




## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ


Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12234

### **Изучение хроматографических свойств разработанного гиперразветвленного цвиттер-ионного сорбента на основе силикагеля в режиме гидрофильной хроматографии**

**Григорий Сергеевич Максимов, Анна Олеговна Шемякина, Анна Станиславовна Ужель, Алла Валерьевна Чернобровкина** 

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru 

**Аннотация.** Целью данной работы являлось получение неподвижной фазы для гидрофильной хроматографии с гиперразветвленным функциональным слоем, содержащей цвиттер-ионные группы, и изучение её хроматографических свойств с использованием модельных веществ разнообразных кислотно-основных характеристик. В качестве системы для тестирования взаимодействий аналитов с неподвижной фазой применяли набор подвижных фаз различной кислотности, содержащих 90 об.% ацетонитрила. Для оценки вклада ионного обмена в удерживание заряженных соединений при крайних рассматриваемых значениях pH проводили варьирование концентрации элюирующего иона.

Было установлено, что во всём диапазоне  $w_pH$  подвижной фазы от 2.85 до 5.76 ( $s_pH$  5.5-9.2) у сорбента преобладали анионообменные свойства, которые были обеспечены влиянием четвертичных аминогрупп, сформированных в первом и втором функциональных слоях на поверхности матрицы. Это привело к низким факторам удерживания катиона тиамина, характеризующегося высокой гидрофильностью ( $\log D = -4.20$ ), во всех рассматриваемых условиях. Однако факторы удерживания и вклад ионного обмена для органических анионов значительно снижались с ростом pH, что, по-видимому, было вызвано увеличением степени диссоциации карбоксильных, остаточных силанольных и протонированных аминогрупп сорбента. При этом было отмечено уменьшение удерживания нейтральных аналитов, что, вероятно, было вызвано снижением толщины приповерхностного водного слоя неподвижной фазы, принимающего непосредственное участие в механизме распределения, и возможным изменением силы адсорбционных взаимодействий.

Для слабых кислот были получены неожиданные зависимости удерживания при варьировании состава подвижной фазы. Для бензойной кислоты, практически недиссоциированной при  $w_pH$  элюента, равном 2.85, установлен высокий вклад ионного обмена – вплоть до 80% при 1.25 мМ концентрации элюирующего иона в подвижной фазе. В случае ксантина показан существенный рост факторов удерживания и вклада электростатических взаимодействий с увеличением pH элюента, что не согласовалось с величиной его  $w_pK_a$ , равной 7.60. Отмеченные наблюдения свидетельствовали в пользу применения водно-органической шкалы pH при работе в гидрофильном режиме хроматографии и учёта влияния ионного обмена на удерживание аналитов даже при низкой степени их диссоциации.

Таким образом, разработанный способ создания гиперразветвленного цвиттер-ионного функционального слоя на поверхности 3-аминопропилсиликагеля обеспечил получение неподвижной фазы с преобладающими анионообменными свойствами в рабочем диапазоне pH. Варьирование кислотности и концентрации буферного раствора подвижной фазы позволило подбирать условия эффективного и селективного разделения многокомпонентной смеси, содержащей вещества различной гидрофильности и заряда.

**Ключевые слова:** гидрофильная хроматография, цвиттер-ионный сорбент, подвижная фаза, механизм удерживания.

**Благодарности:** работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-73-01145, с использованием оборудования ЦКП МГУ «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование», приобретенного МГУ по программе обновления приборной базы в рамках национального проекта «Наука» и в рамках Программы развития МГУ. Авторы выражают благодарность Соболеву Н.А. за данные элементного анализа.



Для цитирования: Максимов Г.С., Шемякина А.О., Ужель А.С., Чернобровкина А.В. Изучение хроматографических свойств разработанного гиперразветвленного цвиттер-ионного сорбента на основе силикагеля в режиме гидрофильной хроматографии // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 304-320. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12234>

Original article

## Study of chromatographic properties of the developed hyperbranched zwitterionic silica-based stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography

Grigorii S. Maksimov, Anna O. Shemiakina,  
Anna S. Uzhel, Alla V. Chernobrovkina<sup>✉</sup>

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, [chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru](mailto:chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru)<sup>✉</sup>

**Abstract.** The aim of this work was to obtain a separation material with hyperbranched functional layer containing zwitterionic groups for hydrophilic interaction liquid chromatography and to characterize solute-adsorbent interactions using test compounds of various acid-base properties. A set of mobile phases with varying acidity containing 90 vol.% of acetonitrile were used for testing the interactions of analytes with the stationary phase. The concentration of the eluting ion was varied in order to evaluate the contribution of ion exchange to the retention of charged compounds at the extremes of considered pH values.

It was found that throughout the entire  $w$ pH range of mobile phase from 2.85 to 5.76 ( $s$ pH 5.5-9.2), the adsorbent provided predominantly anion-exchange properties. It was caused by the quaternary amino groups formed in the first and second functional layers on the surface of the substrate. As a result, low retention factors under all the conditions for highly hydrophilic cation thiamine ( $\log D = -4.20$ ) were obtained. However, the retention factors and ion exchange contribution for organic anions decreased significantly with increasing pH. It was likely caused by an increase in dissociation of carboxyl, residual silanol and protonated amino groups of the stationary phase. At the same time, a decrease of the neutral analytes' retention was noted. This was probably caused by a decrease of the adsorbed aqueous layer thickness of the stationary phase, which was directly involved in partitioning mechanism. Moreover, a possible change in the strength of adsorption solute-adsorbent interactions was involved.

Unexpected retention dependences were obtained for weak acids, when the composition of the mobile phase was varied. For benzoic acid, practically undissociated at  $w$ pH 2.85 of the eluent, a high contribution of ion exchange to its retention was established up to 80% at 1.25 mM concentration of the eluting ion in the mobile phase. A significant increase in retention factors and the contribution of electrostatic interactions was shown for xanthine with increasing eluent pH, which was not consistent with its  $w$ pK<sub>a</sub> value of 7.60. The observations indicated in favor of using aqueous-organic pH scale when working in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode and taking into account the influence of ion exchange on the retention of analytes even at a low degree of their dissociation.

Thus, the developed method for creating a hyperbranched zwitterionic functional layer on the surface of 3-aminopropylsilica lead to the production of a stationary phase with predominant anion-exchange properties in the working pH range. Varying the acidity and concentration of the buffer solution of the mobile phase allowed to select the conditions suitable for the separation of a multicomponent mixture containing substances of different hydrophilicity and charge.

**Keywords:** hydrophilic interaction liquid chromatography, zwitterionic stationary phase, mobile phase, retention mechanism.

**Acknowledgments:** this study was supported by Russian Science Foundation, grant No. 23-73-01145 using the equipment provided by the Centre for Collective Use of Moscow State University "Technologies for obtaining new nanostructured materials and their comprehensive study" purchased by Moscow State University as part of the equipment update in the framework of the national project "Science" and the Development Program for the Lomonosov Moscow State University.

**For citation:** Maksimov G.S., Shemiakina A. O., Uzhel A.S., Chernobrovkina A.V. Study of chromatographic properties of the developed hyperbranched zwitterionic silica-based stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 304-320. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12234>

## Введение

Гидрофильная хроматография (ГИХ) представляет собой перспективный метод определения полярных органических соединений и находит широкое применение в таких областях как фармакология, протеомика, метаболомика [1,2]. В данном варианте хроматографии используют полярные неподвижные фазы – в основном силикагель, модифицированный разнообразными функциональными группами [3], и полярные элюенты, содержащие менее 40 об.% водной компоненты [2]. В режиме ГИХ за счет взаимодействий различной природы реализуется сложный механизм удерживания, который в основном представлен процессами распределения, адсорбции и ионного обмена [2]. Это позволяет обеспечивать уникальную селективность разделения не только веществ, отличающихся по гидрофильности, но и обладающих заряженными фрагментами в своей структуре [4]. Характеристики разделения в первую очередь определяются свойствами неподвижной фазы.

Одними из наиболее востребованных неподвижных фаз для ГИХ, характеризующихся повышенной гидрофильностью [5], являются цвиттер-ионные сорбенты. Благодаря наличию в их функциональном слое групп разных зарядов электростатические взаимодействия противоположного действия (притяжение и отталкивание) с ионизированными аналитами скомпенсированы, а распределение и адсорбция вносят существенный вклад в удерживание [6]. При этом пространственное разделение заряда на поверхности сорбента приводит к уникальной возможности одновременного определения противоположно заряженных соединений [7]. Однако число подобных коммерчески доступных сорбентов невелико, к ним относятся колонки SeQuant ZIC-HILIC, ZIC-pHILIC, ZIC-cHILIC, а также Synchronis HILIC и несколько аналогов. Разработка новых неподвижных фаз с

различной структурой цвиттер-ионного функционального слоя позволит установить способы управления их селективностью и создать сорбент с повышенной разделяющей способностью. Перспективным подходом может служить формирование гиперразветвленного функционального слоя на поверхности силикагеля с возможностью введения цвиттер-ионов как во внутреннюю, так и во внешнюю его часть [8]. К числу преимуществ гиперразветвленных сорбентов относится возможность экранирования матрицы, что позволяет надежнее контролировать ионообменные свойства, а также улучшения селективности разделения соединений разной природы при варьировании количества привитых функциональных слоев.

В практике ГИХ существует необходимость описания свойств неподвижных фаз с целью их дальнейшего подбора для решения определенных аналитических задач. Наиболее распространенным средством характеристики гидрофильных неподвижных фаз является тест Танака [9]. Однако его результаты не могут полностью предсказать хроматографические возможности сорбентов, так как описывают их свойства при фиксированном составе подвижной фазы. Для более подробной характеристики взаимодействий сорбат-сорбент в гидрофильном режиме следует рассматривать влияние состава элюента на свойства неподвижной фазы. От условий эксперимента существенно зависит реализация ионного обмена.

Кислотность подвижной фазы, которая определяет степень диссоциации как групп на поверхности сорбента, так и аналита, является ключевым параметром, регулирующим электростатические взаимодействия в системе и, как следствие, существенно влияющим на селективность разделения смесей [10]. По удерживанию соединений, имеющих постоянный заряд, было показано уменьшение числа протонированных аминогрупп у аминофазы [11] и увеличение степени

диссоциации силанольных групп у силикагеля [12] при возрастании рН элюента. Для нейтральных и цвиттер-ионных фаз на основе силикагеля также было отмечено увеличение их катионообменных свойств за счёт диссоциации немодифицированных силанольных групп [13,14]. Кроме того необходимо учитывать степень диссоциации самого определяемого вещества, влияющую на его гидрофильность и возможность реализации электростатических взаимодействий с неподвижной фазой [15].

Для понимания характера взаимодействий у поверхности неподвижной фазы важным является изучение влияния концентрации буферного раствора подвижной фазы на удерживание определяемых соединений [16]. Увеличение концентрации уменьшает силу электростатических взаимодействий в системе вследствие экранирования заряда групп сорбента, а также приводит к росту толщины приповерхностного водного слоя, определяющего механизм распределения [13,14,17].

Таким образом, чтобы подбирать неподвижную фазу и условия разделения, подходящие для конкретной задачи, необходимо детально рассматривать взаимодействия сорбат-сорбент в широком диапазоне условий. Целью данной работы было изучение свойств полученного синтетическим путем гиперразветвленного цвиттер-ионного сорбента на основе 3-аминопропилсиликагеля посредством установления зависимости удерживания

соединений разных классов в режиме гидрофильной хроматографии от рН и концентрации элюирующего иона в подвижной фазе.

### Экспериментальная часть

**Получение сорбента.** В качестве матрицы использовали силикагель с привитыми аминопропильными радикалами Диасфер-110-Амин, диаметр частиц 5 мкм («БиоХиммак СТ», Россия).

На первой стадии синтеза сорбента для закрепления и пространственного удаления функциональных групп от поверхности матрицы модифицировали 3-аминопропилсиликагель, в качестве алкилирующего агента использовали 1,4-бутандиолдиглицидиловый эфир (1,4-БДДГЭ). 12 г 3-аминопропилсиликагеля помещали в реактор объемом 150 см<sup>3</sup>, добавляли 80 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 12 см<sup>3</sup> 1,4-БДДГЭ. Реакционную смесь перемешивали с помощью мешалки при температуре 60°C в течение 30 минут со скоростью 700 об/мин. Далее сорбент отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре, промывали 300 см<sup>3</sup> деионизованной воды, 100 см<sup>3</sup> ацетонитрила и высушивали на воздухе. На второй стадии проводили аминирование полученного сорбента таурином: в реактор помещали 4.5 г сорбента, 90 см<sup>3</sup> воды и 2.53 г таурина. Реакцию проводили при 60°C и перемешивании со скоростью 700 об/мин в течение 60 минут. Далее проводили формирование второго слоя спейсера

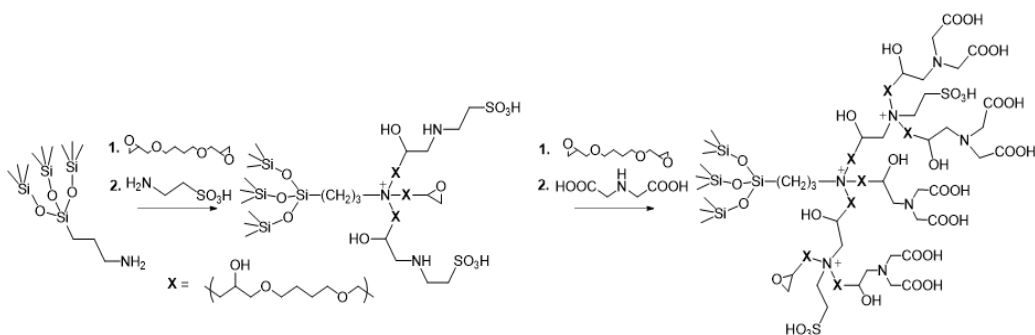


Рис. 1. Схема синтеза и предполагаемая структура гиперразветвленного цвиттер-ионного сорбента, модифицированного таурином и иминодиуксусной кислотой

Fig. 1. Synthesis scheme and the proposed structure of a hyperbranched zwitterionic adsorbent modified with taurine and iminodiacetic acid

с 1,4-БДДГЭ. В качестве второго цвиттер-ионного слоя вводили иминодиуксусную кислоту (рис.1). Количество добавляемых реагентов при закреплении второго слоя увеличивали в два раза.

Результаты элементного анализа для промежуточных этапов синтеза гиперразветвленного сорбента свидетельствовали о приросте функционального слоя в соответствии с увеличением доли углерода (от 5.84% С для матрицы до 12.65% С и 0.03% S после введения первого слоя спейсера и таурина, 13.77% С после 2 цикла модифицирования 1,4-БДДГЭ и 14.28% после закреплении иминодиуксусной кислоты), а содержание серы являлось показателем успешного введения таурина в структуру сорбента.

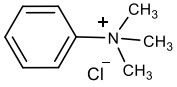
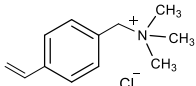
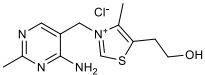
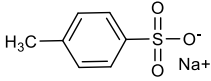
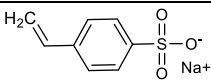
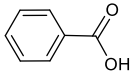
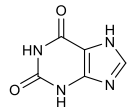
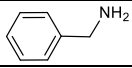
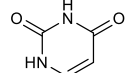
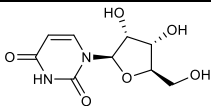
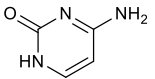
Заполнение хроматографической колонки проводили под давлением 250 бар, используя суспензию сорбента в растворе состава 0.1М KCl : этанол : 1,4-диоксан в соотношении 5:4:1. В качестве подвижной фазы использовали предварительно дегазированный ацетонитрил. Для набивки колонки использовали хлорид калия ч. д. а. (Panreac, Испания); этанол ч.д.а. (Лабтех, Россия); 1,4-диоксан ч.д.а. (Компонент-Реактив, Россия).

Подвижная фаза. В качестве компонентов подвижной фазы использовали ацетонитрил для ВЭЖХ «Компонент-реактив», деионизованную воду (Merck Millipore). Для создания буферных систем с требуемым значением pH использовали ледяную уксусную кислоту (99.5%) Panreac, Испания; муравьиную кислоту (99.7%, Россия), гидроксид натрия ч.д.а. (Россия). Значения pH измеряли как в водном растворе ( $^w\text{pH}$ ), так и в подвижной фазе, содержащей 90 об.% ацетонитрила ( $^s\text{pH}$ ) [18], с использованием pH-метра, калиброванного по водным стандартным растворам. Доверительный интервал для  $^s\text{pH}$  составил  $\pm 0.1$ . Для создания  $^w\text{pH}$  2.85 ( $^s\text{pH}$  5.5) использовали муравьиную кислоту ( $^w\text{pK}_a$  3.75) с общей концентрацией в водной части

элюента 112, 224, 447 мМ, соответствующей концентрации элюирующего аниона в подвижной фазе [ЭИ] – 5, 2.5, 1.25 мМ соответственно. Уксусную кислоту ( $^w\text{pK}_a$  4.76) использовали для создания 104 мМ буферного раствора с  $^w\text{pH}$  4.26 ( $^s\text{pH}$  7.6) ([ЭИ] = 2.5 мМ), а также для буферных систем с  $^w\text{pH}$  5.76 ( $^s\text{pH}$  9.2) и общей концентрации до добавления ацетонитрила, равной 27.5, 55, 82.5 мМ и соответствующей концентрации элюирующего иона в подвижной фазе 2.5, 5, 7.5 мМ. Буферные растворы готовили *in situ* путем титрования раствора кислоты 0.5 М раствором гидроксида натрия, используя pH-метр «pH-420» («Аквилон», Россия), калиброванный по трем стандартным водным растворам со значениями  $^w\text{pH}$  4.01, 6.86 и 9.18.

Тестовые соединения. Изучение взаимодействий сорбат-сорбент при изменении состава подвижной фазы проводили на основании измерения факторов удерживания 11 тестовых соединений различных классов (табл. 1), включающих катионы (TMPAC, VBTMAC, B1), анионы (SPTS, SPSS), слабые кислоты (ксантин, бензойная кислота), слабые основания (бензиламин), а также нейтральные вещества (урацил, уридин, цитозин). При этом в каждой группе аналиты различались по своей гидрофильности в соответствии с параметром Ханша ( $\log P$ ,  $\log D$ ) следующим образом: VBTMAC < TMPAC < B1; SPSS < SPTS; урацил < уридин < цитозин. Для веществ, способных изменять заряд в зависимости от кислотности среды, были рассчитаны коэффициенты распределения в системе n-октанол/вода для двух форм их существования в растворе. Факторы удерживания всех соединений рассчитывали относительно времени удерживания толуола х. ч. (Компонент-Реактив, Россия), соответствующего маркеру мертвого времени в режиме гидрофильной хроматографии. Пробы готовили в смеси вода/ацетонитрил 10/90 об.%, соответствующей составу подвижной фазы. Времена удерживания тестовых аналитов

Таблица 1. Структурные формулы исследуемых соединений, физико-химические свойства, концентрации в индивидуальных растворах и в модельной смеси  
 Table 1. Structures of the test compounds, their physicochemical properties, and the concentrations in single runs and in the mixture

Соединение	Структурная формула	logP*	$w_p K_a^*$	logD*	Концентрация в индивидуальном растворе, мг/дм <sup>3</sup>	Концентрация в смеси, мг/дм <sup>3</sup>
ТМРАС, хлорид триметилфениламмония		-	-	-1.45	100	130
ВТМАС, хлорид (α-винилбензил)-триметиламмония		-	-	-1.22	100	-
В1, тиамин		-	-	-4.20	100	2
SPTS, п-толуолсульфонат натрия		-	-	-2.57	100	235
SPSS, п-стиролсульфонат натрия		-	-	-3.39	100	-
бензойная кислота		1.56	4.20	-1.59	100	120
ксантин		-0.73	7.60	-1.13	10	10
бензиламин		1.36	9.33	-1.74	500	100
урацил		-1.04	-	-	100	-
уридин		-1.58	-	-	100	5
цитозин		-1.73	-	-	10	10

\*параметры рассчитаны при помощи функционала программы ACD/Labs 12.01 (Канада). Величины logD относятся к заряженным формам соединений.

устанавливали по хроматограммам для индивидуальных растворов.

Оценка вклада ионного обмена. Для заряженных соединений получали зависимости факторов удерживания от концентрации элюирующего иона [ЭИ] в

форме уравнения ионного обмена:  $k' = f(1/[ЭИ])$ . При экстраполяции на бесконечно большую концентрацию ЭИ, когда ионный обмен полностью подавлен,  $k'_{IEX} = 0$ , были получены факторы удержи-

вания, вызванные неэлектростатическими взаимодействиями  $k'_{ГИХ}$  [19,20]. Принимая постоянными величины  $k'_{ГИХ}$ , определяли вклады ионного обмена в удерживание соединений для всех значений концентрации элюирующего иона. При этом общее удерживание рассматривали как сумму  $k'_{ГИХ}$  и  $k'_{ИЕХ}$ .

Для ионизируемых в исследуемом диапазоне кислотности соединений также рассчитывали влияние электростатических взаимодействий на общее изменение удерживания  $\Delta k'_{ИЕХ}/\Delta k'$  при варьировании pH:

$$\frac{\Delta k'_{ИЕХ}(pH_1 \rightarrow pH_2)}{\Delta k'} = \frac{k'_{ИЕХ}(pH_2) - k'_{ИЕХ}(pH_1)}{k'_{2}(pH_2) - k'_{1}(pH_1)} = \frac{(k'_{2}(pH_2) - k'_{ГИХ}(pH_2)) - (k'_{1}(pH_1) - k'_{ГИХ}(pH_1))}{k'_{2}(pH_2) - k'_{1}(pH_1)}$$

где  $k'_{ГИХ}$  – соответствует свободному члену зависимости в форме уравнения ионного обмена.

**Оборудование.** Для проведения синтеза сорбента использовали следующее оборудование: термостат («Mettmert», Германия), водоструйный насос, мешалка Metrohm 802, термостатируемый сосуд для титрования Metrohm на 150 см<sup>3</sup>. В работе использовали стальную колонку размером 100 × 3 мм, которую заполняли при помощи пневмонасоса Knauer K-1900 (Knauer, Германия) с воздушным компрессором Fini (Италия).

Для отбора точной аликвоты использовали автоматические дозаторы LAVMATE объемом 10-100, 20-200, 100-1000 и 1000-5000 мкл с пределом допустимой погрешности измерения не более ±5% («HTL», Польша). Взятие навесок проводили на весах Explorer Pro («Ohaus Corporation», США), точность которых составляла 0.0001 г.

Для проведения хроматографического эксперимента использовали: жидкостной хроматограф Vanquish Flex с флуоресцентным детектором FLD и диодно-матричным детектором DAD (Thermo Scientific, США); жидкостной хроматограф Dionex UltiMate 3000, оснащенный четырехканальным градиентным насосом, ав-

томатической системой ввода пробы, термостатом колонки, диодным спектрофотометрическим детектором. Хроматограммы регистрировали с помощью персонального компьютера и программного пакета Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, США). Также применяли элементный анализатор PerkinElmer 2400 Series II CHNS Elemental Analyzer (PerkinElmer, Boston, США).

### Обсуждение результатов

В результате проведения модифицирования 3-аминопропилсиликагеля в соответствии со схемой на рис. 1 был получен новый цвиттер-ионный сорбент с гиперразветвленным функциональным слоем, во внутреннем слое которого содержались сильнокислотные сульфогруппы, во внешнем – карбоксильные, сформированные с использованием иминодиуксусной кислоты. Исходя из предполагаемой структуры продукта синтеза, можно ожидать наличие постоянного положительного заряда за счет кватернизованного азота и отрицательного заряда за счет депротонированных сульфогрупп. Может возникнуть дополнительный отрицательный заряд при увеличении pH из-за диссоциации карбоксильных групп в структуре слоя, а также остаточных силанольных групп матрицы. Кроме того, в функциональном слое возможно присутствие аминокрупп разной степени замещенности, величины  ${}^w pK_a(BH^+)$  которых лежат в диапазоне 9-10. Однако, в подвижной фазе, насыщенной ацетонитрилом, эти величины снижены [21], поэтому ожидаемо уменьшение эффективного положительного заряда за счет депротонирования аминокрупп при увеличении  ${}^w pH$  уже в выбранном рабочем диапазоне.

Для демонстрации свойств новой неподвижной фазы и изучения характера взаимодействий сорбат-сорбент варьировали два параметра подвижной фазы:

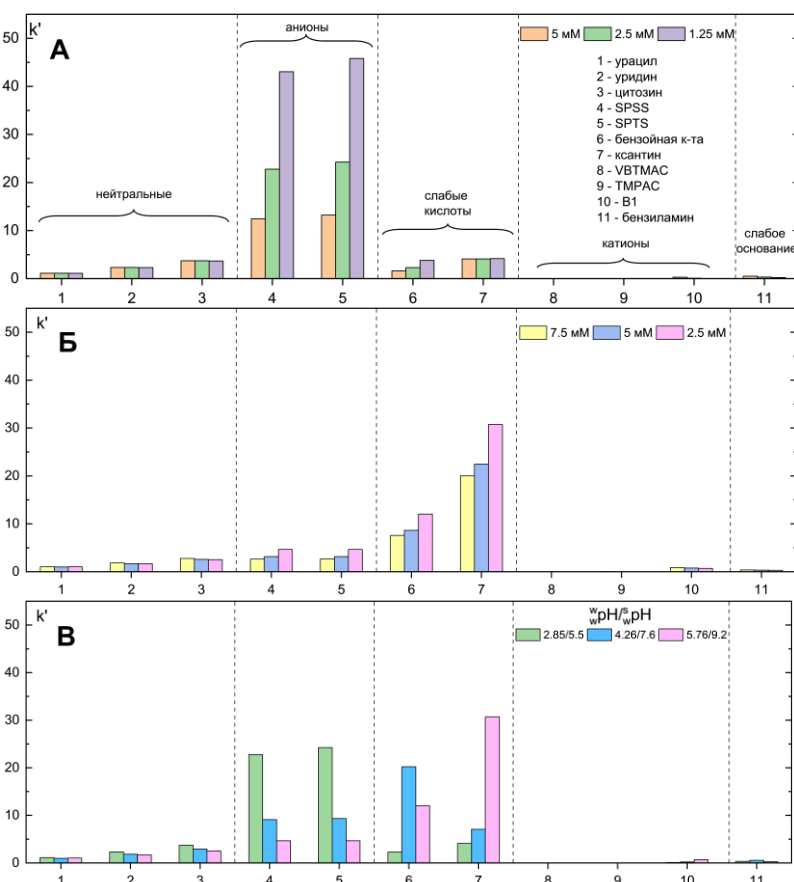


Рис. 2. Величины факторов удерживания тестовых соединений: А) при  $w_{pH}$  2.85 в диапазоне концентраций элюирующего иона 1.25-5 мМ; Б) при  $w_{pH}$  5.76 в диапазоне концентраций элюирующего иона 2.5-7.5 мМ; В) в диапазоне значений  $w_{pH}$  2.85-5.76 ( $s_{pH}$  5.5-9.2) при концентрации элюирующего иона 2.5 мМ. Все концентрации относятся к подвижной фазе. Условия: неподвижная фаза – Т-Б-ИД (размер колонки 3×100 мм); подвижная фаза - формиатный  $w_{pH}$  2.85 или ацетатный  $w_{pH}$  4.26 или 5.76 буферный раствор / ацетонитрил 10/90 об.%; скорость потока 1 см<sup>3</sup>/мин; УФ-детектирование при 254 нм.

Fig. 2. Retention factors of the test compounds: A) at  $w_{pH}$  2.85 in the range of eluting ion concentrations 1.25-5 mM; B) at  $w_{pH}$  5.76 in the range of eluting ion concentrations 2.5-7.5 mM; C) in the range of  $w_{pH}$  2.85-5.76 ( $s_{pH}$  5.5-9.2) at eluting ion concentration 2.5 mM. All concentrations belong to the mobile phase. Conditions: stationary phase – T-B-ID (column size 3×100 mm); mobile phase – formate  $w_{pH}$  2.85 or acetate  $w_{pH}$  4.26 or 5.76 buffer solution / acetonitrile 10/90 vol.%; flow rate 1 cm<sup>3</sup>/min; UV detection at 254 nm

кислотность и концентрацию элюирующего иона. Для установления изолированного влияния каждого из факторов остальные условия фиксировали. В результате получили зависимости факторов удерживания тестовых анализов (табл. 1) от кислотности подвижной фазы. При  $w_{pH}$  2.85 и 5.76 оценили влияние концентрации элюирующего иона на удерживание выбранных модельных веществ разных классов.

Варьирование концентрации при  $w_{pH}$  2.85. При низком  $w_{pH}$  подвижной фазы, равном 2.85 ( $s_{pH}$  5.5), своё влияние на удерживание ионизированных соединений могут проявлять разделенные в пространстве положительно заряженные аммониевые- и аминогруппы, полученные при формировании первого и второго слоя спейсера в гиперразветвленной структуре (рис. 1), и отрицательно заряженные сульфогруппы во внутреннем



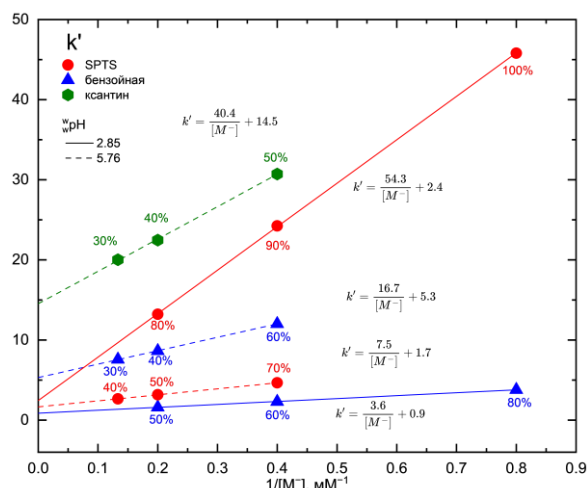


Рис. 3. Зависимости  $k' = f(1/[M^-])$ , полученные при  $w_pH$  2.85 и 5.76 для диапазона концентраций элюирующего иона 1.25-5 и 2.5-7.5 мМ соответственно. Проценты относятся к величине вклада ионного обмена в удерживание соединения. Коэффициенты корреляции  $r$  для всех зависимостей равны 1.000. Остальные условия приведены в подписи к рис. 2.

Fig. 3. Dependencies  $k' = f(1/[M^-])$  obtained at  $w_pH$  2.85 and 5.76 for the range of eluting ion concentrations 1.25-5 and 2.5-7.5 mM, respectively. The percentages refer to impact of ion exchange mechanism to the compound retention. Correlation coefficients  $r$  for all dependencies are 1.000. Other conditions are presented in the Fig. 2 caption.

слое, что может приводить к преобладанию тех или иных ионообменных свойств. В данных условиях анионы сульфокислот имели высокие факторы удерживания ( $k'$  до 45), а катионы ТМРАС и ВВТМАС не удерживались (рис. 2А), что свидетельствовало о преобладании анионообменных свойств сорбента.

Для анионов и слабых кислот получили зависимости факторов удерживания от концентрации элюирующего иона в форме уравнения ионного обмена (рис. 3). Используя процедуру, описанную в Экспериментальной части (Оценка вклада ионного обмена), оценили их удерживание за счёт неэлектростатических взаимодействий  $k'_{ГИХ}$  (табл. 2), а также вклады ионного обмена (рис. 3). Было показано, что электростатические взаимодействия объясняют до 100% удерживания SPTS и SPSS при 1.25 мМ концентрации формиат-аниона в подвижной фазе. Полученные данные подтвердили предположение о характере свойств сорбента.

Для бензойной кислоты наблюдали аналогичное сульфатам увеличение

удерживания с уменьшением концентрации, при этом вклад ионного обмена в тех же условиях составил 80%. Однако, при  $w_pH$  2.85, если рассматривать степень диссоциации кислоты, опираясь на водную шкалу, в диссоциированной форме находилось около 4% молекул. Это справедливо и при рассмотрении степени диссоциации в растворе с содержанием ацетонитрила 90%, в котором  $w_pK_a$  кислоты равна примерно 6.8 [21]. При этом для ксантина с более высоким значением константы кислотности (табл. 1) вклад ионного обмена отсутствовал. Его фактор удерживания, как в случае нейтральных соединений, практически не зависел от концентрации элюирующего иона, что согласовалось с его нахождением в недиссоциированной форме при рассматриваемом  $w_pH$ . Слабое влияние концентрации на удерживание нейтральных соединений (рис. 2А) было вызвано незначительным увеличением толщины приповерхностного водного слоя [17], определяющей реализацию распределительного механизма удерживания.

Таблица 2. Факторы удерживания  $k'$  анионов и слабых кислот при 2.5 мМ концентрации элюирующего иона и  $w\text{pH}$  2.85, 5.76, факторы удерживания  $k'_{\text{ГИХ}}$  за счёт неэлектростатических взаимодействий, соответствующие свободным членам в уравнениях на рис. 3, относительное изменение факторов удерживания  $\Delta k'_{\text{IEХ}}/\Delta k'$ , вызванное электростатическими взаимодействиями. Остальные условия приведены в подписи к рис. 2

Table 2. Retention factors  $k'$  of the anions and weak acids at 2.5 mM concentration of the eluting ion and  $w\text{pH}$  2.85, 5.76, retention factors  $k'_{\text{НЛЭС}}$  due to non-electrostatic interactions corresponding to the free terms in the equations in Fig. 3, relative change in retention factors  $\Delta k'_{\text{IEХ}}/\Delta k'$  caused by electrostatic interactions. Other conditions are presented in the Fig. 2 caption

$w\text{pH}/s\text{pH}$ соединения	2.85/5.5		5.76/9.2		$\Delta k'_{\text{IEХ}}/\Delta k'$ , %
	$k'$	$k'_{\text{ГИХ}}$	$k'$	$k'_{\text{ГИХ}}$	
SPSS	22.8	2.3	4.7	1.6	-100
SPTS	24.3	2.4	4.7	1.7	-100
бензойная кислота	2.3	0.9	12.0	5.3	50
ксантин	4.1	4.1	30.7	14.5	60

Возможное объяснение высокого вклада ионного обмена в удерживание практически недиссоциированной бензойной кислоты может быть связано со смещением положения кислотно-основного равновесия за счёт процесса обмена противоионов подвижной фазы на бензоат-анионы у заряженных центров неподвижной фазы. Результирующее время удерживания вещества при этом представляет взвешенное среднее от времен удерживания каждой из его форм [15, 21]. Для подтверждения данного предположения будут проведены дополнительные эксперименты по оценке величины константы ионного обмена.

Среди группы катионов незначительно удерживался тиамин, обладающий высокой гидрофильностью ( $\log D -4.2$ ), а также протонированный при данном  $w\text{pH}$  бензиламин (рис. 2А). При этом было отмечено снижение факторов удерживания витамина В1 и бензиламина вплоть до элюирования с мертвым объемом при уменьшении концентрации буферного раствора, что связано с ослаблением экранирования положительного заряда на поверхности сорбента и, как следствие, увеличением электростатического отталкивания одноименных зарядов. Ионного обмена для катионов за счёт вза-

имодействия с отрицательно заряженными сульфогруппами не наблюдали, что свидетельствовало об однозначном преобладании анионообменных свойств неподвижной фазы.

Эффективность для анионов и бензойной кислоты увеличивалась на 20% с уменьшением концентрации буферного раствора в 4 раза (табл. 3). Для нейтральных соединений из класса азотистых оснований и нуклеозидов (урацил, уридин, цитозин, ксантин) рассчитанная эффективность имела близкие значения, которые были в 1.5-2 раза ниже таковых для анионов. Для тиамина и бензиламина, на удерживание которых влияло отталкивание от заряженных групп сорбента, наблюдали низкую эффективность. Наилучшая симметрия пиков всех веществ была получена при наибольшей концентрации формиата в подвижной фазе.

При  $w\text{pH}$  2.85 ( $s\text{pH}$  5.5) для трех концентраций элюирующего иона в подвижной фазе получили хроматограммы модельной смеси (табл. 1), содержащей 8 соединений разных классов и заряда (рис. 4А). Стоит отметить, что порядок элюирования веществ из одной группы (нейтральных и отрицательно заряженных соединений) согласовался с их гидрофильностью, что свидетельствовало о

Таблица 3. Эффективность колонки (тп/м) при  $w_pH$  2.85; 4.26; 5.76 в соответствующих диапазонах концентрации элюирующего иона в подвижной фазе. Остальные условия приведены в подписи к рис. 2

Table 3. Efficiency (tp/m) at  $w_pH$  2.85; 4.26; 5.76 in the corresponding concentration ranges of the eluting ion in the mobile phase. Other conditions are presented in the Fig. 2 caption.

$w_pH / s_pH$	2.85/5.5			4.26/7.6	5.76/9.2		
Концентрация ЭИ, мМ	5	2.5	1.25	2.5	7.5	5	2.5
SPSS	31000	36000	37000	23000	14000	10000	3000
SPTS	29000	35000	36000	18000	12000	9000	4000
бензойная к-та	10000	10000	15000	34000	25000	27000	30000
ксантин	19000	22000	19000	12000	21000	22000	24000
урацил	15000	17000	14000	14000	17000	16000	15000
уридин	16000	19000	16000	15000	17000	16000	15000
цитозин	20000	23000	19000	19000	21000	20000	18000
B1	7000	7000	5000	6000	8000	7000	6000
бензиламин	6000	5000	3000	6000	8000	8000	7000

влиянии распределения на их удерживание.

Полного разделения смеси при данной кислотности подвижной фазы добиться не удалось. Во всём рассматриваемом диапазоне концентраций формиат-аниона пара веществ тиамин-бензиламин не разделялась, что было вызвано их слабым удерживанием при рассматриваемом pH вследствие отталкивания. Также не удалось добиться разрешения до базовой линии цитозина и ксантина, что связано с малой эффективностью воздействия концентрации буферного раствора на селективность их разделения. Разрешение максимально возможного при данном pH числа компонентов за меньшее время (8 мин) было получено при наибольшей из рассматриваемых концентраций (рис. 4А), при которой отмечена лучшая симметрия пиков.

Таким образом, высокая анионообменная способность сорбента при  $w_pH$  2.85 обуславливает его сепарационные возможности в данных условиях. При низком pH среды эффективным инструментом управления удерживанием анионов и слабых кислот является изменение концентрации элюирующего иона, тогда как разделение положительно заряженных веществ невозможно.

Варьирование концентрации при  $w_pH$  5.76. Рассматривая электростатические взаимодействия при  $w_pH$  5.76 ( $s_pH$  9.2), следует принимать во внимание не только постоянные заряды четвертичного азота и сульфогрупп в функциональном цвиттер-ионном слое сорбента, но и возникающий отрицательный заряд за счёт диссоциации карбоксильных групп во внешнем функциональном слое. Кроме того, часть аминогрупп меньшей степени замещения может депротонироваться, включая внутренние группы в гиперразветвленном слое и непрореагировавшие аминогруппы матрицы. Стоит также учитывать возможное влияние остаточных силанольных групп, константа кислотности  $w_pK_a$  которых находится в диапазоне от 4 до 7 [22]. Однако, несмотря на предполагаемую компенсацию положительного заряда, на полученном цвиттер-ионном сорбенте при данном pH катионы практически не удерживались, что свидетельствовало об их электростатическом отталкивании (рис. 2Б).

Для анионов сульфокислот в данных условиях по аналогии с  $w_pH$  2.85 наблюдали увеличение факторов удерживания с уменьшением концентрации ацетат-иона в подвижной фазе. Однако при  $w_pH$  5.76 вклад ионного обмена составил 70% для концентрации 2.5 мМ ЭИ в элюенте (рис. 3),

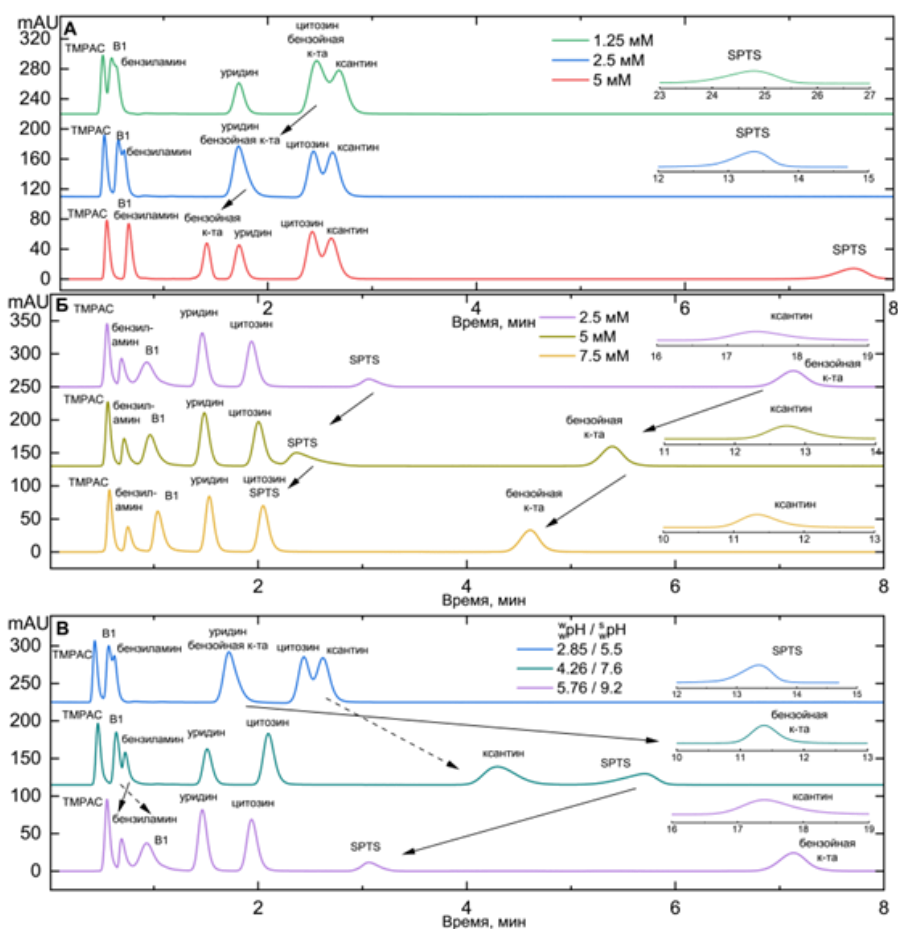


Рис. 4. Хроматограммы модельной смеси соединений (табл. 2): А) при  $w_{pH}$  2.85 в диапазоне концентраций элюирующего иона 1.25-5 мМ; Б) при  $w_{pH}$  5.76 в диапазоне концентраций элюирующего иона 2.5-7.5 мМ; В) в диапазоне значений  $w_{pH}$  2.85-5.76 ( $s_{pH}$  5.5-9.2) при концентрации элюирующего иона 2.5 мМ. Все концентрации относятся к подвижной фазе. Остальные условия приведены в подписи к рис. 2.

Fig. 4. Chromatograms of the model mixture of compounds (Table 2): A) at  $w_{pH}$  2.85 in the range of eluting ion concentrations 1.25-5 mM; B) at  $w_{pH}$  5.76 in the range of eluting ion concentrations 2.5-7.5 mM; C) in the range of  $w_{pH}$  2.85-5.76 ( $s_{pH}$  5.5-9.2) at eluting ion concentration 2.5 mM. All concentrations belong to the mobile phase. Other conditions are presented in the Fig. 2 caption

что, вероятно, вызвано частичным экранированием положительного заряда отрицательно заряженными карбокси-,сульфо- и, возможно, силанольными группами, а также уменьшением количества протонированных первичных, вторичных и третичных аминогрупп. Аналогичный тренд был получен для бензойной кислоты и ксантина, при этом вклад ионного обмена был более близок к таковому для анионов по сравнению с  $w_{pH}$  2.85 (рис. 3). Данные наблюдения свидетель-

ствовали о нахождении веществ в диссоциированной форме. Для бензойной кислоты это согласовалось с её константами кислотности как в водной, так и в водно-органической среде (табл. 1). Однако для ксантина величина  $w_{pK_a}$  составляет 7.60, его диссоциация при  $w_{pH}$  5.76 водного буферного раствора теоретически не ожидается, а величина  $s_{pK_a}$  на данный момент не установлена. Полученные результаты выявляют неочевидные смещения положений равновесия в водно-орга-

нической среде и позволяют лучше прогнозировать условия разделения веществ разных классов в одном анализе. Кроме того, необходимо отметить, что факторы удерживания бензоата и ксантина были значительно выше факторов, полученных для сульфокислот, что не согласовалось с величинами параметра Ханша для данных веществ (табл. 1). Вероятно, подобное отклонение вызвано вкладом иных адсорбционных взаимодействий в удерживание бензойной кислоты и ксантина. Для нейтральных соединений при  $w\text{pH}$  5.76 сохранилась аналогичная тенденция незначительного ослабления удерживания с уменьшением концентрации буферного раствора в элюенте, вызванное утончением приповерхностного водного слоя [17].

В данных условиях наблюдали иную зависимость эффективности пиков от концентрации. Для анионов получено существенное увеличение эффективности с 3000 до 14 000 тт/м и улучшение симметрии пиков при возрастании концентрации ЭИ в подвижной фазе (табл. 3). Подобное изменение хроматографических параметров связано с экранированием заряда сорбента и уменьшением вклада ионного обмена в удерживание этих аналитов. Для диссоциированных в данных условиях бензойной кислоты и ксантина получена обратная зависимость: при 2.5 мМ ЭИ эффективность достигала наибольших значений – 30 000 и 24 000 тт/м соответственно. Для нейтральных соединений значимого изменения эффективности не наблюдали.

При разделении модельной смеси в данных условиях при варьировании концентрации удалось полностью разрешить пики цитозина и аниона SPTS за счет увеличения вклада ионного обмена в удерживание последнего (рис. 4Б). Полное разрешение восьми соединений разной гидрофильности и заряда при приемлемой эффективности и асимметрии пиков достигнуто за 14 минут при использовании подвижной фазы, содержащей 5 мМ

ацетат-иона. Таким образом, за счёт меньшей анионообменной способности неподвижной фазы при  $w\text{pH}$  5.76 элюента удалось обеспечить большее удерживание и высокую селективность разделения положительно заряженных аналитов, а также существенно снизить времена выхода анионов. Кроме того, при данной кислотности подвижной фазы стало возможным управление удерживанием не только аналитов с фиксированным зарядом, но и дополнительно слабых кислот различной силы.

**Варьирование pH.** При варьировании  $w\text{pH}$  в диапазоне 2.85-5.76 могут происходить изменения степени диссоциации некоторых групп цвиттер-ионного сорбента (карбоксильных, силанольных и аминок групп) и анализируемых соединений, значения  $pK_a$  которых соответствуют данной области кислотности. Переход веществ из нейтрального состояния в заряженное влияет на характер их взаимодействия с неподвижной фазой и, как результат, изменяется их удерживание и селективность разделения.

С увеличением pH подвижной фазы наблюдали постоянное снижение факторов удерживания анионов SPTS и SPSS, что может быть связано с повышением эффективного отрицательного заряда в функциональном слое сорбента, вызванного диссоциацией карбоксильных и остаточных силанольных групп, а также снижением числа протонированных аминок групп (рис. 2В). Аналогичные выводы также следовали из зависимости фактора удерживания гидрофильного катиона тиамина от  $w\text{pH}$ . Отмеченное уменьшение факторов удерживания анионов было практически полностью вызвано сокращением вклада ионного обмена в их удерживание с 90 до 70% (рис.3, табл. 2). При этом наблюдали незначительное снижение удерживания за счет неэлектростатических взаимодействий для анионов  $k'_{ГИХ}$  (табл. 2), по величине близкое к таковому для нейтральных соединений (рис. 2В), что, вероятно, было вызвано

снижением толщины приповерхностного водного слоя сорбента, принимающего непосредственное участие в механизме распределения, и возможным изменением адсорбционных взаимодействий. Стоит отметить, что для исходной матрицы 3-аминопропилсиликагеля снижение вклада ионного обмена в удерживание анионов при переходе от  $w_pH$  2.85 к 5.76 составило менее 10%. Поскольку для цвиттер-ионного сорбента вклад уменьшился значительно, то можно предположить, что это связано не только со снижением доли протонированных аминокрупп и ростом доли диссоциированных силанолов, как в случае исходной матрицы. Существенное влияние оказало возрастание величины отрицательного заряда на его поверхности, вызванное диссоциацией карбоксильных групп функционального слоя.

Для бензойной кислоты зависимость фактора удерживания от рН проходила через максимум, при этом вклад ионного обмена в её удерживание при переходе от  $w_pH$  2.85 к 5.76 сохранялся на одном уровне. При  $w_pH$  2.85 подвижной фазы кислота была слабо диссоциирована, а при  $w_pH$  4.26 ионизация приводила к увеличению её гидрофильности и электростатического притяжения к неподвижной фазе, что одновременно вносило вклад в возрастание фактора удерживания. При последующем увеличении  $w_pH$  наблюдали тенденцию, аналогичную таковой для анионов. Однако, механизм удерживания бензойной кислоты и сульфонов отличается. Путём сравнения величин факторов удерживания бензойной кислоты за счёт ионного обмена и неэлектростатических взаимодействий (распределения и адсорбции) при  $w_pH$  2.85 и 5.76 установили, что увеличение удерживания в равной степени вызвано изменением силы взаимодействий электростатической и неэлектростатической природы:  $\Delta k'_{IEH}/\Delta k' = 50\%$  (табл. 2). В случае ксантина, который является более слабой кис-

лотой, чем бензойная, наблюдали возрастание вклада ионного обмена в его удерживание от 0 до 50% в диапазоне  $w_pH$  2.85-5.76, при этом увеличение фактора удерживания было на 60% вызвано усилением взаимодействий электростатической природы (рис.3, табл. 2). Уменьшение удерживания ксантина, характерное для других анионов, в рассматриваемом диапазоне рН не наблюдали, что, вероятно, вызвано преобладанием гидрофильных взаимодействий, вызванных увеличением степени диссоциации молекулы аналита. Можно предположить, что дальнейшее возрастание рН приведёт к изменению тренда для фактора удерживания ксантина. Однако максимально допустимое рабочее значение рН для сорбентов на основе силикагеля составляет 7-8.

Для анионов и слабых кислот, факторы удерживания которых на данной колонке в наибольшей степени зависят от рН, отмечено увеличение эффективности при возрастании факторов их удерживания. Наилучшие значения хроматографических параметров для анионов и нейтральных соединений получены при  $w_pH$  2.85 подвижной фазы (табл. 3).

Катионы, содержащие гидрофобные фрагменты в структуре, как было показано выше, не удерживаются в рассматриваемых условиях, что вызвано преобладанием анионообменных свойств цвиттер-ионной неподвижной фазы. Слабое основание бензиламин имело низкий фактор удерживания во всем диапазоне рН, наибольшее значение которого было получено при  $w_pH$  4.26. По-видимому, на характере его взаимодействий с неподвижной фазой также сказывалось изменение эффективного заряда сорбента и собственной степени диссоциации.

На хроматограммах модельных смесей при разных значениях  $w_pH$  и одинаковой концентрации элюирующего иона, равной 2.5 мМ в подвижной фазе, продемонстрировано, как влияет изменение заряда аналита и функциональных групп сор-

бента на селективность разделения и разрешение пиков (рис. 3В). При  $w_pH$  2.85 не удалось разделить пары цитозин-ксантин и уридин-бензойная кислота из-за схожего удерживания нейтральных соединений и практически недиссоциированных слабых кислот, а также пару тиамин-бензиламин, элюирующуюся вблизи мёртвого времени вследствие одинакового заряда и значительного отталкивания от функционального слоя сорбента. При повышении  $w_pH$  в соответствии с процессами, подробно рассмотренными выше, происходило улучшение селективности разделения. Так, при  $w_pH$  4.26 нейтральные и отрицательно заряженные компоненты смеси разделялись до базовой линии за 12 мин с эффективностью от 12000 до 22000 тт/м и хорошей симметрией пиков. Разрешения слабоудерживаемых бензиламина и тиамина удалось добиться при  $w_pH$  5.76 благодаря меньшему отталкиванию от положительно заряженных центров сорбента, что позволило провести анализ модельной смеси соединений разных классов за 19 мин.

Таким образом, варьирование кислотности и концентрации буферного раствора в подвижной фазе являются важными инструментами для обеспечения высокой эффективности и селективности разделения многокомпонентных смесей, содержащих вещества различных кислотно-основных свойств, на гиперразветвленной цвиттер-ионной колонке в режиме гидрофильной хроматографии.

### Заключение

В работе получен новый цвиттер-ионный сорбент на основе силикагеля с гиперразветвленным функциональным слоем, во внутреннем слое которого со-

держались сильнокислотные сульфогруппы, во внешнем – карбоксильные, сформированные с использованием иминодиуксусной кислоты.

Состав подвижной фазы, а именно, показатель кислотности и концентрация элюирующего иона, являются ключевыми факторами влияния на удерживание и, как следствие, селективность разделения соединений различной природы в режиме гидрофильной хроматографии. Именно с помощью варьирования данных параметров необходимо проводить детальное описание свойств сорбента и его возможных взаимодействий с определяемыми соединениями. В диапазоне  $w_pH$  2.85-5.76 на синтезированной цвиттер-ионной неподвижной фазе обнаружено уменьшение удерживания органических анионов, вызванное преимущественно взаимодействиями электростатического характера, что позволило установить зависимость ионообменных свойств сорбента от pH. Изменение удерживания слабых кислот зависело от их  $w_pK_a$ , однако оно в первую очередь объяснялось ростом их собственной степени диссоциации при увеличении pH среды. Независимое варьирование  $w_pH$  и концентрации элюирующего иона в подвижной фазе позволило детальнее рассмотреть возникающие эффекты изменения селективности и добиться полного разделения модельной смеси соединений разных классов.

### 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. Hemström P., Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* 2006; 29(12): 1784-1821.

2. Buszewski B., Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 402(1): 231.

3. Guo Y., Gaiki S. Retention and selectivity of stationary phases for



- hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2011; 1218(35): 5920-5938.
4. Qiu J., Craven C., Wawryk N., Carroll K., Li X.-F. Integration of solid phase extraction with HILIC-MS/MS for analysis of free amino acids in source water. *J. Environ. Sci.* 2022; 117: 190-196.
  5. Soukup J., Jandera P. Adsorption of water from aqueous acetonitrile on silica-based stationary phases in aqueous normal-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2014; 1374: 102-111.
  6. Chirita R.I., West C., Zubrzycki S., Finaru A.-L., Elfakir C. Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2011; 1218(35): 5939-5963.
  7. Nesterenko E.P., Nesterenko P.N., Paull B. Zwitterionic ion-exchangers in ion chromatography: A review of recent developments *Anal. Chim. Acta.* 2009; 652(1-2): 3-21.
  8. Chen D., Shi F., Zhou Y., Xu W., Shen H., Zhu Y. Hyperbranched anion exchangers prepared from polyethylene polyamine modified polymeric substrates for ion chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2021; 1655: 462508.
  9. Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N. Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency. *J. Chromatogr. A.* 2011; 1218(35): 5903-5919.
  10. McCalley D.V. Study of retention and peak shape in hydrophilic interaction chromatography over a wide pH range. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1411: 41-49.
  11. McCalley D.V. A study of the analysis of acidic solutes by hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2018; 1534: 64-74.
  12. McCalley D.V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J. Chromatogr. A.* 2007; 1171: 46-55.
  13. McCalley D.V. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2010; 1217(20): 3408-3417.
  14. Iverson C.D., Gu X., Lucy C.A. The hydrophilicity vs. ion interaction selectivity plot revisited: The effect of mobile phase pH and buffer concentration on hydrophilic interaction liquid chromatography selectivity behavior. *J. Chromatogr. A.* 2016; 1458: 82-89.
  15. Alvarez-Segura T., Subirats X., Rosés M. Retention-pH profiles of acids and bases in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 2019; 1050: 176-184.
  16. Jovanović M., Stojanović B.J. Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2013; 1301: 27-37.
  17. Guo Y., Bhalodia N., Fattal B., Serriset I. Evaluating the adsorbed water layer on polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Separations.* 2019; 6(2): 19.
  18. Subirats X., Rosés M., Bosch E. On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pKa of analytes – A review. *Separation and Purification Reviews.* 2007; 36(3): 231-255.
  19. Cox G.B., Stout R.W. Study of the retention mechanism for basic compounds on silica under “pseudo-reversed-phase” conditions. *J. Chromatogr. A.* 1987; 384: 315-336.
  20. Greco G., Grosse S., Letzel T. Study of the retention behavior in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids. *J. Chromatogr. A.* 2012; 1235: 60-67.





21. Subirats X., Casanovas L., Redón L., Rosés M. Effect of the solvent on the chromatographic selectivity in reversed-phase and HILIC. *Adv. Sample Prep.* 2023; 6: 100063.

22. Kumar A., Heaton J.C., McCalley D.V. Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2013; 1276: 33-46.

### Информация об авторах / Information about the authors

**Г.С. Максимов** – студент, техн. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

**А.О. Шемякина** – аспирант, м.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

**А.С. Ужель** – к.х.н., с.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

**А.В. Чернобровкина** – к.х.н., доцент, кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

**G.S. Maksimov** – student, technician, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

**A.O. Shemiakina** – the postgraduate student, Junior Researcher, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

**A.S. Uzhel** – Senior Researcher, Ph.D (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

**A.V. Chernobrovkina** – associate prof., Ph.D (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, E-mail: chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru

*Статья поступила в редакцию 24.04.2024; одобрена после рецензирования 14.06.2024; принята к публикации 19.06.2024.*

*The article was submitted 24.04.2024; approved after reviewing 14.06.2024; accepted for publication 19.06.2024.*