies of hydrogen bonding complexes: MP2/cc-pV5Z calculations of H₂O–MeOH, H₂O–Me₂O, H₂O–H₂CO, MeOH–MeOH, and HCOOH–HCOOH complexes / S. Tsuzuki, T. Uchimaru,

K. Matsumura et al. // *The Journal of Chemical Physics*. – 1999. – V. 110. – N 24. – P. 11906–11910.

145. Tsuzuki S. High-level ab initio computations of structures and relative energies of two isomers of the CO₂ trimer / S. Tsuzuki, W. Klopper, H.P. Luthi // *The Journal of Chemical Physics*. – 1999. – V. 111. – N 9. – P. 3846–3854. DOI: 10.1063/1.479688.

146. Tsuzuki S. Intermolecular interaction potential of the carbon dioxide dimer / S. Tsuzuki, T. Uchimaru, M. Mikami et al. // *The Journal of Chemical Physics*. – 1998. – V. 109. – N 6. – P. 2169–2175. DOI: 10.1063/1.476730.

147. Kodama Y. Attractive interaction between aliphatic and aromatic systems / Y. Kodama, K. Nishihata, M. Nishio et al. // *Tetrahedron Letters*. – 1977. – V. 18. – N 24. – P. 2105–2108. DOI: 10.1016/s0040-4039(01)83692-3.

148. Malone J.F. X-H^{•••}π (phenyl) interactions. Theoretical and crystallographic observations / J.F. Malone, C.M. Murray, M.H. Charlton // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. – 1997. – V. 93. – N 19. – P. 3429–3436. DOI: 10.1039/a700669a.

149. Gung, B.W. Conformational Study of 1,5-Hexadiene and 1,5-Diene-3,4-diols / B.W. Gung, Z. Zhu, R.A. Fouch // *Journal of the American Chemical Society*. – 1995. – V. 117. – N 6. – P. 1783–1788. DOI: 10.1021/ja00111a016.

150. Manojkumar T.K. p-Benzoquinone-benzene clusters as potential nanomechanical devices: A theoretical study / T.K. Manojkumar, H.S. Choi, B.H. Hong // *The Journal of Chemical Physic*. – 2004. – V. 121. – N 2. – P. 841–846. DOI: 10.1063/1.1760745.

151. Sinnokrot M.O. Highly Accurate Coupled Cluster Potential Energy Curves for the Benzene Dimer: Sandwich, T-Shaped, and Parallel-Displaced Configurations / M.O. Sinnokrot, C.D. Sherrill // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2004. – V. 108. – N 46. – P. 10200–10207. DOI: 10.1021/jp0469517.

152. Hirota M. Intramolecular CH–π interaction. Substituent effect as a probe for hydrogen bond-like character / M. Hirota, K. Sakaibara, H. Suezawa et al. // *Journal of Physical Organic Chemistry*. – 2000. – V. 13. – N 10. – P. 620–623. [https://doi.org/10.1002/1099-1395\(200010\)13:10<620::AID-POC262>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1099-1395(200010)13:10<620::AID-POC262>3.0.CO;2-F).

153. Tsuzuki S. High-Level ab Initio Calculations of Interaction Energies of C₂H₄–CH₄ and C₂H₆–CH₄ Dimers: A Model Study of CH/π Interaction / S. Tsuzuki, K. Honda, T. Uchimaru // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 1999. – V. 103. – N 41. – P. 8265–8271. DOI: 10.1021/jp9909309.

154. Prause M. Rechnergestützte Führung von Fermentationsprozessen, Teil 2 / M. Prause, H.-J. Schulz, D. Wagler // *Acta Biotechnologica*. – 1984. – V. 4. – N 2. – P. 143–151.

155. Dall'Acqua W. A Mutational Analysis of Binding Interactions in an Antigen–Antibody Protein–Protein Complex / W. Dall'Acqua, E.R. Goldman, W. Lin et al. // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37. – N 22. – P. 7981–7991. DOI: 10.1021/bi980148j.

156. Tsuzuki S. Nature and physical origin of CH/ π interaction: significant difference from conventional hydrogen bonds / S. Tsuzuki, A. Fujii // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2008. – V. 10. – N 19. – P 2584-2594. DOI: 10.1039/b718656h.

157. Hao H. Energy Decomposition Analysis Reveals the Nature of Lone Pair– π Interactions with Cationic π Systems in Catalytic Acyl Transfer Reactions / H. Hao, X. Qi, W. Tang et al. // *Organic Letters*. – 2021. – V. 23. – N 11. – P. 4411–4414. DOI: 10.1021/acs.orglett.1c01351.

158. Mooibroek T.J. Lone pair– π interactions: a new supramolecular bond? / T.J. Mooibroek, P. Gamez, J. Reedijk // *CrystEngComm*. – 2008. – V. 10. – N 11. – P. 1501-1515.

159. Egli M Lone Pair–Aromatic Interactions: To Stabilize or Not to Stabilize / M. Egli, S. Sarkhel // *Accounts of Chemical Research*. – 2007. – V. – N 3. – P. 197–205.

160. Novotný J. Lone-pair– π interactions: analysis of the physical origin and biological implications / J. Novotný, S. Bazzi, R. Marek et al. // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2016. – V. 18. – P. 19472-19481.

161. Kalra K. Occurrence and stability of lone pair– π and OH– π interactions between water and nucleobases in functional RNAs / K. Kalra, S. Gorle, L. Cavall et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2020. – V. 48. – N 11. – P. 5825–5838. DOI: 10.1093/nar/gkaa345.

162. Ma J.C. The Cation– π Interaction / J.C. Ma, D.A. Dougherty // *Chemical Reviews*. – 1997. – V. 97. – P. 1303–1324. DOI: 10.1021/cr9603744.

163. Frontera A. Putting Anion– π Interactions Into Perspective / A. Frontera, P. Gamez, M. Mascal // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2011. – V. 50. – N 41. – P. 9564-9583. DOI: 10.1002/anie.201100208.

164. Dougherty D.A. The Cation– π Interaction / D.A. Dougherty // *Accounts of Chemical Research*. – 2012. – V. 46. – N 4. – P. 885–893. DOI: 10.1021/ar300265y.

165. Kim D. Cation– π Interactions: A Theoretical Investigation of the Interaction of Metallic and Organic Cations with Alkenes, Arenes, and Heteroarenes / D. Kim, S. Hu, P. Tarakeshwar et al. // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2003. – V. 107. – N 8. – P. 1228–1238. DOI: 10.1021/jp0224214.

166. Ruan C. Cation– π Interactions: Structures and Energetics of Complexation of Na⁺ and K⁺ with the Aromatic Amino Acids, Phenylalanine, Tyrosine, and Tryptophan / C. Ruan, M.T.

Rodgers // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – V. 126. – N 44. – P. 14600–14610. <https://doi.org/10.1021/ja048297e>.

167. Mascal M. Anion–Aromatic Bonding: A Case for Anion Recognition by π -Acidic Rings / M. Mascal, A. Armstrong, M.D. Bartberger // *Journal of the American Chemical Society*. – 2002. – V. 124. – N 22. – P. 6274–6276. DOI: 10.1021/ja017449s.

168. Raymo F.M. Origins of Selectivity in Molecular and Supramolecular Entities: Solvent and Electrostatic Control of the Translational Isomerism in [2]Catenanes / F.M. Raymo, K.N. Houk, J.F. Stoddart // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1998. – V. 63. – N 19. – P. 6523–6528.

169. Quiñero D. Anion- π Interactions: do they exist? / D. Quiñero, C. Garau, C. Rotger et al. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2002. – V. 41. – N18. – P. 3389–3392.

170. Mooibroek T. J Anion–arene and lone pair–arene interactions are directional / T.J. Mooibroek, P. Gamez // *CrystEngComm*. – 2012. – V. 14. – N 3. – P. 1027–1030. DOI: 10.1039/c1ce05946g.

171. Mooibroek T.J. Directional character of solvent- and anion-pentafluorophenyl supramolecular interactions / T.J. Mooibroek, P. Gamez // *CrystEngComm*. – 2012. – V. 14. – N 11. – P. 3902–3906. DOI: 10.1039/c2ce25192b.

172. Schottel B.L. Anion- π interactions / B.L. Schottel, H.T. Chifotides, K. Dunbar // *Chemical Society Review*. – 2008. – V. 37. – N 1. – P. 68–83. DOI: 10.1039/b614208g.

173. Kim D. Theoretical Investigations of Anion– π Interactions: The Role of Anions and the Nature of π Systems / D. Kim, P. Tarakeshwar, K.S. Kim // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2004. – V. 108. – N 7. – P. 1250–1258. DOI: 10.1021/jp037631a.

174. Garau C. Dual Binding Mode of s-Triazine to Anions and Cations / C. Garau, D. Quinero, A. Frontera et al. // *Organic Letters*. – 2003. – V. 5. – N 13. – P. 2227–2229. DOI: 10.1021/ol034650u.

175. Ahuja R. Non-bonding interactions of anions with nitrogen heterocycles and phenyl rings: a critical Cambridge Structural Database analysis / R. Ahuja, A.G. Samuelson // *CrystEngComm*. – 2003. – V. 5. – N 69. – P. 395–399. DOI: 10.1039/b311000a.

176. Ma N. Structural Competition between Halogen Bonds and Lone-Pair \cdots p Interactions in Solution / N. Ma, Y. Zhang, B. Ji // *ChemPhysChem*. – 2012. – V. 13. – N 6. – P. 1411–1414. DOI: 10.1002/cphc.201101004.

177. Kellett C.W. π -Covalency in the halogen bond / C.W. Kellett, P. Kennepohl, C.P. Berlinguette // *Nature Communications*. – 2020. – V. 11. – N 1. – P. 1-8. DOI: 10.1038/s41467-020-17122-7.

178. Novotný J. Lone-pair–p interactions: analysis of the physical origin and biological implications / J. Novotný, S. Bazzi, R. Marek // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2016. – V. 18. – P. 19472-19481. DOI: 10.1039/c6cp01524g.

179. Пат. US3722181A США, B01J20/283 P. Chromatographic packing with chemically bonded organic stationary phases / Kirkland J., Yates P., заявитель и патентообладатель E.I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington; 27.03.1973, Appl. №.: 39,665. – 18 с.

180. Stenutz [Электронный ресурс] // Stenutz. – 2025. – Режим доступа: <https://www.stenutz.eu/chem/solv6.php?name=caffeine>

181. Садэк, П. Растворители для ВЭЖХ / П. Садэк, Пер. с англ. А.А. Горбатенко и Е.И. Ревинной. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 704 с. : ил. – (Методы в химии). ISBN 5-94774-371-X.

182. Welch C.J. Evolution of chiral stationary phase design in the Pirkle laboratories / C.J. Welch // *Journal of Chromatography A*. – 1994. – V. 666. – N 1–2. – P. 3–26. DOI: 10.1016/j.cej.2021.129428.

183. Luna C18(2) HPLC Columns [Электронный ресурс] // Phenomenex. – 2025. – Режим доступа: <https://www.phenomenex.com/products/luna-hplc-column/luna-c18-2#documents>

184. Unger K.K. Porous silica. Its properties and use as support in column liquid chromatography / Unger K.K. – Amsterdam, Netherlands : Elsevier, 1979. – 315 P. ISBN 0-444-41683.

185. Gritti F. Effect of the density of the C18 surface coverage on the adsorption mechanism of a cationic compound and on the silanol activity of the stationary phase in reversed phase liquid chromatography / F. Gritti, G. Guiochon // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – V. 1132. – P. 51–66. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.07.002.

186. Engelhardt H. Reversed Phase Chromatography – the Mystery of Surface Silanols / H. Engelhardt, Ch. Blay, J. Saar // *Chromatographia*. – V. 62. – P. 19-29. DOI: 10.1365/s10337-005-0573-0.

187. Nucleophilic Aromatic Substitution (NAS) [Электронный ресурс] // *Master Organic Chemistry*. – 2025. – Режим доступа: <https://www.masterorganicchemistry.com/2018/08/20/nucleophilic-aromatic-substitution-nas/>

188. Ross S.D. Rates, Products and Salt Effects in the Reactions of 2,4-Dinitrochlorobenzene with / S.D. Ross, M. Finkelstein // Journal of the American Chemical Society. – 1957. – V. 79. – N. 24. – P. 6547-6554. DOI: 10.1021/ja01581a052.

189. Alvaro C.E.S. Reaction of 2,4-Dinitrochlorobenzene with Aromatic Amines in Toluene: Effect of Nucleophile Structure / C.E.S. Alvaro, M.C. Savini, V. Nicotra // Molecules. – 2000. – V. 5. – N 3. – P. 401-402. DOI: 10.3390/50300401.

190. Nudelman N. S. Reaction of 2,4-dinitrochlorobenzene with aniline. Solvent effects and molecular complex formation / N.S. Nudelman, M. Savini, C.E.S. Alvaro et al // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2. – V. 8. – P. 1627–1630. DOI: 10.1039/a903559a.

191. Wahab M. F. Fundamental and Practical Insights on the Packing of Modern High-Efficiency Analytical and Capillary Columns / M.F. Wahab, D.C. Patel, R.M. Wimalasinghe et al // Analytical Chemistry. – 2017. – V. 89. – N 16. – P. 8177–8191. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00931.

192. Rogers S.D. Chromatographic silanol activity test procedures: the quest for a universal test / S.D. Rogers, J.G. Dorsey // Journal of Chromatography A. – 2000. – V. 892. – P. 57–65. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00722-6.

193. McHale C. A simple approach for reversed phase column comparisons via the Tanaka test / C. McHale, A. Soliven, S. Schuster // Microchemical Journal. – 2021. – V. 162. – P. 1-7. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105793.

194. Caffeine [Электронный ресурс] // Stenutz. – 2025. – Режим доступа: <https://www.stenutz.eu/chem/solv6.php?name=caffeine>

195. Oanca G. Universal and specific interactions in caffeine diluted solutions / Gabriel Oanca, D. Creanga, C. Nadejde // Rev. Roum. Chim. – 2015. – V. 60. – N 11-12. – P. 1073-1077.

196. 1,3-Dinitrobenzene [Электронный ресурс] // Stenutz. – 2025. – Режим доступа: <https://www.stenutz.eu/chem/solv6.php?name=1,3-dinitrobenzene>

197. 1,2-Dimethylbenzene [Электронный ресурс] // Stenutz. – 2025. – Режим доступа: <https://www.stenutz.eu/chem/solv6.php?name=1,2-dimethylbenzene>

198. Naphthalene [Электронный ресурс] // Stenutz. – 2025. – Режим доступа: [https://www.stenutz.eu/chem/solv6%20\(2\).php?name=naphthalene](https://www.stenutz.eu/chem/solv6%20(2).php?name=naphthalene)

199. LogD Predictor [Электронный ресурс] // ChemAxon. – 2025. – Режим доступа: <https://plugins.calculators.cxn.io/logd/>

200. Waters Spherisorb® Columns [Электронный ресурс] // Waters. – 2025. – Режим доступа: [https://www.hplc.eu/Downloads/Spherisorb_Columns\(1\).pdf](https://www.hplc.eu/Downloads/Spherisorb_Columns(1).pdf)

201. Luna HPLC Columns [Электронный ресурс] // Phenomenex. – 2025. – Режим доступа: <https://www.phenomenex.com/products/luna-hplc-column?srsltid=AfmBOoqDP4Hwy9Ix5B2tUIvygvoo3OpMht6xHHXVVA82OD3vz6bwLQkc>
202. A proven and reliable portfolio of totally porous HPLC columns [Электронный ресурс] // Agilent Infinity Lab. – 2025. – Режим доступа: <https://www.elementlabsolutions.com/media/amasty/amfile/attach/DA7QOhuYiF5BOfcFRFKrOIOi9O8rMkqe.pdf>
203. Cosmosil Cosmocore Technical Notes [Электронный ресурс] // COSMOSIL. – 2025. – Режим доступа: https://www.hplc.eu/Downloads/COSMOSIL_Technical_Notes.pdf
204. Gu C. Determination of Progestin Residues in Fish by UPLC-Q-TOF/MS Coupled with QuEChERS / C. Gu, Y. Cheng, X. Zhen et al. // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. – 2019. – P. 1–6. DOI: 10.1155/2019/6426958.
205. Jahan S. A Study of Method Development, Validation, and Forced Degradation for Simultaneous Quantification of Paracetamol and Ibuprofen in Pharmaceutical Dosage Form by RP-HPLC Method / S. Jahan, J. Islam, R. Begum et al. // *Anal Chem Insights*. – 2014. – V. 9. – N 1. – P. 75–81. DOI: 10.4137/ACI.S18651.
206. Ibuprofen & Paracetamol Assay | Phenomenex [сайт]. Phenomenex.com. 2025 [обновлено 12 октября 2025; процитировано 12 октября 2025]. Доступно: https://www.phenomenex.com/documents/2022/05/20/18/52/ibuprofen-and-paracetamol-tablets-assay-and-related-substances-method-as-per-ip-monograph?srsltid=AfmBOortAOJUcM_tTMPVorKGNDkAIDs_djuGRQupuPPJgS8ny_Jfs5vI
207. Balan P. Validated RP-HPLC Method for Estimation of Dexibuprofen and Paracetamol in Combined Tablet Dosage Form / P. Balan, I.C. Nimila, V.R. Movva // *International Journal of PharmTech Research*. – 2018. – V. 3. – N 3. – P. 1293-1298.
208. Alsaad A.A.A. The Simultaneous Determination of Ibuprofen and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations by High-performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection / A.A.A. Alsaad, E.A.S. Alassadi, H.N.K. Al-Salman // *Asian Journal of Pharmaceutics*. – 2019. – V. 13. – N 2. – P. 141-152.
209. Makwana S. Development and validation of a stability indicating RP-UPLC method for the determination of paracetamol and ibuprofen in tablet / S. Makwana, M. Patel, B. Singh et al. // *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. – 2015. – V. 7. – N 4. – P. 1308-1315.
210. Lakka N.S. Development and validation of a RP-HPLC for simultaneous determination of Ibuprofen and Paracetamol in solid dosage forms: Application to dissolution studies / N.S. Lakka, N. Goswami, P. Balakrishna // – 2011. – V. 2. – N 3. P. 331-337.

211. Tsvetkova B.G. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of Paracetamol and Ibuprofen in fixed dose combinations / B.G. Tsvetkova, I.P. Pencheva, A.B. Zlatkov // International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. – 2012. – V. 16. – N. 1. – P. 13-16.

212. Borahan T. A rapid and sensitive Reversed Phase-HPLC method for simultaneous determination of ibuprofen and paracetamol in drug samples and their behaviors in simulated gastric conditions / T. Borahan, T. Unutkan, A. Şahin et al. // Journal of Separation Science. – 2018. – P. 1-6. DOI: 10.1002/jssc.201801002.

213. РМГ-61 2010 Рекомендации по межгосударственной стандартизации. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки : дата введения 2012-09-01. – Москва : Стандартинформ, 2010. – 59 с.

214. The LCGC Blog: HPLC Diagnostic Skills-Noisy Baselines [Электронный ресурс] // LCGC International. – 2026. – Режим доступа: <https://www.chromatographyonline.com/view/lcgc-blog-hplc-diagnostic-skills-noisy-baselines>

215. S/N P2P vs ASTM, which aligns best to USP? [Электронный ресурс] // Agilent. – 2026. – Режим доступа: <https://community.agilent.com/technical/software/f/forum/5931/s-n-p2p-vs-astm-which-aligns-best-to-usp>

216. Signal-to-Noise Calculation in OpenLab ChemStation [Электронный ресурс] // Agilent. – 2026. – Режим доступа: <https://community.agilent.com/knowledge/chromatography-software-portal/kmp/chromatography-software-articles/kp1032.signal-to-noise-calculation-in-openlab-chemstation>

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Результаты проверки работы коробки градиент-дозировующих клапанов жидкостного хроматографа

Таблица А.1 – Условия тестирования коробки градиент-дозировующих клапанов (gradient-proportioning valve (GPV) test)

подвижная фаза:	раствор ацетона в воде 1 %/вода
скорость потока:	3 мл/мин
длина волны:	265 нм

Таблица А.2 – Программа работы каналов (gradient-proportioning valve (GPV) test)

Время, мин	Канал, %			
	А (раствор ацетона в воде 1 %)	В (вода)	С (раствор ацетона в воде 1 %)	Д (вода)
0.00	50	0	0	50
2.00	50	0	0	50
2.01	90	10	0	0
4.00	90	10	0	0
4.01	50	0	0	50
6.00	50	0	0	50
6.01	90	0	10	0
8.00	90	0	10	0
8.01	50	0	0	50
10.00	50	0	0	50
10.01	0	0	10	90
12.00	0	0	10	90
12.01	50	0	0	50
14.00	50	0	0	50
14.01	0	10	0	90
16.00	0	10	0	90
16.01	50	0	0	50
18.00	50	0	0	50

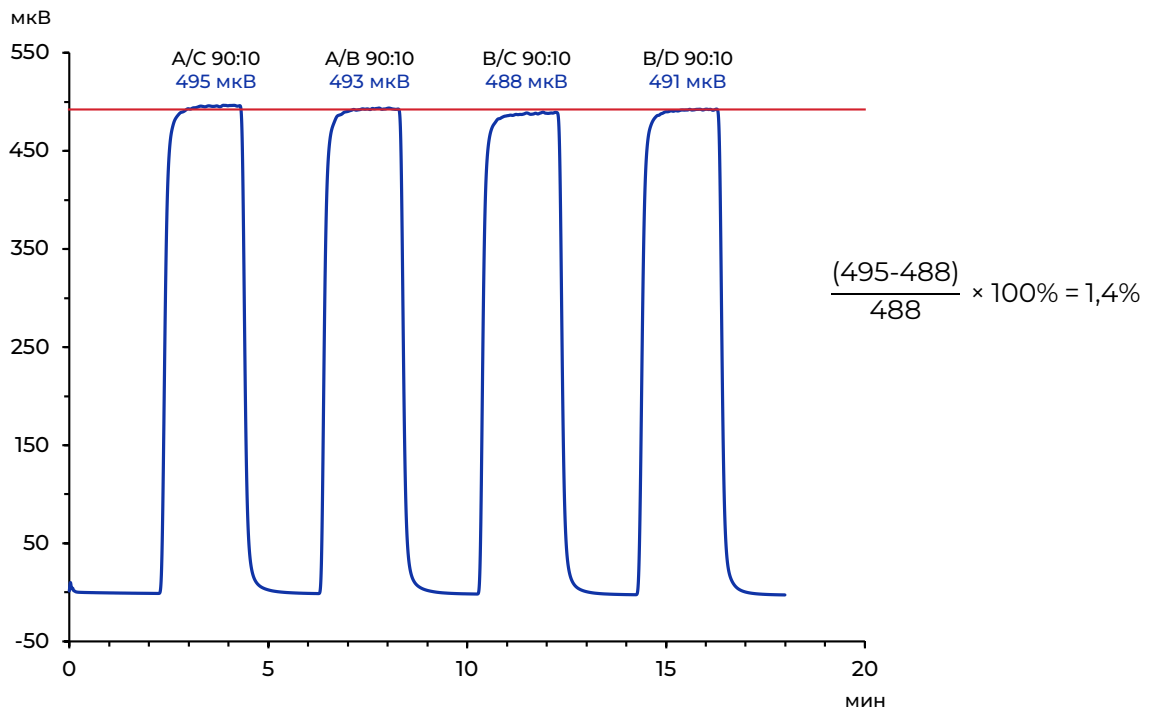


Рисунок А.1 – Результат проверки работы коробки градиент дозирующих клапанов жидкостного хроматографа (gradient-proportioning valve (GPV) test) [14]

Таблица А.3 – Условия тестирования коробки градиент -дозировочных клапанов (gradient step-test)

подвижная фаза:	раствор ацетона в воде 1 %/вода
скорость потока:	2 мл/мин
длина волны:	265 нм

Таблица А.4 – Программа работы каналов (gradient step-test, каналы А/С)

Время, мин	Канал, %	
	А (вода)	С (раствор ацетона в воде 1 %)
0.00	100	0
2.00	100	0
2.01	90	10
4.00	90	10
4.01	80	20
6.00	80	20
6.01	70	30
8.00	70	30
8.01	60	40
10.00	60	40
10.01	55	45
12.00	55	45
12.01	50	50
14.00	50	50
14.01	45	55
16.00	45	55
16.01	40	60
18.00	40	60
18.01	30	70
20.00	30	70
20.01	20	80
22.00	20	80
22.01	10	90
24.00	10	90
24.01	0	100
26.00	0	100

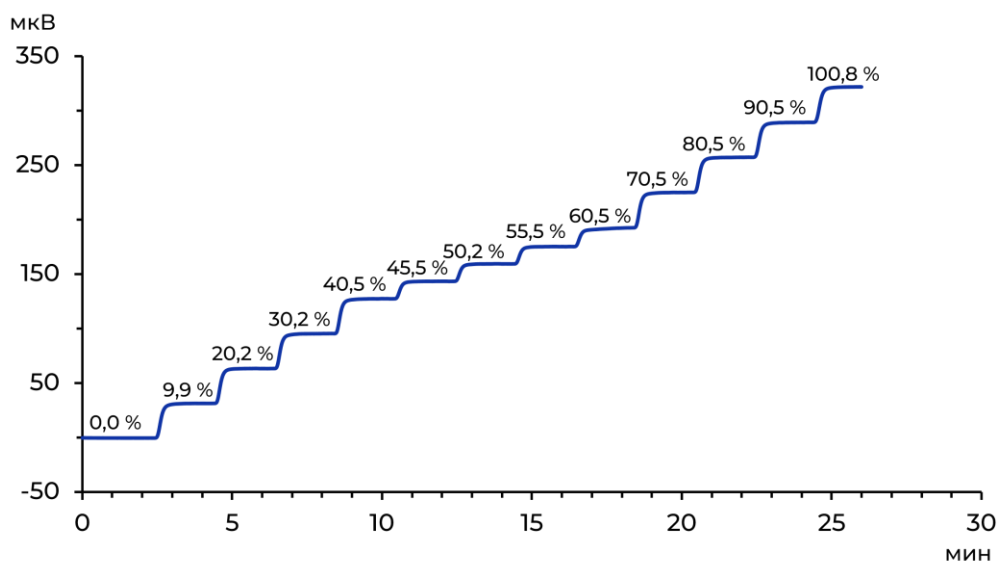


Рисунок А.2 – Результат проверки работы каналов А/С коробки градиент дозирующих клапанов жидкостного хроматографа (gradient step-test) [14]

Таблица А.5 – Программа работы каналов (gradient step-test, каналы В/D)

Время, мин	Канал, %	
	В (вода)	D (раствор ацетона в воде 1 %)
0.00	100	0
2.00	100	0
2.01	90	10
4.00	90	10
4.01	80	20
6.00	80	20
6.01	70	30
8.00	70	30
8.01	60	40
10.00	60	40
10.01	55	45
12.00	55	45
12.01	50	50
14.00	50	50
14.01	45	55
16.00	45	55
16.01	40	60
18.00	40	60
18.01	30	70
20.00	30	70
20.01	20	80
22.00	20	80
22.01	10	90
24.00	10	90
24.01	0	100
26.00	0	100

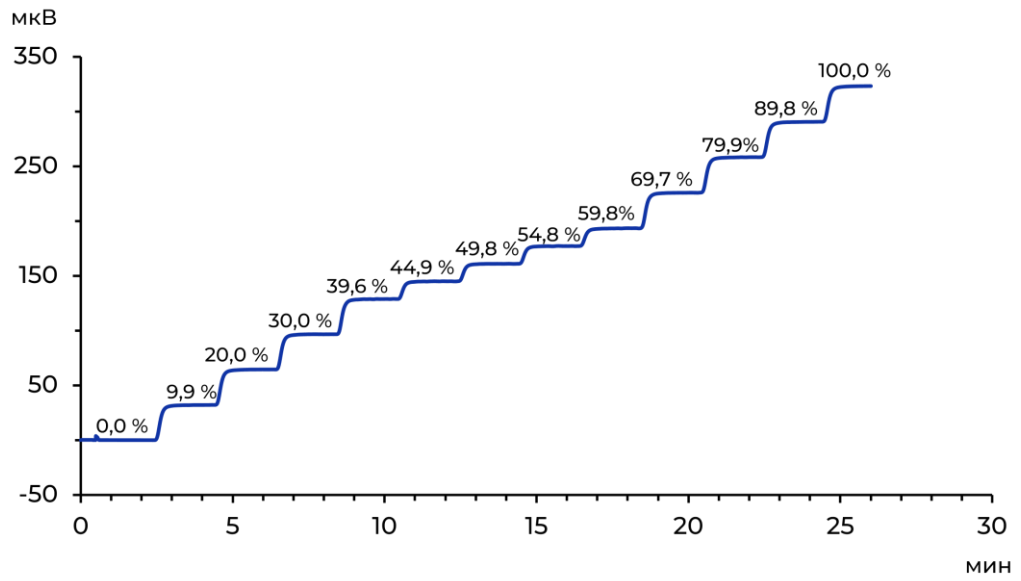


Рисунок А.3 – Результат проверки работы каналов В/Д коробки градиент дозирующих клапанов жидкостного хроматографа (gradient step-test) [14]

Приложение Б

Графики зависимости коэффициента удерживания k' 1,3-ДНБ от количества замещенного начального состава изопропанол – *n*-гексан (40:60)

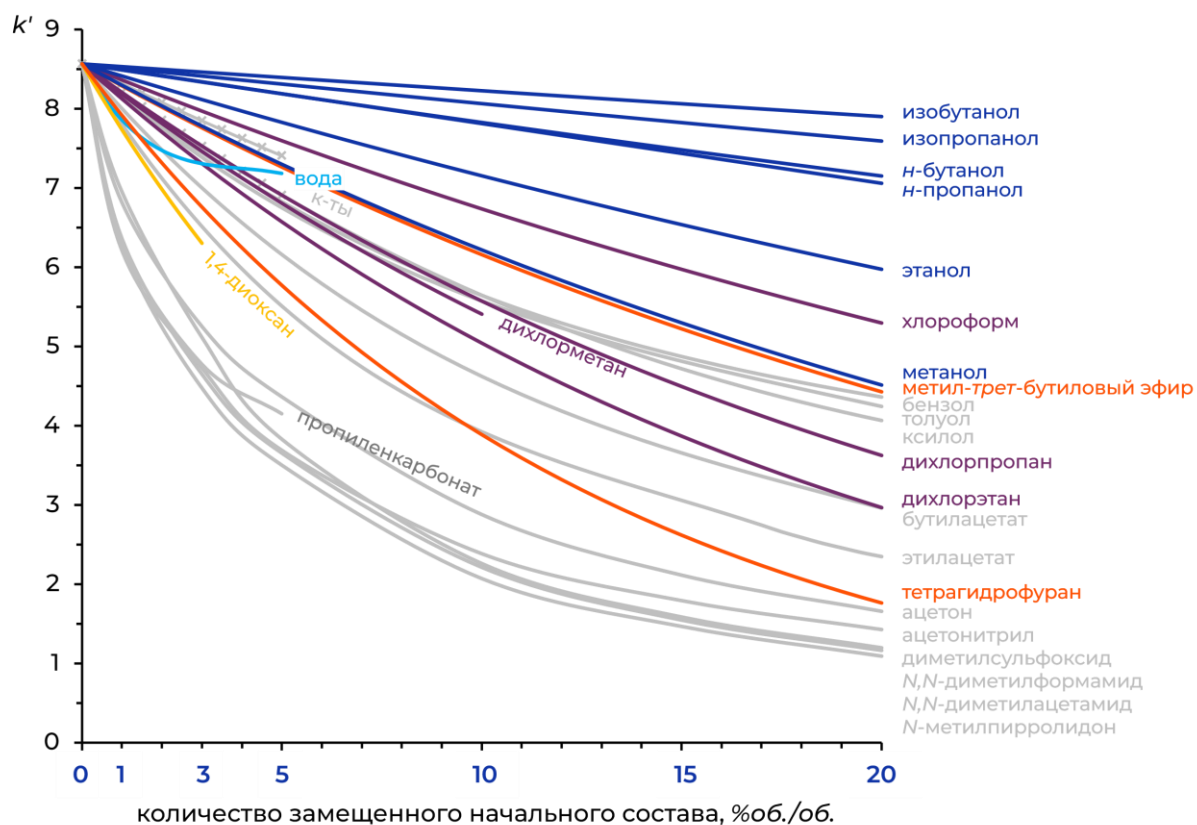


Рисунок Б.1 – График зависимости коэффициента удерживания k' 1,3-ДНБ от объема (об./об.) замещенного начального состава изопропанол – *n*-гексан (40:60)

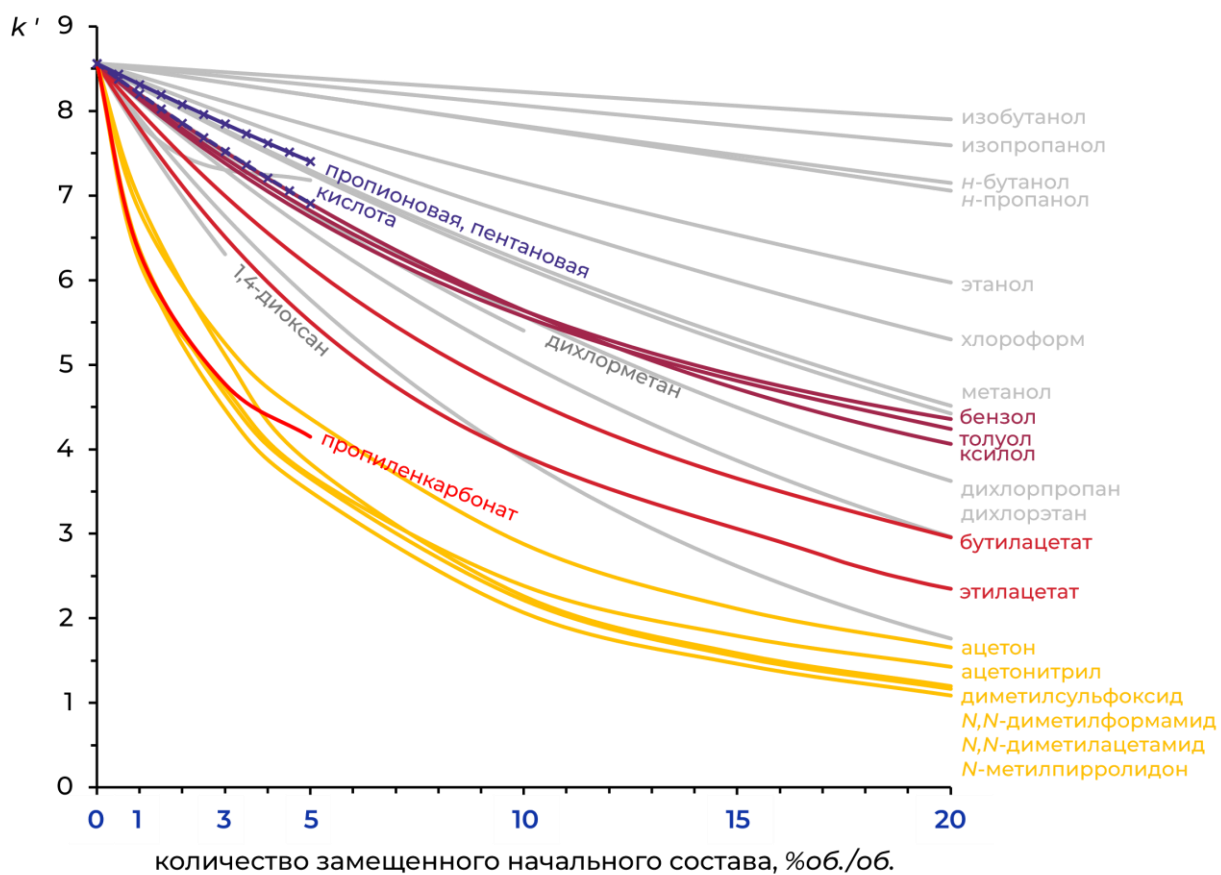


Рисунок Б.2 – График зависимости коэффициента удерживания k' 1,3-ДНБ от объема (об./об.) замещенного начального состава изопропанол – *n*-гексан (40:60)

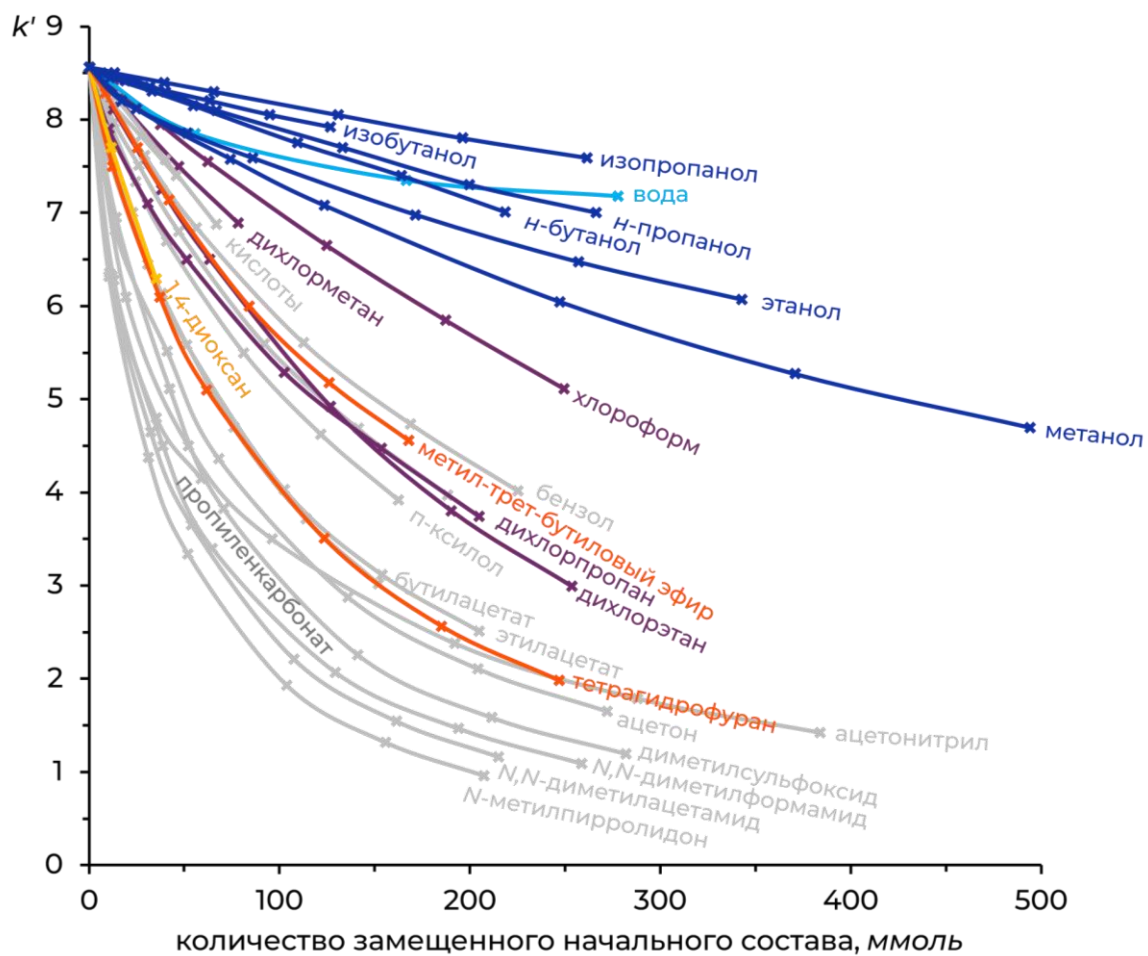


Рисунок Б.3 – График зависимости коэффициента удерживания k' 1,3-ДНБ от количества (ммоль) замещенного начального состава *n*-гексан – изопропанол (60:40)

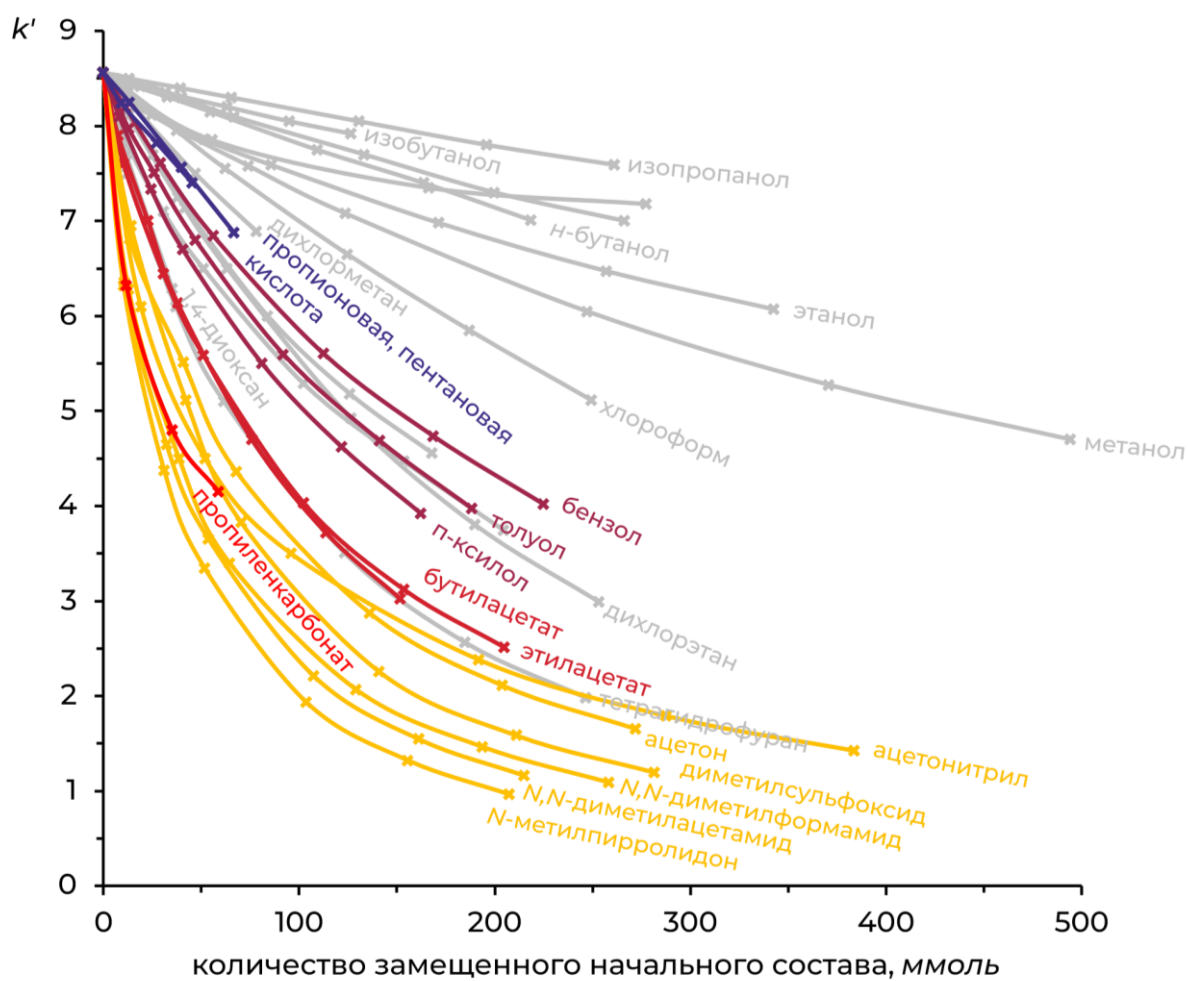


Рисунок Б.4 – График зависимости коэффициента удерживания k' 1,3-ДНБ от количества (ммоль) замещенного начального состава n -гексан – изопропанол (60:40)

Приложение В

Физико-химические свойства растворителей, исследованных для установления элюотропного ряда

Таблица В.1 – Физико-химические свойства растворителей, исследованных для установления элюотропного ряда для режима жидкостной хроматографии с параллельно-смещенными стэкинговыми π -взаимодействиями

№	Растворитель	Тип	Mw, г/моль	ρ , г/см ³	Дипольный момент, D	ε (диэл. прон.)	Граница УФ-пропус- кания, нм	Показатель преломления	Вязкость, сП	Температура кипения, °С	Нормализованная селективность			R'
											α	β	π	
1	Ацетонитрил	Высоко- полярные	41,05	0,79	3,44	37,50	190	1,34	0,38	82	0,15	0,25	0,60	5,8
2	Диметилсульфоксид		78,13	1,10	3,96	46,83	265	1,48	2,24	189	0	0,43	0,57	7,2
3	N,N-Диметилформамид		73,09	0,94	3,82	36,70	270	1,43	0,92	153	0	0,44	0,56	6,4
4	N,N-Диметилацетамид		87,12	0,94	3,72	37,80	268	1,44	2,14	165	-	-	-	6,5
5	Ацетон		58,08	0,79	2,69	20,70	330	1,36	0,36	56	0,06	0,38	0,56	5,1
6	N-Метилпирролидон		59,07	1,16	4,09	32,20	285	1,47	1,67	202	—	—	—	—
7	Пропиленкарбонат		102,09	1,20	4,94	64,90	220	1,42	2,50	242	—	—	—	—
8	Бензол	Арома- тические	78,11	0,88	0,00	2,30	278	1,50	0,60	80	0,14	0,86	0,00	2,7
9	Толуол		92,14	0,87	0,31	2,40	284	1,50	0,59	111	0,17	0,83	0,00	2,4
10	Ксилол		106,16	0,86	0,00	2,30	288	1,50	—	138	—	—	—	—
11	Хлороформ	Галоген- алканы	119,38	1,49	1,15	4,80	245	1,45	0,57	61	0,43	0,00	0,57	4,1
12	Дихлорметан		84,90	1,33	1,60	8,90	233	1,42	0,44	40	0,27	0,00	0,73	3,1
13	Дихлорэтан		98,96	1,25	1,83	10,40	225	1,44	0,79	84	0	0,00	1,00	3,5
14	Дихлорпропан		112,98	1,16	1,85	8,93	—	1,44	—	96	—	—	—	—
15	Этилацетат	Сложные эфирь	88,11	0,90	1,88	6,40	256	1,37	0,45	77	0	0,45	0,55	4,4
16	Бутилацетат		116,16	0,88	1,86	5,07	254	1,39	0,74	126	—	—	—	—
17	Пентановая кислота	Кислоты	102,13	0,94	1,61	6,20	—	1,41	—	185	0,54	0,15	0,31	6,0
18	Пропионовая кислота		74,08	0,99	1,76	3,10	—	1,39	—	141	—	—	—	—
19	Тетрагидрофуран	Простые эфирь	72,11	0,89	1,75	7,60	212	1,41	0,55	66	0,00	0,49	0,51	4,0
20	Диоксан		88,11	1,03	0,45	2,21	215	1,42	1,37	101	0,00	0,40	0,60	4,8
21	Метил трет-бутиловый эфир		88,15	0,74	1,32	4,50	210	1,37	0,27	55	0,00	≈0,6	≈0,4	≈2,4
22	Изобутанол	Протонные	92,5	0,802	1,79	16,68	—	1,396	3,96	108	—	—	—	—
23	n-Бутанол		74,12	0,81	1,68	7,80	215	1,40	2,98	118	—	—	—	—
24	Изопропанол		60,09	0,79	1,66	19,90	205	1,38	2,40	82	0,22	0,35	0,43	3,9
25	n-Пропанол		60,10	0,80	1,65	21,80	210	1,39	2,30	97	—	—	—	—
26	Этанол		46,07	0,79	1,66	25,30	210	1,36	1,10	78	0,39	0,36	0,25	4,3
27	Метанол		32,04	0,79	1,70	32,70	205	1,33	0,55	65	0,43	0,29	0,28	5,1
28	Вода		18,02	1,00	1,85	80,00	190	1,33	1,00	100	0,43	0,18	0,45	10,2
29	Гексан	Алифа- тические	86,18	0,65	0,00	1,90	195	1,38	0,31	69	0	0,00	0,00	0,1
30	Гептан		100,21	0,68	0,00	1,92	200	1,39	0,40	98	0	0,00	0,00	0,1

Приложение Г

**Результаты входного контроля 1-хлор-2,4-динитробензола, использованного
для получения модифицирующего реактива «АВЕ-241»**

Таблица Г.1 – Хроматографические условия оценки хроматографической чистоты 1-хлор-2,4-динитро-бензола методом ГХ-МС

Способ инжектирования:	Автоматический дозатор
Объем инъекции:	0,5 мкл
Температура инжектора:	310 °С
Деление потока:	1 : 40
Колонка:	НР-5ms 30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм
Газ-носитель:	Гелий
Поток газа-носителя через колонку:	1,5 мл/мин
Время регистрации масс-спектров:	1,0 – 42,0 мин
Температура ионного источника :	+ 200 °С
Температура интерфейса:	+ 250 °С
Напряжение на ионном источнике:	0,82 кВ
Тип ионизации:	EI
Режим регистрации:	Сканирующий, постоянная времени 0,2 с
Диапазон сканирования:	35 – 650 кДа

Таблица Г.2 – Градиентная программа температуры термостата

№	Скорость нагрева, °С/мин	Температура, °С	Время выдержки, мин
1	–	40,0	0
2	10,0	190,0	0
3	5,0	300,0	5,0

Таблица Г.3 – Идентификация и содержание примесей, определенные методом ГХ-МС

Время, мин	Площадь	Площадь, %	Предполагаемое соединение	Вероятность совпадения, %
11,32	121386	0,09	<i>бензол, 1,2-дихлор-3-нитро-</i>	96
13,77	134886981	99,66	<i>бензол, 1-хлор-2,4-динитро-</i>	97
14,01	196065	0,14	<i>бензоламин, 2-хлоро-5-нитро</i>	95
15,01	137073	0,10	<i>бензоламин, 4-хлоро-3-нитро</i>	91

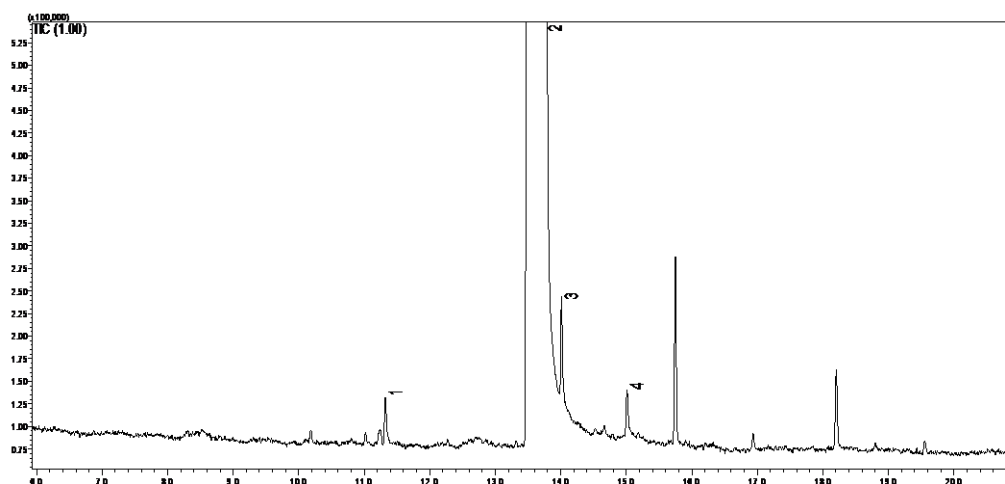


Рисунок Г.1 – Хроматограмма идентификации и оценки содержания примесей методом внутренней нормализации 1-хлор-2,4-динитрохлорбензола методом ГХ-МС

Таблица Г.4 – Хроматографические условия оценки хроматографической чистоты 1-хлор-2,4-динитробензола методом ВЭЖХ-УФ

стационарная фаза:	ReproSil-Pur Basic C18 100×4,6 мм, 3 мкм
подвижная фаза:	CH ₃ CN/0,1 % H ₃ PO ₄ 65:35
скорость потока:	1 мл/мин
температура колонки:	35 °С
длина волны УФ-детектора:	220 нм
концентрация образца:	28 мг/мл
растворитель образца:	CH ₃ CN
объем ввода пробы:	0,2 мкл

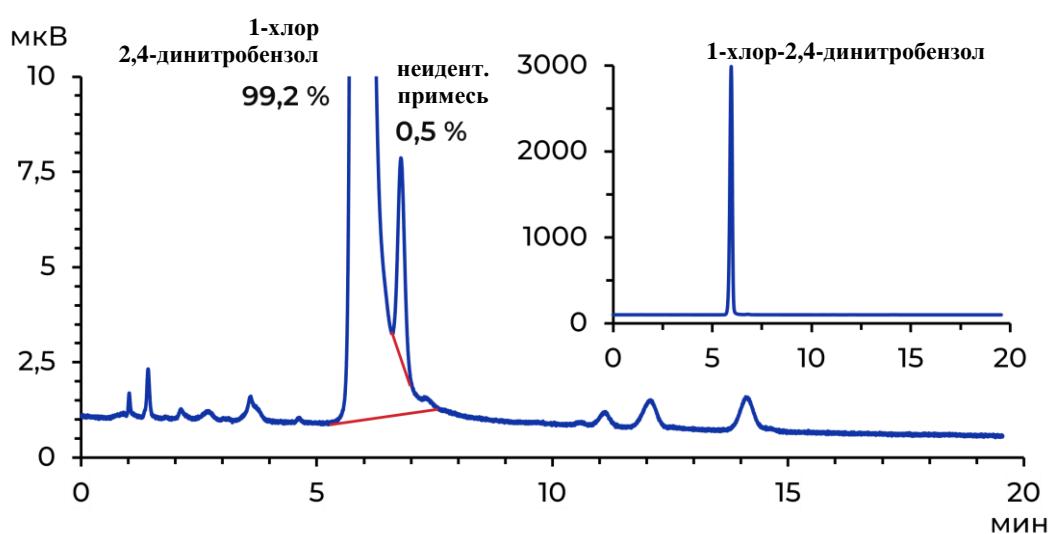


Рисунок Г.2 – Хроматограмма определения хроматографической чистоты 1-хлор-2,4-динитробензола методом ВЭЖХ-УФ

Спектры ядерного магнитного резонанса для 1-хлор-2,4-динитробензола
и полученного модифицирующего реактива AWE-241

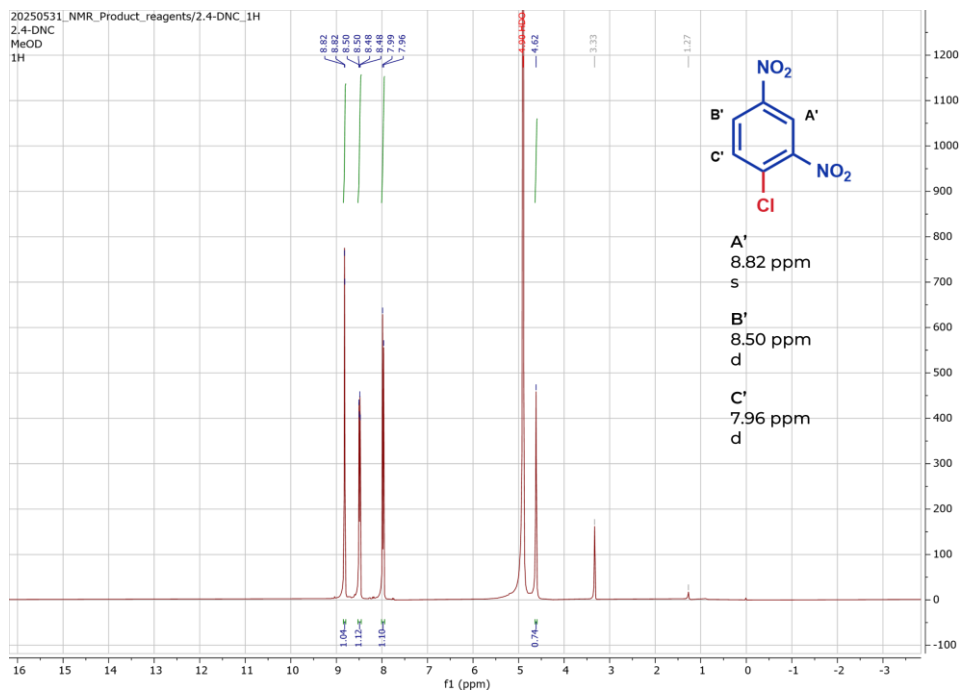


Рисунок Д.1 – ¹H ЯМР-спектр 1-хлор-2,4-динитробензола

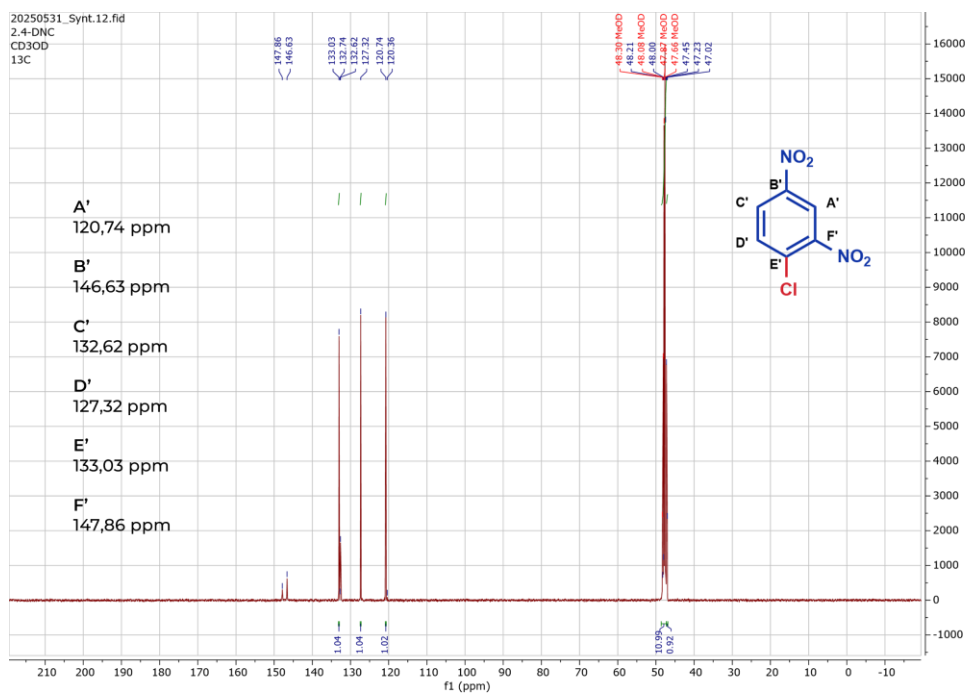
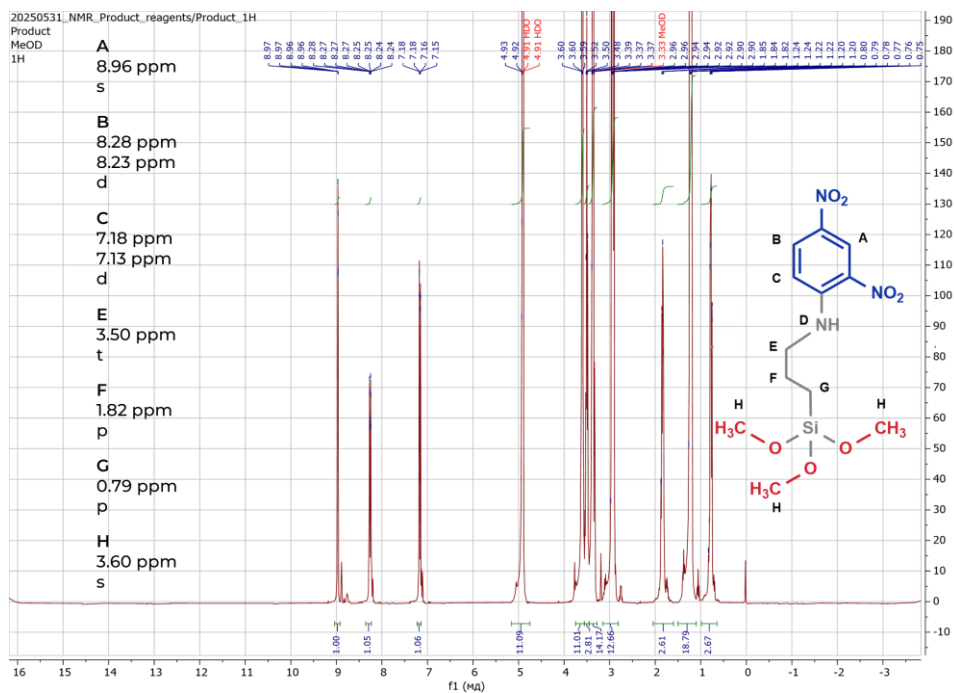
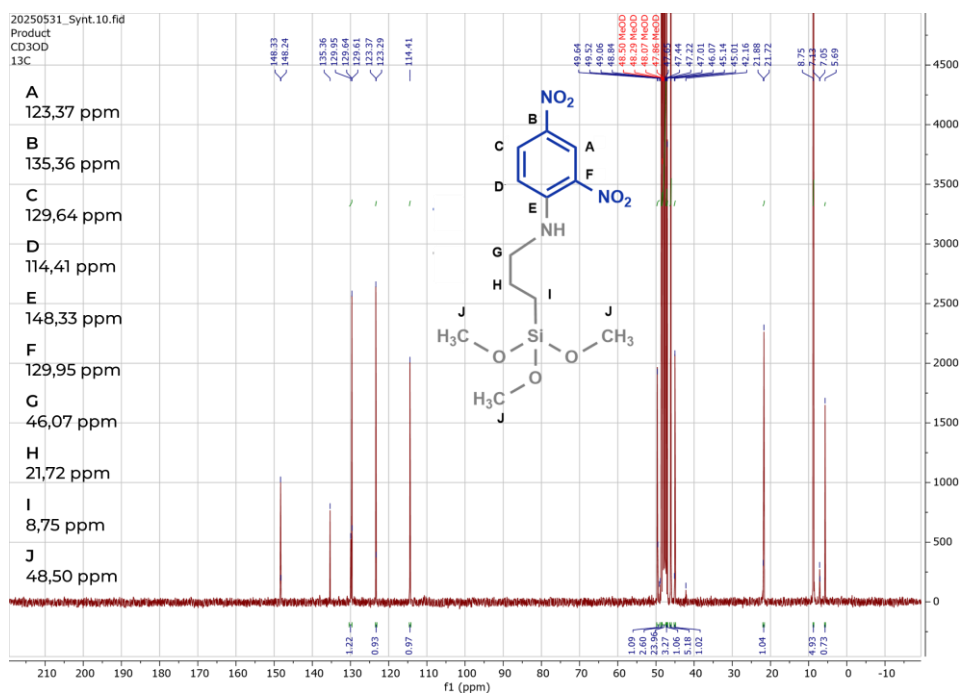


Рисунок Д.2 – ¹³C ЯМР-спектр 1-хлор-2,4-динитробензола

Рисунок Д.3 — ¹H ЯМР-спектр модифицирующего реактива AWE-241Рисунок Д.4 — ¹³C ЯМР-спектр модифицирующего реактива AWE-241

Приложение Е

Кривые синхронного термогравиметрического анализа немодифицированного силикагеля и модифицированного силикагеля «AWE-241@SiO₂»

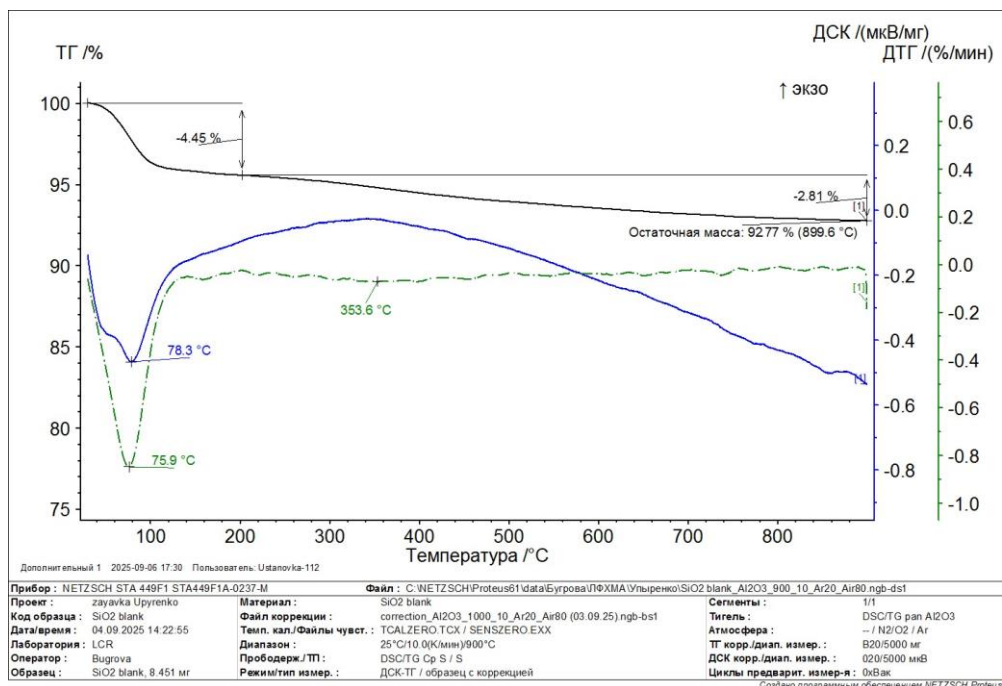


Рисунок Е.1 – Кривые синхронного термогравиметрического анализа немодифицированного силикагеля (в зависимости от температуры, °C)

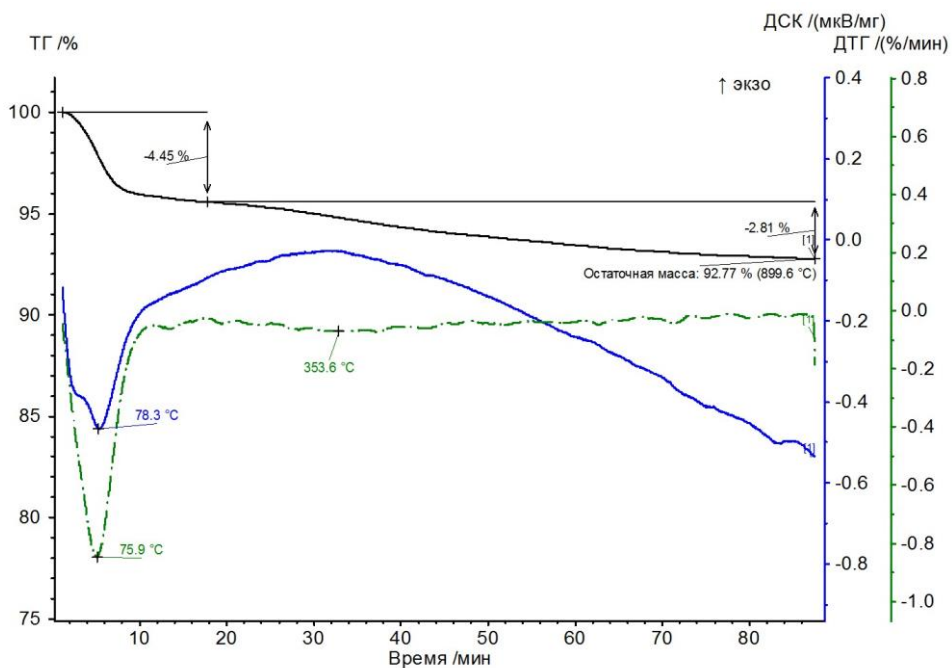


Рисунок Е.2 – Кривые синхронного термогравиметрического анализа немодифицированного силикагеля (в зависимости от времени, мин)

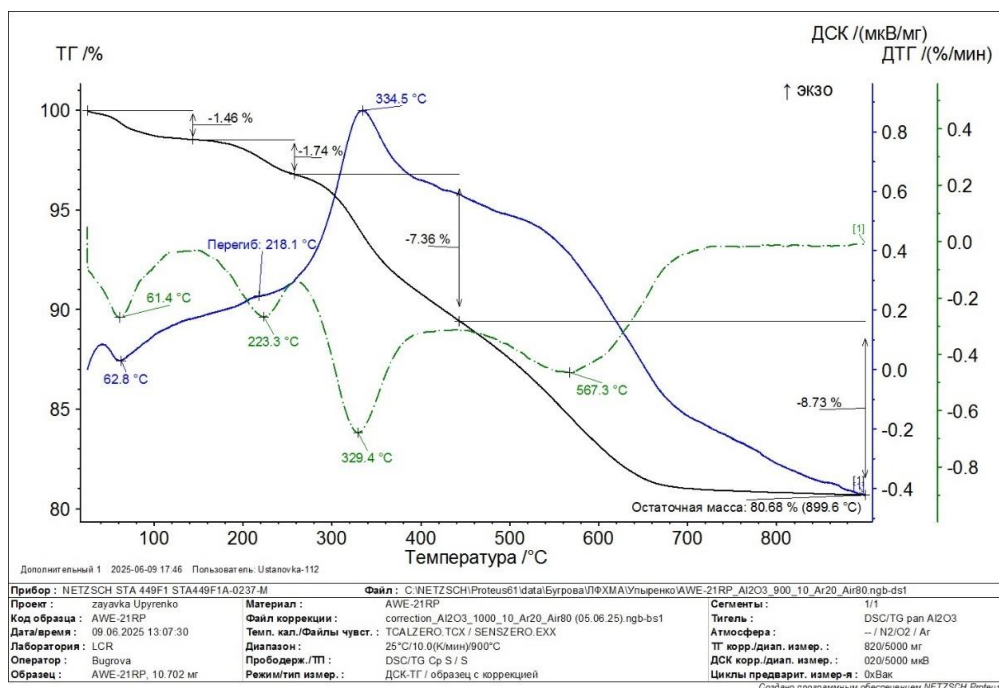


Рисунок Е.3 – Кривые синхронного термогравиметрического анализа модифицированного силикагеля «AWE-241 @ SiO₂» (в зависимости от температуры, °C)

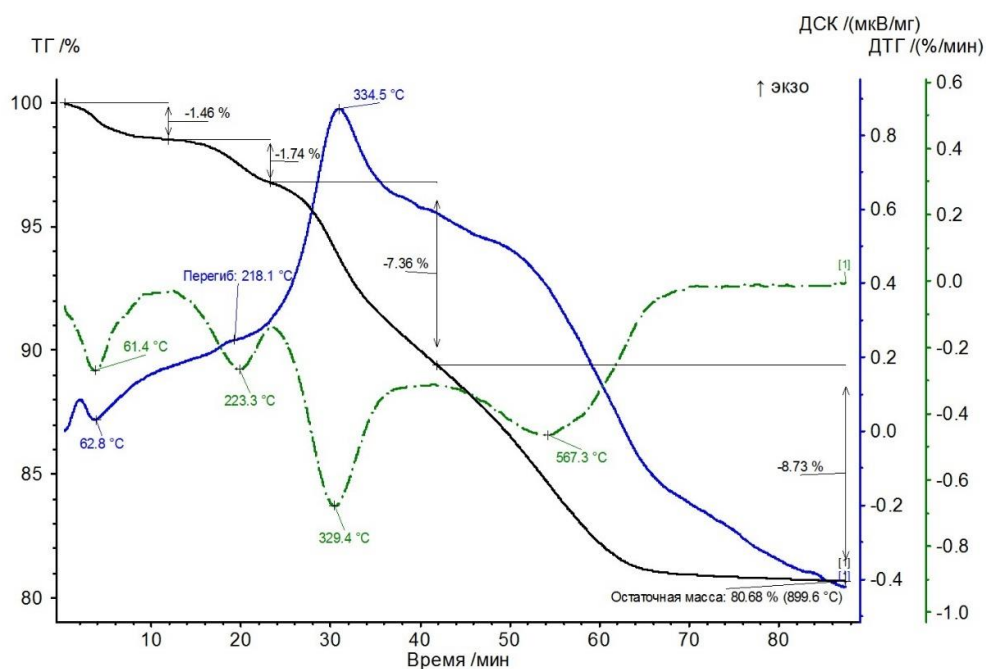


Рисунок Е.4 – Кривые синхронного термогравиметрического анализа модифицированного силикагеля «AWE-241 @ SiO₂» (в зависимости от времени, мин)