



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 631.4

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11313

Исследование механизмов удерживания профенов и β -блокаторов на полимерном наногибридном сорбенте с эремомицином

**Дарья Сергеевна Просунцова¹✉, Ирина Алексеевна Ананьева¹,
Татьяна Александровна Москалева², Олег Алексеевич Шпигун¹**

¹Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,

inhusoria6@yandex.ru✉

²Научный центр экспертизы средств медицинского применения Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Аннотация. В жидкостной хроматографии применение новых гибридных материалов с наночастицами в качестве неподвижных фаз предлагает альтернативу обычно используемым фазам на основе диоксида кремния. В данной работе приводится исследование полимерного наногибридного сорбента с макроциклическим антибиотиком. Был синтезирован сорбент на основе полистирол-дивинилбензола (ПС-ДВБ), модифицированный наночастицами золота (НЧЗ), стабилизированными эремомицином. ПС-ДВБ-Ау-эремомицин был охарактеризован с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии и элементного анализа. Содержание НЧЗ составило $3.5 \cdot 10^{14}$ частиц на грамм сорбента. Плотность покрытия эремомицином составило 20 мкмоль/г. По результатам низкотемпературной адсорбции азота сорбент имеет мезопористую структуру. Площадь функциональной поверхности сорбента по сравнению с немодифицированным ПС-ДВБ увеличивается на 30%, несмотря на иммобилизацию больших молекул антибиотика. Это является важным преимуществом адсорбции НЧЗ.

Полученный сорбент исследовали в качестве неподвижной фазы (НФ) для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Представлено подробное исследование механизмов удерживания профенов и β -блокаторов на ПС-ДВБ-Ау-эремомицин. Факторы удерживания получены при различных рН, содержании органического растворителя и ионной силы подвижной фазы. При рН 4.0 коэффициенты удерживания профенов в большинстве случаев не превышают значения 0.5, однако наблюдается увеличение удерживания с возрастанием доли ацетонитрила в ПФ с 20 до 80%. Такое поведение можно объяснить растущим вкладом гидрофильных взаимодействий в удерживание. При 80 об. % ацетонитрила наблюдается наилучшее разделение смеси профенов. При рН 9.9 коэффициенты удерживания профенов падают с возрастанием органического компонента в ПФ. Наилучшее разделение четырех профенов достигнуто при 20 об. % содержании ацетонитрила. Порядок выхода: индопрофен < кетопрофен < ибупрофен < флурбипрофен, соответствует возрастанию гидрофобности веществ. Это говорит о реализации обращенно-фазового механизма удерживания профенов при данном значении рН. При рН 6.2 порядок выхода аналитов меняется, что говорит об изменении механизма удерживания, также наблюдается увеличение времен удерживания аналитов. Удерживание определяется совокупностью ионообменного и классического адсорбционного механизмов. При уменьшении концентрации буферного раствора удерживание профенов увеличивается, что также подтверждает вклад ионных взаимодействий в удерживание.

Удерживание β -блокаторов увеличивается с возрастанием доли ацетонитрила в ПФ. Такое поведение хорошо согласуется с хроматографией электростатического отталкивания-гидрофильного взаимодействия. При этом вещества с большими параметрами гидрофобности удерживаются на сорбенте сильнее. При рН 9.9, при котором β -блокаторы адсорбируются в виде нейтральных молекул, данная зависимость наиболее выражена. Это говорит о наличии вклада гидрофобных взаимодействий. При понижении рН до 6.2 порядок выхода β -блокаторов изменяется, что свидетельствует о конкуренции различных меха-



низмов взаимодействия сорбата и сорбента. Для β -блокаторов при увеличении концентрации буферного раствора удержание увеличивается, также возрастает селективность, которая, по всей видимости, обуславливается разницей в гидрофобности молекул.

Продемонстрированы энантиоселективные свойства сорбента. Наилучшее разделение энантиомеров профенов наблюдается при содержании в ПФ ацетонитрила 90-95% и при нейтральном значении pH. Энантиомеры β -блокаторов разделяются в условиях нейтрального pH и преобладании водного компонента в ПФ. Для расширения области применения хирального сорбента также исследовали разделение энантиомеров бензоксикарбонил- (КБЗ), бензоил-, третбутокси- (БОК) производных аминокислот на экспериментальном сорбенте. Разделение энантиомеров некоторых КБЗ и бензоил производных было получено.

Методом ВЭЖХ на колонке с ПС-ДВБ-Ау-эремомоцин проведен анализ лекарственного препарата «Кетонал», подтверждено содержание в его составе двух энантиомеров вещества кетопрофена.

На синтезированной наногибридной неподвижной фазе реализуется смешанный механизм удерживания с комбинацией электростатических, гидрофобных и гидрофильных взаимодействий. Для профенов в условиях щелочного pH преобладающими являются гидрофобные взаимодействия. Электростатическое и гидрофильное удержание, по-видимому, играет роль, в условиях кислого и нейтрального значений pH, в удержании профенов на неподвижной фазе. Постепенное увеличение удержания β -блокаторов при увеличении добавки ацетонитрила в подвижную фазу указывает на вклад гидрофильного взаимодействия, усиленного растворителем. Гидрофобные взаимодействия не являются полностью доминирующими на исследуемой неподвижной фазе, они также играют существенную роль в удерживании. Показано, что порядок выхода как профенов, так и β -блокаторов коррелирует с их полярностью. Полученный сорбент проявлял энантиоселективность к различным группам органических веществ, что демонстрирует его потенциал в качестве хиральной неподвижной фазы.

Ключевые слова: ВЭЖХ, наночастицы золота, макроциклический антибиотик, полистирол-дивинилбензол, эремомоцин.

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 20-33-90177. Работа выполнена с использованием оборудования, анализатора Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer («Perkin Elmer», США), приобретенного за счёт средств Программы развития Московского университета.

Для цитирования: Просунцова Д.С., Ананьева И.А., Москалева Т.А., Шпигун О.А. Исследование механизмов удерживания профенов и β -блокаторов на полимерном наногибридном сорбенте с эремомоцином // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 3. С. 331-342.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11313>

Original article

Sorbent for HPLC based on copolymer of styrene and divinylbenzene with gold nanoparticles stabilized by eremomycin

Daria S. Prosuntsova¹✉, Irina A. Ananieva¹,
Tatiana A. Moskaleva², Oleg A. Shpigun¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation, inhusoria6@yandex.ru✉

²Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation

Abstract. In liquid chromatography, the use of new hybrid materials with nanoparticles as stationary phases offers an alternative to the commonly used silica-based phases. This paper presents a study of polymer nano-hybrid sorbent with macrocyclic antibiotic. Eremomycin-stabilized gold-coated polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) particles are synthesized. PS-DVB-Au-eremomycin sorbent is characterized by atomic emission spectroscopy and elemental analysis. The concentration of gold nanoparticles (GNPs) immobilized onto PS-DVB matrix is approximately equal to $3.5 \cdot 10^{14}$ particles per gram. The immobilization of eremomycin provides bonding density of $20 \mu\text{mol/g}$. Sorbent has a mesoporous structure according to the low-temperature nitrogen adsorption results. The functional surface area of the obtained sorbent compared to unmodified PS-DVB increases by 30%, despite the immobilization of large molecules of antibiotic, which is an important benefit of GNPs adsorption.



The obtained sorbent is studied as a stationary phase for high performance liquid chromatography (HPLC). A detailed study of the retention mechanisms of profens and β -blockers on PS-DVB-Au-eremomycin is presented. The retention factors are obtained at varied pH, organic solvent content, and ionic strength of the mobile phase. The retention factors of profens at pH 4.0 are low, however, an increase in retention with an increase in acetonitrile content from 20 % to 80% is observed. This behavior could be explained by a growing contribution of hydrophilic interactions into retention. The best separation of the mixture of profens is obtained at 80 vol. % acetonitrile. At pH 9.9, the presence of hydrophobic interactions was indicated by the decrease of retention with an increase of organic content. The best separation of the four profens is achieved at 20 vol. % of acetonitrile. Retention order: indoprofen < ketoprofen < ibuprofen < flurbiprofen, corresponds to the increase in the hydrophobicity of the substances. This indicates to a typical reversed-phase mechanism. At pH 6.2, the retention order of analytes changes, which means a change in the retention mechanism; an increase in the retention times of analytes is also observed. Retention is determined by a mix of ion exchange and classical adsorption mechanisms. The retention of profens decreases with an increase in the concentration of the buffer solution, which also indicates the presence of ionic interactions.

Retention of β -blockers increases with an increase in acetonitrile content. This effect seems to match well with an electrostatic repulsion hydrophilic interaction retention mechanism. However, a dependence between hydrophobicity and retention of β -blockers was also found. At pH 9.9, at which β -blockers are adsorbed as neutral molecules, this dependence is most pronounced. This indicates the presence of hydrophobic interactions. When pH is lowered to 6.2, the retention order of β -blockers changes, which indicates the competition of different mechanisms of interaction between the sorbate and the sorbent. For β -blockers with an increase in the concentration of the buffer solution the retention increases and the selectivity also increases. The obtained results confirm early observations that electrostatic interactions play a significant role in the retention mechanism. The higher ionic strength of the eluent results in the suppression of such interactions and may influence separation selectivity.

The enantioselective properties of the sorbent have been demonstrated. The best separation of profene enantiomers is observed when the content of acetonitrile in eluent is 90-95% and at a neutral pH. Enantiomers of β -blockers separate under conditions of neutral pH and the predominance of the water component in eluent. To expand the scope of the chiral sorbent, the separation of enantiomers of benzoxycarbonyl- (CBZ), benzoyl-, tert-butoxy- (BOX) derivatives of amino acids on an experimental sorbent were also studied. Separation of the enantiomers of some CBZ and benzoyl derivatives has been obtained.

The column with PS-DVB-Au-eremomycin was used to analyze a drug "Ketonal" by HPLC, the content of two enantiomers of ketoprofen in its composition was confirmed.

A mixed-mode retention mechanism with a combination of electrostatic, hydrophobic, and hydrophilic interactions is realized on the synthesized nanohybrid stationary phase. The hydrophobic interactions dominated the retention of the profens at alkaline pH. Electrostatic and hydrophilic retention appears to play a role, under acidic and neutral conditions, in the retention of profens on the stationary phase. The gradual increase in the retention of β -blockers with the addition of acetonitrile into the mobile phase indicates HILIC behavior. Hydrophobic interactions are not entirely dominant on the investigated stationary phase, but they also play an essential role in retention. It has been shown that the retention factors of profens and β -blockers correlated with the polarity. The obtained sorbent showed enantioselectivity to various groups of organic substances, which demonstrates its potential as a chiral stationary phase.

Keywords: HPLC, gold nanoparticles, macrocyclic antibiotic, poly(styrene-divinylbenzene), eremomycin.

Acknowledgments: the work was carried out with the financial support of RFBR No. 20-33-90177. The work was performed using equipment, the Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer ("Perkin Elmer", USA), purchased at the expense of the Moscow University Development Program.

For citation: Prosuntsova D.S., Ananieva I.A., Moskaleva T.A., Shpigun O.A. C Sorbent for HPLC based on copolymer of styrene and divinylbenzene with gold nanoparticles stabilized by eremomycin. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(3): 331-342. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11313>

Введение

В жидкостной хроматографии использование новых гибридных материалов с наночастицами в качестве неподвижных фаз предлагает альтернативу обычно используемым фазам на основе диоксида

кремния [1, 2]. Среди нанообъектов в методах разделения широко распространены наночастицы золота (НЧЗ) [3]. Изучено их применение для создания неподвижных фаз на основе силикагеля с различными лигандами [4, 5], в том числе с гликопептидными антибиотиками [6, 7].

Гликопептидные антибиотики широко применяются для создания хиральных неподвижных фаз (ХНФ) для разделения энантиомеров [8]. Отечественный антибиотик эремомицин также успешно был использован для создания ХНФ [9], в том числе для разделения профенов [10] и β -блокаторов [11]. Традиционно органические полимеры были альтернативными субстратами неподвижной фазы жидкостной хроматографии, поскольку они могут выдерживать широкий диапазон pH. Наиболее распространенным органическим полимером, применяемым в жидкостной хроматографии, является полистирол-дивинилбензол (ПС-ДВБ) [12]. Наногибридные полимерные сорбенты показали себя многообещающими неподвижными фазами с отличительными свойствами [13-15]. Преимущества таких фаз включают превосходную механическую, гидролитическую и термическую стабильность и уникальные адсорбционные свойства. В предыдущих исследованиях было показано, что полистирол-дивинилбензол с адсорбированными наночастицами золота, стабилизированными различными лигандами может успешно быть использованы в качестве неподвижных фаз в ВЭЖХ [16, 17]. Хиральные соединения профенов и β -блокаторов входят в состав распространённых лекарственных препаратов в виде смесей энантиомеров, однако полезным фармакологическим действием чаще обладает один из изомеров. Поиск более доступных подходов по их определению и разделению актуальная задача. В данной работе были подробно исследованы механизмы удерживания профенов и β -блокаторов на новом полимерном наногибридном сорбенте с эремомицином.

Экспериментальная часть

Синтез сорбента. Для приготовления сорбционного материала использовали: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Au-%, 50, ChemPur), гидроксид эремомицина («БиоХимМак СТ», Москва, Россия), тетраборат натрия.

В качестве матрицы используются микросферические частицы сополимера стирола и дивинилбензола (размер 5 мкм, размер пор 10 нм, степень сшивки 50%), синтезированные на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ. Наночастицы золота готовили по оптимизированной методике, представленной в [6]. $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($C=400$ мкг/см³) смешивали с эремомицином ($C=10$ мг/см³) в боратном буферном растворе ($C=0.05$ М). Смесь кипятили с обратным холодильником 1.5 часа до образования рубинового окраса. Сорбцию НЧЗ, стабилизированных эремомицином, проводили путем длительного (5 ч) интенсивного перемешивания суспензии ПС-ДВБ (1.2 г) в подкисленном до pH 7 водном растворе наночастиц (70 см³). Модифицированный сорбент фильтровали на стеклянном пористом фильтре, промывали водой и метанолом, высушивали на воздухе. Получали твердый порошок малиновой окраски.

Характеристика сорбента. Количество сорбированного золота определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС) с индуктивно-связанной плазмой на приборе Agilent 4200 («Agilent», США). С помощью анализатора Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer («Perkin Elmer», США) проводили анализ элементного состава синтезированного материала. Поверхностные характеристики полученного сорбента и исходной матрицы ПС-ДВБ исследовали методом низкотемпературной адсорбции азота на приборе ASAP 2010 V2.00 А фирмы «Micromeritics» (США).

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Хроматографические исследования выполняли на системе ВЭЖХ Shimadzu LC-20 Prominence («Shimadzu», Япония), снабжённой спектрофотометрическим детектором с фотодиодной матрицей SPD-M20A. Сбор и обработку данных проводили с помощью программы Shimadzu LC Solution. Объем вводимой



пробы составлял 20 мкл, при 25°C и скорости потока 0.5 см³/мин, фотометрическое детектирование проводили при 254 нм. В качестве органических модификаторов для приготовления подвижных фаз (ПФ) использовали ацетонитрил («Panreac», Испания) для ВЭЖХ. Трис(гидроксиметил)аминометан (ТРИС) (99.9%, «Helicon», Россия), триэтиламин (99%, «Acros Organics», США), ацетат аммония («хч», «Реахим», Россия), уксусную кислоту («Panreac», Испания) использовали для создания рН и ионной силы подвижных фаз. Деионизованную воду получали из системы Milli-Q (Millipore, США) и использовали для приготовления всех подвижных фаз. В качестве анализов использовали следующие реагенты: индопрофен, кетопрофен, флурбипрофен, ибупрофен, ателолол, пиндолол, метопролол, окспренолол, алпренолол, лабеталол, бензоилвалин, КБЗ-аланин, КБЗ-валин, КБЗ-лейцин (Sigma-Aldrich).

Колонку из нержавеющей стали с внутренним диаметром 100×4.6 мм, набивали с помощью пневматического жидкостного насоса («Knauer K-1900») при давлении 400 МПа до достижения общего объема растворителя, прошедшего через колонку, 0.25 дм³. Суспензию, содержащую 1.2 г сорбента готовили в 80 % водном растворе ацетонитрила (20 мл) и 50% ацетонитрил использовали в качестве раствора для набивки.

Влияние рН элюента на удержание анализов изучали с использованием подвижных фаз, приготовленных разбавлением ацетата аммония и уксусной кислоты в растворах состава вода-ацетонитрил различного соотношения. Суммарная

концентрация уксусной кислоты и ацетата аммония составляла 10 мМ и 20 мМ. Требуемое значение рН было достигнуто за счет варьирования соотношения CH₃COOH/CH₃COONH₄.

Анализ препарата «Кетонал». Препарат «Кетонал» выпускается в капсулах (производитель: Novartis, Словения). Содержимое капсулы растворяли в 50 см³ ацетонитрила, суспензию помещали в ультразвуковую ванну на 20 минут, проводили фильтрацию с помощью шприцевого фильтра; 1 см³ полученного фильтрата растворяли в 4 см³ ПФ.

Обсуждение результатов

По данным АЭС процентное содержание золота в сорбенте составило 0.9 масс.%. Масса одной НЧЗ равна 3·10⁻¹⁷ г, принимая средний диаметр НЧ=16.6 нм и ρ_{ау}=19 г/см³ [17]. Таким образом, можно оценить содержание НЧЗ, которое составило 3.5×10¹⁴ частиц на грамм сорбента. Содержание эремомицина в сорбенте, рассчитанное по результатам элементного анализа на азот (0.275 масс. %), составило 3.1 масс.%, что соответствует плотности покрытия 20 мкмоль/г.

Параметры поверхности сорбента и немодифицированной матрицы ПС-ДВБ оценивали методом низкотемпературной адсорбции азота. На изотермах присутствует петля гистерезиса, что подтверждает мезопористую структуру сорбентов. По построенным изотермам определяли площадь поверхности, объем пор (табл. 1). Площадь поверхности в следствии модифицирования увеличивается на 30 %, несмотря на адсорбцию больших молекул антибиотика. Это является важным преимуществом модифицирования сорбентов посредством адсорбции НЧЗ.

Таблица 1. Характеристики сорбентов ПС-ДВБ и ПС-ДВБ-Ау-эремомицин
Table 1. Characteristics of sorbents PS-DVB and PS-DVB-Au-eremomycin

Сорбент	Площадь поверхности, м ² /г	Общий объем пор, см ³ /г	Объем микропор, см ³ /г
ПС-ДВБ	270	0.20	0.007
ПС-ДВБ-Ау-эремомицин	360	0.30	0.003

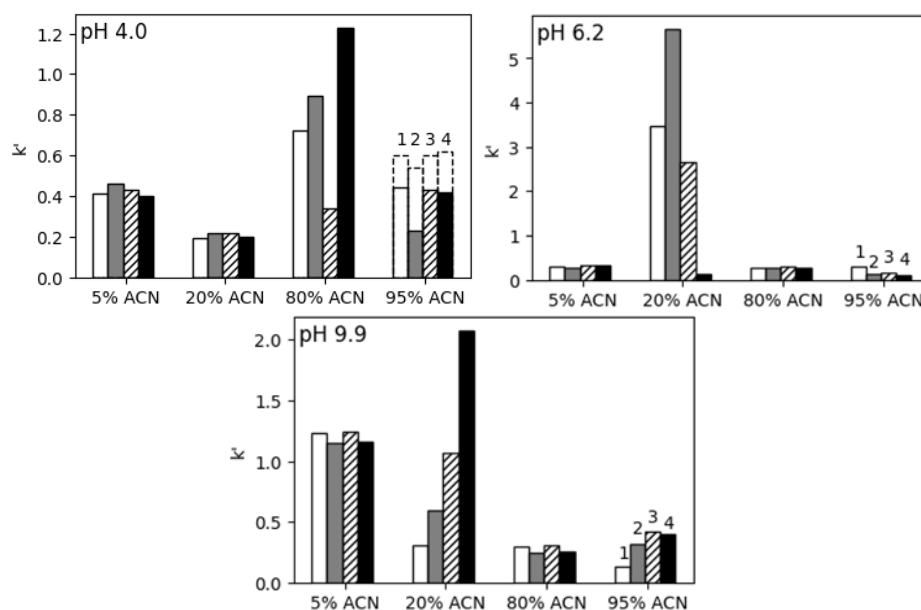


Рис. 1. Зависимость коэффициентов удерживания профенов от содержания ацетонитрила в ПФ ACN: 20 mM Ацетат аммония; 1 – индопрофен ($pK_a=5.8$, $\log P=2.77$), 2 – кетопрофен ($pK_a=4.0$, $\log P=3.12$), 3 – ибупрофен ($pK_a=5.2$, $\log P=3.72$), 4 – флурбипрофен ($pK_a=4.2$, $\log P=4.11$); пунктир соответствует ПФ ACN: 10 mM Ацетат аммония.

Fig. 1. Dependence of the retention coefficients of profenes on the content of acetonitrile in PF ACN: 20 mm Ammonium acetate; 1 – indoprofen ($pK_a=5.8$, $\log P=2.77$), 2 – ketoprofen ($pK_a=4.0$, $\log P=3.12$), 3 – ibuprofen ($pK_a=5.2$, $\log P=3.72$), 4 – flurbiprofen ($pK_a=4.2$, $\log P=4.11$); dotted line corresponds to PF ACN: 10 mM Ammonium acetate.

Объем микропор снижается, а общий объем пор увеличивается, это может свидетельствовать о закрытии микропор наночастицами золота с эремоницином и образовании новых пор за счёт слоя модификатора.

Полученный сорбент исследовали в качестве неподвижной фазы (НФ) в ВЭЖХ. Полимерная матрица обладает сильными гидрофобными свойствами в отличие от стандартных силикагелевых. Эремоницин содержит в своей структуре различные функциональные группы с pK_a : 3.1 для карбоксильной группы, 6.9, 7.9 и 9.0 для аминогрупп, 9.7, 10.4, и 11.35 для фенольных групп; изоэлектрическая точка – 7.2 [9, 10]. В связи с этим, на сорбентах с эремоницином возможна реализация различных механизмов удерживания.

Профены являются лекарственными средствами из группы производных пропионовой кислоты, обладающими противовоспалительным, анальгезирующим и

жаропонижающим действием. Профены являются кислотами, но и имеют в своём составе крупные гидрофобные фрагменты, а также различные функциональные группы, из-за чего механизм их взаимодействия с НФ может быть комплексным. Влияние содержания органической добавки в ПФ на удерживание соединений изучали при элюировании ПФ состава ацетонитрил и буферные растворы с различными pH. Содержание ацетонитрила варьировали от 5 до 95 об. % (рис. 1).

Профены имеют значения pK_a около 4 [10]. При pH среды выше этого значения они имеют отрицательный заряд. При pH 4.0 коэффициенты удерживания профенов в большинстве случаев не превышают значения 0.5, наблюдается увеличение удерживания с возрастанием доли ацетонитрила в ПФ до 80%. Такое поведение можно объяснить растущим вкладом гидрофильных взаимодействий в удерживание. При 80 об.% ацетонитрила различия в удерживании достаточны,

Таблица 2. Хроматографические параметры разделения смеси профенов
 Table 2. Chromatographic parameters of separation of a mixture of profenes

рН 6.2			рН 9.9		
вещество	k'	α	вещество	k'	α
флурбипрофен	0.14	18.9	индопрофен	0.31	1.9
ибупрофен	2.65		кетопрофен	0.59	
индопрофен	3.48	1.3	ибупрофен	1.07	1.8
кетопрофен	5.67	1.6	флурбипрофен	2.08	1.9

чтобы разделить смесь профенов (табл. 2). При рН 9.9 коэффициенты удерживания профенов падают с возрастанием органического компонента в ПФ. Наилучшее разделение четырех профенов достигнуто при 20 об.% ацетонитрила (табл. 2). Порядок выхода: индопрофен <кетопрофен <ибупрофен <флурбипрофен, соответствует параметрам $\log P$, а именно, более гидрофобные вещества удерживаются сильнее. Это говорит о реализации обращённо-фазового механизма удерживания профенов при данном значении рН.

При рН 6.2 порядок выхода анализов меняется, что говорит об изменении механизма удерживания, также наблюдается увеличение времен удерживания анализов. Это можно объяснить тем, что удерживание определяется совокупностью ионообменного и классического адсорбционного механизмов. При низких значениях рН, когда диссоциация кислоты подавлена, вещества адсорбируются в виде нейтральных молекул. С повышением рН возрастает доля диссоциированных молекул, которые вступают в реакцию по ионообменному механизму. Поскольку ион-ионное взаимодействие сильнее межмолекулярных взаимодействий, вклад ионной составляющей в общее удерживание приводит к росту k' . Однако с увеличением основности подвижной фазы уменьшается доля протонированных амино-групп эремомицина, то есть центров наиболее сильной адсорбции анионов. Поэтому наблюдается падение величины k' .

Было изучено влияние концентрации буферного раствора на удерживание профенов при элюировании 95% ацетонитрил и 5% Ацетат аммония, рН=4.0. При уменьшении концентрации буферного раствора удерживание веществ увеличивалось (рис. 1), что также подтверждает вклад ионных взаимодействий в удерживание.

β -блокаторы являются соединениями этаноламина. Они широко используются в фармацевтике для блокирования действия адреналина и норадреналина на сердце. На рис. 2 представлены зависимости коэффициентов удерживания β -блокаторов от содержания ацетонитрила в подвижной фазе при различных рН.

β -блокаторы имеют pK_a около 9 [16], при рН меньше этого значения они заряжены положительно. Удерживание соединений увеличивалось с возрастанием доли ацетонитрила в ПФ (рис. 2), что говорит о преобладании удерживания по гидрофильному механизму. Добавление органического растворителя увеличивает диэлектрическую проницаемость элюента и подавляет отталкивание между катионами β -блокаторов и положительно заряженной поверхностью сорбента с эремомицином. Этот эффект, по-видимому, хорошо согласуется с хроматографией электростатического отталкивания-гидрофильного взаимодействия [18]. При этом порядок выхода β -блокаторов коррелирует с $\log P$, вещества с большими параметрами гидрофобности удерживаются на сорбенте сильнее. При рН 9.9, при котором β -блокаторы адсорбируются в виде

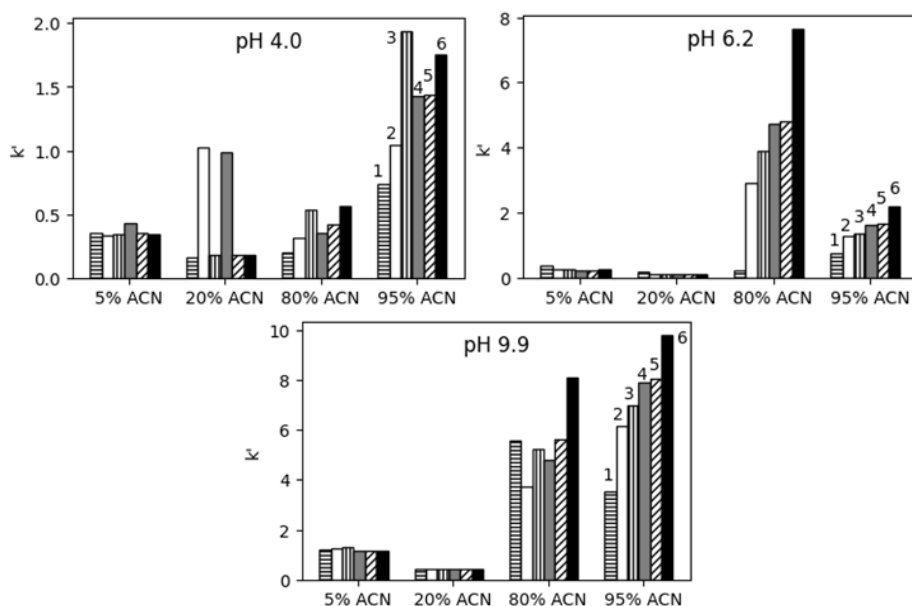


Рис. 2. Зависимость коэффициентов удерживания β -блокаторов от содержания ацетонитрила в ПФ ACN : 20 мМ Ацетат аммония; 1 – атенолол ($pK_a=9.6$, $\log P=0.16$), 2 – пиндолол ($pK_a=8.8$, $\log P=1.75$), 3 – лабеталол ($pK_a=9.3$, $\log P=2.31$), 4 – метопролол ($pK_a=9.7$, $\log P=1.88$), 5 – окспренолол ($pK_a=9.5$, $\log P=2.29$), 6 – алпренолол ($pK_a=9.6$, $\log P=3.10$).

Fig. 2. Dependence of the retention coefficients of β -blockers on the content of acetonitrile in PF ACN: 20 mM Ammonium acetate; 1 – atenolol ($pK_a=9.6$, $\log P=0.16$), 2 – pindolol ($pK_a=8.8$, $\log P=1.75$), 3 – labetalol ($pK_a=9.3$, $\log P=2.31$), 4 – metoprolol ($pK_a=9.7$, $\log P=1.88$), 5 – oxprenolol ($pK_a=9.5$, $\log P=2.29$), 6 – alprenolol ($pK_a=9.6$, $\log P=3.10$).

нейтральных молекул, данная зависимость наиболее выражена. Это говорит о наличии вклада гидрофобных взаимодействий. При понижении pH до 6.2 порядок выхода β -блокаторов изменяется, а коэффициенты удерживания падают при 95 об.% ацетонитрила после максимума при 80 об.%, что свидетельствует о конкуренции различных механизмов взаимодействия сорбата и сорбента. В удерживание вносят вклад образование водородных связей, электростатические взаимодействия, также сохраняется влияние гидрофобных взаимодействий, так, например, атенолол, который имеет наименьший $\log P$, удерживается слабее остальных анализов при всех исследованных pH. Для β -блокаторов при увеличении концентрации буферного раствора, удерживание увеличивается, также возрастает селективность, которая, по всей видимости, обуславливается разницей в гидрофобности молекул (рис. 3). Полученные

результаты подтверждают, что электростатические взаимодействия играют существенную роль в механизме удерживания. Более высокая ионная сила элюента приводит к подавлению таких взаимодействий и может влиять на селективность разделения.

Синтезированный сорбент проявил энантиоселективность к профенам. Удалось добиться энантиоразделения кетопрофена, флурбипрофена и индопрофена. Наилучшее разделение энантиомеров профенов наблюдалось при содержании в ПФ ацетонитрила 90-95% и при нейтральном значении pH буферного раствора (табл. 3). Однако энантиомеры ибупрофена на колонке не разделялись. Можно предположить, что в энантиоселективность вносят вклад π - π взаимодействия и стерический фактор, так как ибупрофен содержит в своей структуре одно бензольное кольцо, а остальные исследуемые профены – по два. Колонка также проявила энантиоселективность к

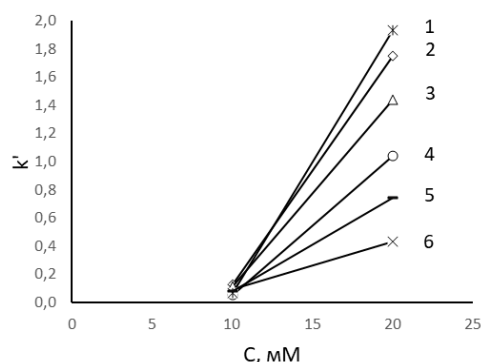


Рис. 3. Зависимость коэффициентов удерживания (k') от концентрации буферного раствора в ПФ, 1 – лабеталол, 2 – алпренолол, 3 – окспренолол, 4 – пиндолол, 5 – атенолол, 6 – метопролол. Элюент: 95% ацетонитрил и 5% Ацетат аммония, рН = 9.9.

Fig. 3. Dependence of retention coefficients (k') on the concentration of the buffer solution in PF, 1 – labetalol, 2 – alprenolol, 3 – oxprenolol, 4 – pin-dolol, 5 - atenolol, 6 – metoprolol. Eluent: 95% acetonitrile and 5% Ammonium acetate, рН = 9.9.

Таблица 3. Хроматографические параметры разделения энантимеров аналитов, ТЕАА – триэтиламин-ацетатный, ФБ – фосфатный буферные растворы

Table 3. Chromatographic parameters of the separation of enantiomers of analytes, ТЕАА – triethylamine-acetate, РВ – phosphate buffer solutions

Подвижная фаза, об. %	Вещество	k'_1	k'_2	α
АСН:ТЕАА (0.05%, рН 7.0) 95:5 об. %	кетопрофен	1.08	1.60	1.5
	флурбипрофен	1.13	1.63	1.4
	индопрофен	1.12	1.62	1.4
АСН:ФБ (10 мМ, рН 7.0) 90:10 об. % 90:10	кетопрофен	0.23	0.55	2.4
АСН:ТРИС (10 мМ, рН 7.0) 10:90 об. %	алпренолол	0.42	0.73	1.7
	окспренолол	0.45	0.75	1.7
	метопролол	0.44	0.76	1.7
АСН:ТЕАА (0.05%, рН 7.0) 95:5 об. %	Бензоил-валин	0.10	0.29	2.9
АСН:ТРИС (10 мМ, рН 7.0) 90:10 об. %	КБЗ-валин	0.58	0.98	1.7
	КБЗ-аланин	0.55	0.89	1.6
АСН:ТРИС (10 мМ, рН 9.1) 90:10 об. %	КБЗ-валин	0.47	0.55	1.2
	КБЗ-лейцин	0.46	0.54	1.2

β -блокаторам, было получено разделение энантимеров алпренолола (рис.4), окспренолола и метопролола в условиях нейтрального рН и преобладании водного компонента в ПФ (табл. 3). Для расширения области применения хирального сорбента также исследовали разделение энантимеров бензоксикарбонил-(КБЗ), бензоил-, третбутокси- (БОК) производных аминокислот на экспериментальном сорбенте. Такие защитные группы играют ключевую роль в синтезах различного направления, позволяя за-

щитить аминокислотную группу аминокислот. Разделение энантимеров некоторых КБЗ и бензоил производных было получено (табл. 3). Селективность (α) исследуемой колонки высокая, однако эффективность оказалась не велика, достигает 5000 теоретических тарелок на метр, что может быть связано с наличием большого объёма микропор в полимерной матрице и частичным набуханием сорбента.

На исследуемой колонке проведен анализ коммерческого препарата «Кетонал» на энантиомерный состав. Фармацевтический препарат предназначен для

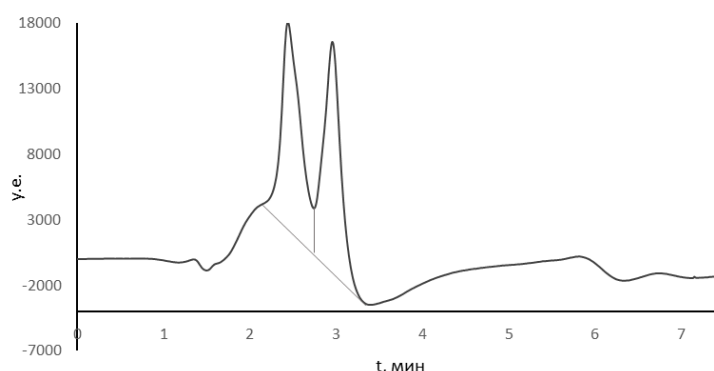


Рис. 4. Хроматограмма разделения алпренолола. ПФ: АСН:ТРИС (10 мМ, рН 7.0) 10:90 об.%.
 Fig. 4. Chromatogram of the separation of alprenolol. MP: АСН:ТРИС (10 мМ, рН 7.0) 10:90 vol.%.

Таблица 4. Хроматографические параметры разделения энантиомеров кетопрофена препарат «Кетонал», ПФ – АСН:ТЕАА (0.05%, рН 7.0) 95:5 об. %

Table 4. Chromatographic parameters of separation of ketoprofen enantiomers preparation "Ketonal", PF – АСН:ТЕАА (0.05%, рН 7.0) 95:5 vol. %

	$k'(1)$	$k'(2)$	α
Вещество кетопрофен препарата «Кетонал»	0.65	1.15	1.76

терапии болезненных и воспалительных процессов. Было подтверждено, что препарат «Кетонал» содержит два энантиомера кетопрофена в равном соотношении (табл. 4).

Заключение

ПС-ДВБ был успешно модифицирован наночастицами золота, стабилизированными эремомицином, его поверхность была охарактеризована с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии, элементного анализа и метода низкотемпературной адсорбции азота. Изучены закономерности удерживания профенов и β -блокаторов на синтезированном сорбенте при различных составах подвижной фазы. Сорбент демонстрирует смешанный характер удерживания, комбинируя обращённо-фазовое, ионообменное и гидрофильное поведение. Для профенов в условиях щелочного рН преобладающими являются гидрофобные взаимодействия. Электростатическое и гидрофильное удержание, по-видимому, иг-

рает роль, в условиях кислого и нейтрального значениях рН, в удержании профенов на неподвижной фазе. Постепенное увеличение удержания β -блокаторов при увеличении добавки ацетонитрила в подвижную фазу указывает на вклад гидрофильного взаимодействия, усиленного растворителем. Хотя гидрофобные взаимодействия не являются полностью доминирующими на исследуемой неподвижной фазе, они играют существенную роль в удерживании. Показано, что порядок выхода как профенов, так и β -блокаторов коррелирует с их полярностью ($\log P$). Полученный сорбент проявляет энантиоселективность к различным группам органических веществ, что демонстрирует его потенциал в качестве хиральной неподвижной фазы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.



Список литературы/References

1. Bushra R., Chapter 15. Functionalized Nanomaterials for Chromatography. Elsevier Inc., 2018; 403-414. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812792-6/00015-7>
2. Wang Z. Review Applications of nanomaterials in liquid chromatography: Opportunities for separation with high efficiency and selectivity. *J. Sep. Sci.* 2006; 29: 1872-1878. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600154>
3. Gorbunova M., Apyari V., Dmitrienko S., Zolotov Y. Gold nanorods and their nanocomposites: synthesis and recent applications in analytical chemistry. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2020; 130: 115974. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115974>
4. Ananieva I.A., Polyakova Y.A., Shapovalova E.N., Shpigun O.A. Using adsorbents modified by gold nanoparticles in chromatography (review). *Journal of Analytical Chemistry.* 2017; 72(8): 714-726. <https://doi.org/10.7868/S0044450217080023>
5. Li Y., Wei M., Chen T., Zhu N., Ma Y. Self-assembled cyclodextrin-modified gold nanoparticles on silica beads as stationary phase for chiral liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. *Talanta.* 2016; 160: 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.07.016>
6. Shapovalova E.N., Golubova A.D., Ananieva I.A., Baygildiev T.M., Shpigun O.A. Sorbent for the separation of enantiomers of amino acids based on silica gel modified with stabilized Au nanoparticles. *Mendeleev Commun.* 2019; 29: 702-704. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.11.035>
7. Ananieva I.A., Polyakova Y.A., Shapovalova E.N., Mazhuga A.G., Shpigun O.A. Separation of β -blocker enantiomers on silica modified with gold nanoparticles with immobilized macrocyclic antibiotic vancomycin. *Journal of Analytical Chemistry.* 2018; 73(2): 162-169. <https://doi.org/10.7868/S0044450218020032>
8. Shapovalova E.N., Fedorova I.A., Ananieva I.A., Shpigun O.A. Macrocyclic antibiotics as chiral selectors in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry (Zhurnal Analiticheskoi Khimii).* 2018; 73(11): 1064-1075. <https://doi.org/10.1134/S0044450218110117>
9. Staroverov S.M., Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiarov G.G., Katrukha G.S., Fedorova G.B. New chiral stationary phase with macrocyclic glycopeptide antibiotic eremomycin chemically bonded to silica. *J. Chromatogr. A.* 2006; 1108: 263-267. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.073>
10. Reshetova E.N., Asnin L.D. Effect of the Ionic Composition of a Mobile Phase on the Chromatographic Retention of Profen Enantiomers on a Chiral Adsorbent with Grafted Eremomycin Antibiotic. *Russ. J. Phys. Chem.* 2011; 85: 1552-1557. <https://doi.org/10.1134/S0036024411080280>
11. Fedorova I.A., Shapovalova E.N., Shpigun O.A. Separation of β -blocker and amino acid enantiomers on a mixed chiral sorbent modified with macrocyclic antibiotics eremomycin and vancomycin. *J. Anal. Chem.* 2017; 72: 76-82. <https://doi.org/10.1134/S1061934817010075>
12. Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A. Preparation and chromatographic performance of polymer-based anion exchangers for ion chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta.* 2016; 904: 33-50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.012>
13. Huang Z., Yao P., Zhu Q., Wang L., Zhu Y. The polystyrene-divinylbenzene stationary phase hybridized with oxidized nanodiamonds for liquid chromatography. *Talanta.* 2018; 185: 221228. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.076>
14. Kobayashi K., Kitagawa S., Ohtani H. Development of capillary column packed with thiol-modified gold-coated polystyrene



particles and its selectivity for aromatic compounds. *J. Chromatogr. A*. 2006; 1110: 95-101.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.094>

15. Gupta V., Kazarian A., Gaskell B., Linford M., Jensen D., Paull B., Nesterenko P. Mixed-mode liquid chromatography on core shell stationary phases based on layer-by-layer nanodiamond/polyamine architecture. *Curr. Chromatogr.* 2018; 5: 5-17. <https://doi.org/10.2174/2213240605666180226114029>

16. Prosuntsova D.S., Plodukhin A.Y., Ananieva I.A., Beloglazkina E.K., Nesterenko P.N. New composite stationary phase for chiral high-performance liquid chromatography. *Journal of Porous Materials*. 2020; 28: 407-414. <https://doi.org/10.1007/s10934-020-00985-y>

17. Prosuntsova D.S., Ananieva I.A., Nesterenko P.N., Shpigun O.A. Microspherical polystyrene-divinylbenzene particles hybridized with eremomycin stabilized gold nanoparticles as a stationary phase for chiral liquid chromatography. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov*. 2022; 88(12): 14-20. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2022-88-12-14-20> (In Russ.)

18. Alpert A.J. Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides. 2008; 80: 62-76. <https://doi.org/10.1021/ac070997p>

Информация об авторах / Information about the authors

Д.С. Просунцова – аспирант кафедры аналитической химии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

И.А. Ананьева – старший научный сотрудник кафедры аналитической химии, к.х.н., Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

Т.А. Москалева – инженер-лаборант, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

О.А. Шпигун – профессор кафедры аналитической химии, д.х.н., Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

D.S. Prosuntsova – the postgraduate student, department of analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russian Federation, E-mail: inhusoria6@yandex.ru

I.A. Ananieva – Senior Researcher, Ph.D (chemistry), department of analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russian Federation, E-mail: irishan@mail.ru

T.A. Moskaleva – laboratory engineer, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Moscow, Russian Federation, E-mail: moskalyova.tantiana@gmail.com

O.A. Shpigun – prof., grand Ph.D (chemistry), department of analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russian Federation, E-mail : shpiguno@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 22.12.2022; одобрена после рецензирования 16.05.2023; принята к публикации 17.05.2023.

The article was submitted 22.12.2022; approved after reviewing 16.05.2023; accepted for publication 17.05.2023.