

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Пермский национальный исследовательский политехнический университет»

На правах рукописи

Степанова Мария Владимировна

Механизмы энантиоселективного удерживания хиральных веществ на
неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками
эремомицином, ристоцетином А и тейкопланином

1.4.4 – физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
доцент Аснин Л.Д.

Пермь 2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Механизмы энантиораспознавания в хиральной хроматографии.....	10
1.1.1. Теории хирального распознавания.....	10
1.1.2. Методы изучения механизмов энантиораспознавания	14
1.2. Механизмы удерживания в жидкостной хроматографии	21
1.2.1. Адсорбционный механизм	21
1.2.2. Распределительный механизм	23
1.2.3. Сольвофобная теория удерживания	24
1.2.4. HILIC механизм.....	24
1.2.5. Ионообменный механизм.....	26
1.2.6. Особенности механизмов удерживания в хиральной хроматографии	28
1.2.7. Влияние концентрации элюируемого вещества на фактор удерживания	30
1.2.8. Влияние вторичных равновесий на механизм удерживания	32
1.2.9. Термодинамика адсорбции на границе жидкость-твёрдое тело.....	36
1.2.10. Экстратермодинамические методы	41
1.3 Хиральные неподвижные фазы.....	44
1.3.1. Хиральные неподвижные фазы с привитыми антибиотиками	45
1.3.1.1. Эремомицин.....	49
1.3.1.2. Ристоцетин А	50
1.3.1.3. Тейкопланин	52
1.4. Хиральная хроматография исследуемых классов соединений.....	55
1.4.1. Хинолоны.....	55
1.4.2. Дипептиды	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	59
2.1. Объекты исследования	59
2.2. Оборудование	61
2.3. Методики исследования	61
2.3.1. Определение рН водно-органических ПФ.....	61

2.3.2. Измерение элюционных характеристик.....	63
2.3.3. Определение термодинамических характеристик адсорбции	64
2.3.4. Измерение изотерм адсорбции	65
ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМЫ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОГО УДЕРЖИВАНИЯ ОКСАЗОЛОПИРРОЛОХИНОЛОНОВ	67
3.1. Удерживание и разделение энантиомеров оксазолопирролохинолонов на неподвижных фазах Nautilus-E, Nautilus-R и Chirobiotic T	67
3.1.1. Влияние состава подвижной фазы.....	67
3.1.1.1. Колонка Nautilus-E	67
3.1.1.2. Колонка Nautilus-R.....	69
3.1.1.3. Колонка Chirobiotic-T	85
3.2. Термодинамика адсорбции оксазолопирролохинолонов на неподвижных фазах Nautilus-E и Nautilus-R	87
3.2.1. Колонка Nautilus-E	87
3.2.2. Колонка Nautilus-R.....	89
3.4. Изотермы адсорбции оксазолопирролохинолонов V и VI.....	92
ГЛАВА 4. МЕХАНИЗМЫ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОЙ АДСОРБЦИИ ДИПЕПТИДОВ.....	97
4.1. Удерживание и разделение стереоизомеров дипептидов на неподвижных фазах Nautilus-E, Nautilus-R и Chirobiotic R	97
4.1.1. Влияние состава подвижной фазы.....	97
4.1.2. Влияние pH подвижной фазы	108
4.1.3. Влияние индифферентного электролита	118
4.1.4. Сравнение хиральных неподвижных фаз Nautilus-R и Chirobiotic R.....	120
4.2. Термодинамика адсорбции дипептидов на неподвижных фазах Nautilus-E и Nautilus-R...	124
4.2.1. Колонка Nautilus-E	124
4.2.2. Колонка Nautilus-R.....	125
ВЫВОДЫ.....	134
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	135

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

КЭ – компенсационный эффект

МА – макроциклический антибиотик

МД – молекулярная динамика

ОПХ – оксазолопирролохинолоны

ПО – программное обеспечение

ПФ – подвижная фаза

ХНФ – хиральная неподвижная фаза

ННЛС – hydrophilic interaction chromatography

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Хиральная хроматография является широко используемым методом получения энантиомерно чистых веществ, необходимых для производства гомохиральных лекарственных препаратов. Создание эффективной хроматографической методики получения чистых энантиомеров из синтетической рацемической смеси требует знания механизмов хирального разделения энантиомеров, реализующихся в адсорбционной колонке. Изучение закономерностей хроматографического удерживания и разделения в зависимости от природы и состава элюента, а также температуры дает информацию о межмолекулярных взаимодействиях в колонке и структуре адсорбционных комплексов, которая представляет самостоятельный теоретический интерес.

В представленной работе рассматриваются хиральные неподвижные фазы (ХНФ) с привитыми гликопептидными макроциклическими антибиотиками (ристоцетин А, эремомицин, тейкопланин), которые хорошо зарекомендовали себя в хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Сложная структура подобных селекторов обеспечивает высокую вариативность процессов, проходящих на поверхности адсорбента, что позволяет эффективно разделять оптические изомеры разных хиральных веществ. Выбранные модельные вещества, дипептиды и оксазолопирролохинолоны (ОПХ), представляют разные классы соединений, вызывающие интерес в силу особенностей механизмов адсорбции и по причине практической важности, обусловленной их специфической биологической активностью. Дипептиды являются естественными объектами для энантиоразделения на макроциклических антибиотиках, поскольку природной мишенью последних является терминальный фрагмент белка бактериальной клеточной стенки – дипептид D-Ala-D-Ala. Таким образом, изучение хроматографического поведения дипептидов на данных ХНФ позволит лучше понять влияние структуры адсорбата на стерическую комплементарность к селектору и прочность образующихся адсорбционных комплексов. Кроме того, являясь амфолитными соединениями, дипептиды существуют в подвижной фазе (ПФ) в нескольких ионных состояниях. Это обстоятельство редко принимается во внимание в хиральной хроматографии слабых электролитов, но может играть в ней большую роль, что объясняет важность изучения этого фактора.

Цель работы. Выяснение механизмов энантиоселективной адсорбции энантиомеров дипептидов и оксазолопирролохинолонов на ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками эремомицином, ристоцетином А и тейкопланином из водно-органических буферных и безбуферных сред методом ВЭЖХ.

Задачи исследования:

1. Установить закономерности удерживания и разделения энантиомеров дипептидов и ОПХ в условиях жидкостной хроматографии на ХНФ с привитыми антибиотиками ристоцетином А, эремомицином и тейкопланином при элюировании водно-органическими растворителями. Разработать физически обоснованные математические модели, описывающие соответствующие закономерности.

2. Исследовать термодинамику адсорбции дипептидов и ОПХ на ХНФ с привитыми ристоцетином А и эремомицином.

3. Объяснить механизмы энантиоселективного взаимодействия дипептидов и ОПХ с привитыми хиральными селекторами ристоцетином А и эремомицином.

Научная новизна: В работе впервые:

- установлены закономерности удерживания и разделения энантиомеров дипептидов и ОПХ на ХНФ с привитыми антибиотиками ристоцетином А и эремомицином в условиях обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, объяснено влияние ионизации дипептидов на их удерживание и энантиоразделение;

- предложена модель адсорбции из бинарных растворителей, учитывающая участие обоих компонентов растворителя в процессах сольватации молекул адсорбтива в жидкой фазе и адсорбционных центров на поверхности твердой фазы;

- измерены термодинамические характеристики адсорбции дипептидов и ОПХ на указанных ХНФ из водно-органических растворителей;

- предложен механизм удерживания хиральных ОПХ на ХНФ с привитыми антибиотиками ристоцетином А и эремомицином.

Теоретическая и практическая значимость. Предложены механизмы адсорбции, объясняющие взаимодействие дипептидов и ОПХ с ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками. Объяснены механизмы влияния состава ПФ на хроматографическое удерживание ионизируемых и неионизируемых органических соединений на данных ХНФ. Предложена теоретическая модель, описывающая немонотонные зависимости фактора удерживания от состава ПФ. Определены оптимальные условия разделения энантиомеров дипептидов и ОПХ на антибиотиковых ХНФ, которые могут быть использованы в хроматографических методиках контроля состава энантиомерных смесей, а также для выделения и очистки индивидуальных энантиомеров.

Положения, выносимые на защиту:

1. Зависимости факторов удерживания и разделения энантиомеров дипептидов и ОПХ на ХНФ с привитыми антибиотиками ристоцетином А и эремомицином от состава и рН ПФ в условиях высокоэффективной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.
2. Объяснение влияния ионизации дипептидов на их удерживание и энантиоразделение на ХНФ с привитыми антибиотиками эремомицином и ристоцетином А.
3. Результаты исследования термодинамики адсорбции дипептидов и ОПХ на указанных ХНФ из водно-органических растворителей.
4. Модель адсорбции из бинарных растворителей и уравнение зависимости фактора удерживания элюируемого вещества от состава ПФ.
5. Механизм удерживания хиральных ОПХ на ХНФ с привитыми антибиотиками ристоцетином А и эремомицином, предполагающий вхождение оксазольного фрагмента молекулы адсорбата в хиральную полость селектора.

Методология и методы диссертационного исследования. Экспериментальная часть работы выполнена с использованием метода ВЭЖХ. Анализ полученных данных выполнялся с применением методов классической термодинамики (уравнения Вант-Гоффа и Гиббса-Гельмгольца), теории ионных равновесий в растворах и стехиометрической теории адсорбции.

Достоверность результатов обеспечивается использованием современных инструментальных методов исследования и анализа. Представленные в работе данные не противоречат ранее полученным экспериментальным результатам и известным теоретическим положениям; характеризуются хорошей сходимостью и воспроизводимостью.

Апробация результатов работы.

Результаты исследований докладывались на X Международной конференции молодых ученых по химии «Менделеев-2017» (Санкт-Петербург, 2017), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Физико-химические проблемы адсорбции в нанопористых материалах» (Москва, 2018), 48-м Международном симпозиуме по высокоэффективным жидкофазным разделениям и родственными методами «HPLC 2019» (Милан, 2019), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Химия. Экология. Урбанистика», (Пермь, 2019), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Химия. Экология. Урбанистика», (Пермь, 2020), IV Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2020).

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 13 работах. Список публикаций включает 6 статей, из них 5 в рекомендованных ВАК изданиях, и тезисы 7 докладов.

Личный вклад соискателя заключается в планировании, подготовке и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, осуществлении расчетов термодинамических характеристик адсорбции, выдвижении гипотез относительно механизмов адсорбции в исследованных системах, подготовке статей и научных докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей 2 главы, выводов и списка литературы, содержащего 207 источников. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 23 таблицы и 31 рисунок.

Благодарность. Автор выражает благодарность доценту кафедры химии и биотехнологии ПНИПУ Ботевой Анастасии Андреевне за синтез ОПХ и доценту кафедры аналитической химии ПГНИУ Васянину Александру Николаевичу за определение констант диссоциации некоторых дипептидов методом потенциометрического титрования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-33-90133 Аспиранты.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Хиральность – это свойство объекта не совпадать со своим отражением в идеально плоском зеркале. Для существования такого свойства у объекта не должно быть элементов симметрии. Соответственно молекулы, у которых отсутствуют элементы симметрии, являются хиральными. Такими могут быть как органические, так и неорганические (например, комплексные) соединения. Среди органических наиболее часто встречающийся тип хиральности связан с атомом углерода в состоянии sp^3 -гибридизации. При наличии четырёх разных заместителей такая молекула может существовать в двух формах, представляющих собой зеркальные отражения друг друга. Такие изомеры называют энантиомеры или оптические изомеры. Последнее наименование связано с тем, что энантиомеры проявляют оптическую активность – вращают плоскость поляризации плоскополяризованного света в разных направлениях. Эквимолярная смесь оптических изомеров называется рацемической и не проявляет оптической активности. Экспериментальное доказательство существования оптической изомерии было получено Луи Пастером в его классических экспериментах по разделению рацемической смеси тартрата натрия-аммония на индивидуальные энантиомеры [1]. Пастер же впервые отметил, что хиральность¹ является характеристическим свойством природных соединений [1]. Впоследствии, благодаря работам Пастера, Фишера и других [2; 3], было показано, что многие ферменты, контролирующие различные метаболические процессы, обладают энантиоселективной активностью, т.е. катализируют превращение только одной энантиоморфной формы хирального субстрата и инактивны по отношению к другой, а сами природные хиральные вещества, как правило, существуют только в одной энантиоморфной форме. Так, природные аминокислоты имеют L-конфигурацию; их D-энантиомеры встречаются крайне редко [4; 5]. Природные сахара существуют либо в D-форме (глюкоза, фруктоза, рибоза), либо в L-форме (рамноза, сорбоза). Таким образом, большинство метаболических процессов протекает либо с участием хиральных веществ, либо в хиральном окружении, и значительная их часть является стереоспецифическими. По этой причине действие синтетических хиральных веществ также будет иметь энантиоселективный характер. Как правило, только один из энантиомеров таких соединений проявляет требуемую биологическую активность. Соответственно производство только активного энантиомера будет иметь коммерческий смысл. Однако обычными (ахиральными) методами химического синтеза производят рацемические смеси и даже привлечение стереоселективных методов химического

¹ Пастер использовал термин «диссимметрия».

или биохимического синтеза редко приводит к получению 100% индивидуальных энантиомеров. Это обуславливает необходимость в технологиях разделения оптических изомеров: либо для препаративного выделения целевого энантиомера, либо для контроля качества конечного продукта. Еще одной областью применения таких методов являются физиологические и фармацевтические исследования биологической активности хиральных соединений. Именно необходимость проведения токсикологических и биологических испытаний индивидуальных энантиомеров синтетических хиральных лекарственных средств [2; 6] служила основным драйвером развития методов хирального разделения последние три десятилетия.

Одним из наиболее популярных методов разделения оптических изомеров для препаративных или аналитических целей в лаборатории является хиральная хроматография [7; 8]. Достоинствами данного метода являются высокая скорость процесса и быстрота разработки методики разделения, выполнение разделения без химических превращений исходных веществ, высокая степень автоматизации и возможность получения целевого компонента с высокой степенью чистоты. Прямая хиральная хроматография осуществляется на ХНФ – адсорбентах, поверхность которых обладает энантиоселективными свойствами. В качестве таковых в представленном диссертационном исследовании использованы неподвижные фазы на основе силикагеля с привитыми к его поверхности гликопептидными макроциклическими антибиотиками. Выбор обусловлен рядом достоинств данного типа материалов, объясняющих их растущую популярность. Они совместимы с большинством хроматографических растворителей и позволяют осуществлять разделения энантиомеров широкого круга хиральных соединений [9; 10; 11]. Относительно высокая скорость адсорбции на привитых антибиотиках делает возможным их применение в хроматографических адсорбентах на основе поверхностно-пористых носителей [12; 13]. В нижеследующем обзоре обсуждаются теоретические основы и прикладные аспекты хиральной хроматографии на указанных ХНФ.

1.1. Механизмы энантиораспознавания в хиральной хроматографии

1.1.1. Теории хирального распознавания

Хроматографическое энантиоразделение основано на образовании адсорбционных комплексов между разделяемыми энантиомерами, находящимися в подвижной фазе, и хиральным селектором, находящимся на поверхности неподвижной фазы. Поскольку энантиомеры находятся в разных стереохимических конфигурациях, а хиральный селектор в одной и той же, образующиеся поверхностные комплексы будут по отношению друг к другу диастереомерами. Такие образования в общем случае отличаются прочностью связи, что и

приводит к разделению оптических изомеров – менее прочно связанный энантиомер выходит из хроматографической колонки первым, а более прочно связанный вторым. Явление селективного взаимодействия хирального селектора с энантиомерами называется хиральным распознаванием или энантиораспознаванием. Первая попытка объяснить это явление на молекулярном уровне была предпринята Иссоном и Штедманом в 1933 г. [14]. Они предложили структурную модель, объясняющую стереоселективное связывание хиральных молекул с белковым рецептором и влияние данного процесса на физиологическую активность. В рамках данной модели для хирального распознавания необходимо как минимум три контактные точки между плоской поверхностью хирального рецептора и субстратом (модель трехточечного взаимодействия) (рис. 1.1). Связывание осуществляется через три заместителя у тетраэдрического атома углерода, принадлежащих одному из энантиомеров субстрата, а, b и c, и группами адсорбента А, В и С соответственно (рис. 1.1а). Другой энантиомер с зеркальным расположением функциональных групп пространственно не совмещается с соответствующими группами сорбента и прочного связывания не происходит (рис. 1.1б). Считалось, что характер сил, обуславливающих взаимодействие в трех точках, не имеет значения. Модель Иссона-Штедмана была адаптирована Огстоном в 1948 году для энзиматических реакций [15].

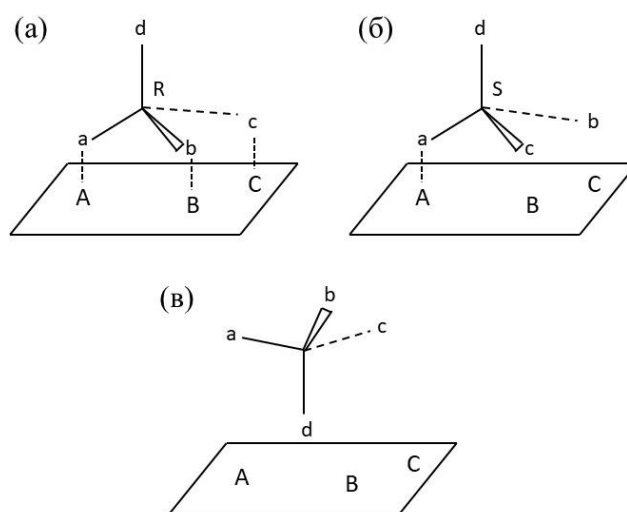


Рис. 1.1. Модель хирального распознавания Иссона-Штедмана. R энантиомер обеспечивает прочное связывание посредством трех контактных точек (а), в отличие от S-энантиомера, ограниченного одним контактом (б). Возможность связывания S-энантиомера через d-группу исключена (в).

Позже, в 1987 году, Салемом была предложена близкая модель в которой распознавание осуществляется благодаря появлению шестицентровых сил (по три от каждой молекулы) между двумя гомо- или гетерохиральными молекулами (рис. 1.2) [16].

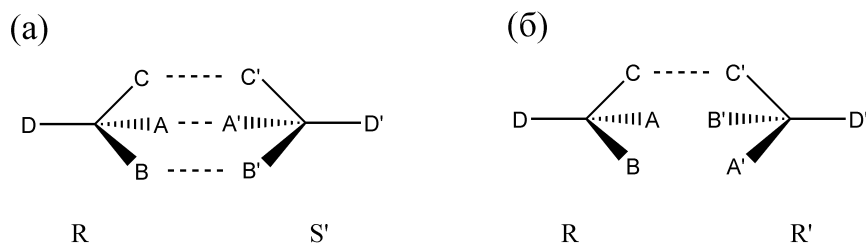


Рис. 1.2. Согласно Салему шестицентровые силы возникают между одинаковыми парами атомов энантимеров, приводя к $R \rightarrow S'$ взаимодействию (а). Такой механизм невозможен для случая (б). Также никакое вращение молекул не приведет к совмещению S' и R' .

Модель Салема подверглась критике со стороны Топиола и Сабио [17]. Они предложили восьмицентровую модель, допуская существование 4 контактных точек в трёхмерном пространстве. Причем взаимодействия в этих 4-х точках могут быть как притягивающими, так и отталкивающими. Большой вклад в популяризацию указанной модели внёс Бентли, которому принадлежит удачная визуализация концепции четырёхточечного взаимодействия [18]. В его интерпретации контактирующие точки расположены в пересекающихся плоскостях (рис. 1.3). При этом оба энантиомера могут связываться с активными центрами селектора А, В и С. Однако только появление контакта b -В способствует энантиораспознаванию (рис. 1.3б).

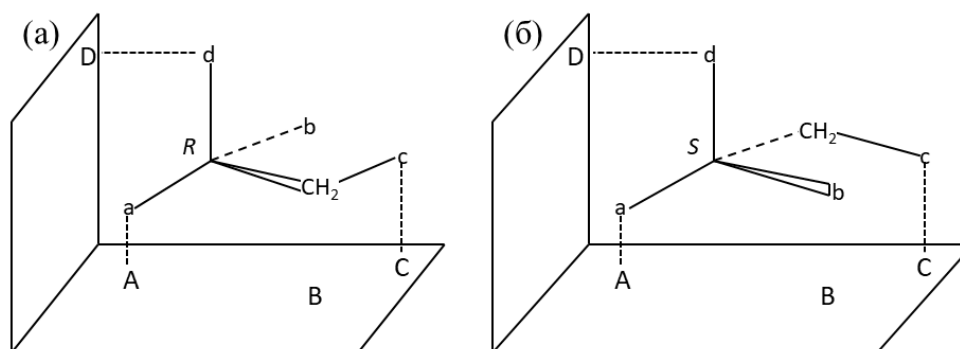


Рис. 1.3. Модель Бентли. Центр связывания D расположен под углом к плоскости, на которой расположены центры А, В и С. Для энантиораспознавания трехточечного контакта (а-А, с-С, d-D) оказывается недостаточно. Благодаря четвертому контакту между CH_2 -группой и точкой В селектор «различает» R-энантиомер (а) от S-энантиомера (б).

Восьмицентровая модель, однако, не получила широкого распространения. Возможно, потому что в её основе лежат сложные физико-математические рассуждения. Модель же трехточечного взаимодействия в силу её простоты и наглядности активно применяется для

объяснения хирального распознавания. Впервые для интерпретации хроматографического разделения энантиомеров ароматических аминокислот на целлюлозе её использовал Далглиш в 1952 г. [19]. Он предположил, что гидроксильные группы целлюлозы образуют водородные связи с амино и карбоксильной группами аминокислоты. А третий контакт осуществляется посредством взаимодействия с заместителями в ароматическом ядре. Позже Пиркл и Почапски переформулировали теорию трехточечного взаимодействия следующим образом: «Для хирального распознавания необходимо наличие как минимум трех взаимодействий между хиральным селектором и по крайней мере одним энантиомером, при чем одно из взаимодействий должно быть стереохимически зависимым» [20], заменив понятие «точки» понятием «взаимодействие». Действительно, часто контакт может быть многоточечным как в случае π - π взаимодействия между бензольными кольцами. При этом в рамках трёхточечной модели он должен рассматриваться как одно взаимодействие. Даванков дополнительно указал на важность ахиральных элементов микроокружения адсорбционного комплекса, таких как поверхность носителя или молекулы компонентов ПФ для хирального распознавания [21]. Сундаресан и Аброл предложили модель «рецептор-субстрат» для мультихиральных молекул, отличающихся наличием нескольких стереоцентров. Требование для возникновения селективности заключалось в том, что во взаимодействиях с рецептором должно быть задействовано минимум $N + 2$ центров субстрата, где N – число стереоцентров [22; 23].

Правило трехточечного взаимодействия даже в современной формулировке Пиркла и Почапски не свободно от недостатков. В частности отмечается, что правило не учитывает конформационную гибкость селектора и селектанда, рассматривая хиральное распознавание в статическом виде [24]. Тем не менее, во многих практических случаях оно позволяет объяснить механизм энантиораспознавания, также как и осуществлять направленный дизайн новых хиральных селекторов [25].

Для успешного разделения необходимо, чтобы один энантиомер был комплементарен структуре хирального селектора, а другой – нет. Идеальная комплементарность, ведущая к прочному связыванию, предполагает не только стерическое соответствие, но и выполнение одного или нескольких следующих условий [26]:

- электростатическое соответствие (комплементарность функциональных групп, способных к электростатическим взаимодействиям: ионным, водородным, диполь-дипольным, ион-дипольными, π - π взаимодействиям);
- гидрофобное соответствие (пространственное соответствие гидрофобных участков, в результате взаимодействия которых в водных элюентах из точки контакта удаляются слои

структурно неупорядоченной воды и происходит взаимное насыщение гидрофобных поверхностей);

– индуцированное соответствие (изменение конформации селектора и/или селектанда в процессе взаимодействия таким образом, чтобы максимизировать силы связывания).

1.1.2. Методы изучения механизмов энантиораспознавания

Для изучения механизмов хирального распознавания используют различные методы. Их можно разделить на методы определения структуры соединений (рентгеноструктурный анализ, ЯМР, молекулярное моделирование) и методы определения прочности адсорбционных комплексов, из которых наиболее популярным при изучении хроматографических процессов является собственно хроматографический метод. Очевидно, что сочетание различных подходов даст более полную информацию о механизме энантиоселективного связывания.

Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурный анализ (РСА) позволяет построить карту распределения электронной плотности веществ, на основании которой можно получить объемную структуру соединения. Таким образом, РСА монокристалла комплекса аналит-селектор, выращенного из раствора аналита и селектора, позволяет расшифровать структуру данного комплекса, существующего в твердом состоянии. Обычно кристаллы выращивают из эквимольных растворов аддуктов, но если предполагают более сложные соотношения, например, 2:1, то кристалл можно вырастить из соответствующего раствора.

РСА дает исчерпывающую информацию о строении вещества, такую как пространственное расположение атомов, расстояния между атомами и углы между связями. На основании этой информации получают трёхмерное изображение комплекса. Такая твердофазная структура диастереомерного комплекса селектор-энантиомер была получена для макроциклических циклодекстринов с энантиомерами бромфенирамина [27]. Линднер и Лэммерхофер с соавт. использовали метод РСА для изучения механизмов хирального распознавания селекторами на основе карбамоилированных производных хинина [28; 29]. Интересные результаты были получены в работе [28], в которой удалось вырастить кристаллы комплексов селектора со всеми четырьмя стереоизомерами перметриновой кислоты и выявить тонкие различия в ориентации заместителей у циклопропанового кольца кислоты внутри структуры комплексов, которые в конечном итоге приводили к различию энергий связывания стереоизомеров с селектором.

Структура кристаллов тройных комплексов, выращенных из эквимольной смеси нового макроциклического антибиотика на основе карбазол-бинафтолового скелета, 18-краун-6 эфира и фенилглицина, была установлена посредством РСА. Установлена роль сульфонамидных NH-групп внутри и снаружи хиральной полости макроцикла в распознавании карбоксилат-ионов рацемического фенилглицина [30].

Другим примером использования кристаллографических данных для расшифровки механизмов энантиораспознавания стала работа группы Армстронга [31]. Авторы использовали пространственные структуры комплексов Cu^{2+} с ванкомицином, полученные с помощью РСА, чтобы определить, какая из аминокислот селектора вовлекается в процесс энантиораспознавания. Участие вторичного амина ванкомицина в комплексообразовании с медью приводило к снижению селективности, по сравнению с нативным ванкомицином, что указывало на ключевую роль этого адсорбционного центра в разделении энантиомеров производных карбоновых кислот из водных растворов.

Важно отметить, что строение кристаллических аддуктов может отличаться от структуры адсорбционных комплексов, образующихся на поверхности неподвижных фаз в присутствии растворителя. Поэтому РСА, как правило, используют в сочетании с другими методами, а сами кристаллические структуры анализируют для выявления оптимальной конфигурации центра связывания, понимая, что эта конфигурация может быть искажена при иммобилизации селектора на поверхности носителя или заблокирована молекулами ПФ.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

ЯМР-спектроскопия является мощным инструментом установления структуры органических соединений, а также может предоставить информацию о взаимодействии вещества с растворителем и о внутримолекулярной динамике. Эксперимент может осуществляться как с хиральным селектором, растворённым в жидкости, так и с иммобилизованным на твёрдый носитель, т.е. с реальными ХНФ, для чего требуется более дорогое оборудование. Как правило, используют протонный магнитный резонанс, но ЯМР на других ядрах, например, ^{13}C , тоже эпизодически встречается в литературе [32; 33]. Измерения проводят как с индивидуальными селекторами для выяснения их предпочтительной конформации, так и с аддуктами селектора и разделяемых энантиомеров. Показательным примером эффективности метода ЯМР являются работы Вильямса с сотр., которым удалось расшифровать механизм распознавания антибиотиками ванкомицином и ристоцетином А дипептидного фрагмента – D-Ala-D-Ala [34; 35]. Сочетая данные о межпротонных расстояниях, полученные с помощью ядерного эффекта Оверхаузера, и наблюдаемые изменения в

химических сдвигах различных групп антибиотиков и дипептида в свободном состоянии и в составе комплекса, исследователи установили, что метильные группы дипептида расположены вблизи бензольных колец пептидного скелета антибиотиков и что дипептидный фрагмент стабилизирован внутри макроциклического «кармана» агликоновой части антибиотиков водородными связями двух типов: (i) между амидными группами антибиотика и карбоксильной группой дипептида и (ii) между амидными группами антибиотиков и дипептида (рис. 1.4).

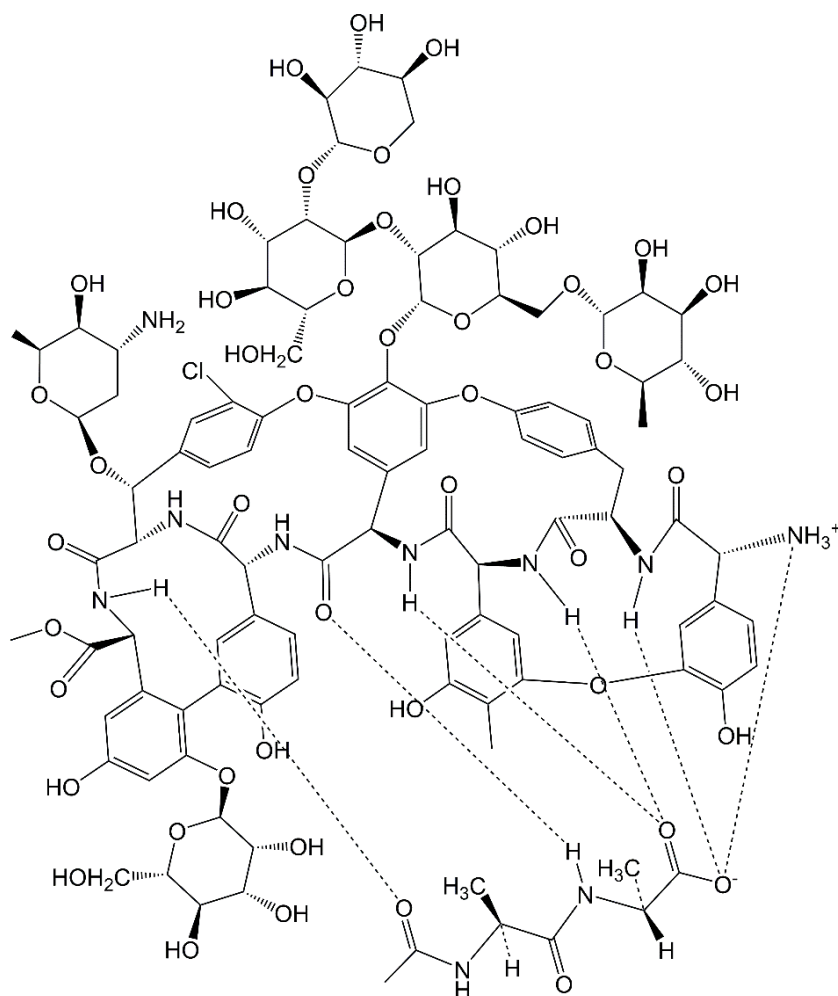


Рис. 1.4. Иллюстрация взаимодействия Ac-D-Ala-D-Ala с ристоцетином А [36].

Сравнивая результаты ЯМР-спектроскопии с измерениями констант устойчивости комплексов антибиотиков с различными пептидными субстратами, авторы сделали важный вывод о том, что основной вклад в устойчивость комплекса вносит взаимодействие первого типа. Однако водородные связи второго типа играют важную роль ограничения подвижности дипептидного фрагмента внутри макроциклического «кармана», обеспечивая оптимальную конфигурацию для взаимодействия карбоксилатной группы с амидами центра связывания [36].

Молекулярное моделирование

Методы компьютерного (молекулярного) моделирования используют законы теоретической химии для установления структуры молекул и механизмов их взаимодействия. Метод молекулярной динамики (МД) рассматривает системы, в которых тепловые движения всех атомов моделируются в коротком временном масштабе – обычно в пределах от 10 нс до 10 мкс. Это делается путем численного интегрирования уравнений движения Ньютона, при этом силы межатомного взаимодействия представляют в форме классических потенциальных сил [37]. Метод МД позволяет учитывать влияние растворителя в явном (система содержит молекулы растворителя в симуляции) и неявном (растворитель рассматривается как сплошной континуум) виде [38]. Так Сарделла и др. моделировали механизм хирального распознавания дипептида карнозина (β -аланилгистидина) на селекторе тейкопланине A_{2-2} в водно-метанольной смеси (40:60), представленной в явном виде [39]. Наибольший вклад в удерживание оказывали водородные связи и ионные взаимодействия. При этом первые обнаруживались в большем количестве между *S*-карнозином, а вторые между *R*-изомером и хиральным селектором. Разница во времени удерживания между обоими энантиомерами и более поздним выходом *R*-карнозина была объяснена участием последнего в большем количестве ион-ионных взаимодействий с селектором, чем соответствующего *S*-энантиомера, что согласовывалось с хроматографическими данными [40]. Недавно та же группа авторов совместно с Першиной и др. исследовала методом МД энантиоселективное взаимодействие ряда дипептидов с привитым к поверхности силикагеля ристоцетином А в буферном водно-метанольном растворе [41]. В этой публикации впервые было учтено существование ионизируемых селектора и селектанда в разных ионных состояниях в зависимости от рН элюента. Была показана важность ион-ионных взаимодействий и образования водородной связи между аминной группой пептидного скелета антибиотика и карбоксильной группой дипептидов Ala-Ala и Leu-Leu для энантиоразделения. В случае Gly-Leu энантиоразделение осуществлялось за счёт тонких различий в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях между энантиомерами дипептида и хиральным селектором. Таким образом, была продемонстрирована способность метода МД моделировать процессы энантиоразделения в условиях, приближённых к реальным, и объяснять особенности этих процессов, недоступные для изучения спектральными методами, которые предоставляют интегральную информацию и не способны рассмотреть взаимодействия конкретных ионных форм молекул по отдельности.

Другой часто применяемой разновидностью методов компьютерного моделирования является метод молекулярного докинга. Докинг-расчёты способны предсказать предпочтительную геометрию связывания двух молекул – селектанда и селектора – в комплексе

и оценить прочность их связи [42]. В контексте хирального распознавания задача метода – установить какой из энантиомеров будет образовывать более прочный комплекс с одним и тем же селектором и почему. Различные примеры применения метода для изучения энантиоразделения на ХНФ обсуждаются в недавнем обзоре [42].

Популярные программы для докинга (Autodock, Autodock Vina, DOCK, GOLD) оптимизированы для расчетов в водной среде и даже в этом случае корректный учёт явлений сольватации представляет сложности [43]. Это обстоятельство редко принимают во внимание, когда соотносят результаты докинговых расчётов с экспериментальными данными, полученными с водно-органическими или неводными ПФ. Другим недостатком метода является то, что структура селектора в нём принимается жёсткой и неучитывается возможность её деформации в процессе связывания с селектандом. Этот недостаток можно преодолеть, подвергая оптимальные структуры, найденные по результатам докинговых расчётов, дальнейшему тестированию с помощью метода МД [42].

Хроматографический метод

Хроматографический метод позволяет измерить адсорбционную константу Генри, если измерения проводятся с бесконечно разбавленными пробами, или всю изотерму адсорбции, если измерения проводятся в широком диапазоне концентраций адсорбтива. Первый вариант называют линейной хроматографией, поскольку он осуществляется в линейном диапазоне изотермы адсорбции, а второй – нелинейной хроматографией. Последний метод является более информативным, но в то же время, и более время и реактивовзатратным. Поэтому исследователи чаще обращаются к методу линейной хроматографии; большой массив данных по механизмам взаимодействия элюируемых веществ и неподвижных фаз получен с его помощью.

По определению [44] константа Генри (K_c) – это наклон изотермы адсорбции при концентрации адсорбтива в жидкой фазе $c \rightarrow 0$:

$$K_c = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\Gamma}{c} \right) \quad (1.1)$$

где Γ – избыточная адсорбция. При анализе адсорбционного равновесия с применением стехиометрического подхода удобно пользоваться величиной полной концентрации адсорбата в твёрдой фазе (q). В условиях бесконечного разбавления отличие между q и Γ пренебрежимо мало и для адсорбции из растворов кристаллических веществ с не очень высокой растворимостью, каковые рассматриваются в данном исследовании, остаётся пренебрежимо

малым во всём диапазоне концентраций, вплоть до концентрации насыщенного раствора. Поэтому без заметной потери точности мы можем принять $\Gamma = q$ и считать, что $K_c = \lim_{c \rightarrow 0} (q/c)$.

В хроматографии обычно пользуются не константой Генри, а величиной фактора удерживания (k), который представляет собой отношение количества элюируемого вещества в неподвижной и подвижной фазах. В условиях линейной хроматографии k связан с K_c простым соотношением:

$$k = K_c \frac{V_s}{V_m} = K_c \phi \quad (1.2)$$

где V_s и V_m – объёмы неподвижной и подвижной фаз в хроматографической колонке, а ϕ – их отношение.

Фактор удерживания (или константа Генри) характеризует взаимодействия аналита с поверхностью всей неподвижной фазы, не только с хиральным селектором, а также с компонентами ПФ. Другими словами, он содержит информацию о макроскопическом механизме адсорбции, которая важна для решения задач оптимизации. Изучение влияния состава ПФ и температуры на хроматографическое удерживание может также дать информацию общего характера о природе взаимодействий в хроматографической колонке. Так Армстронг и Берто с соавт. [45; 46; 47] на основании данных о зависимости k от соотношения водной и органической составляющих ПФ делали выводы об относительном вкладе водородных связей, ион-ионных и гидрофобных взаимодействий в удерживание хиральных аналитов на ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками. Венгерские авторы на основании изучения температурной зависимости фактора удерживания устанавливали характер термодинамического контроля равновесия адсорбции аминокислот на антибиотиковых ХНФ [48; 49]. В подобном исследовании Аснина с соавт. [50] обсуждается влияние сольватационной и десорбционной активностей водно-органических растворителей на энантиоселективную адсорбцию дипептидов на ХНФ с привитым антибиотиком ристоцетином А.

Молекулярный механизм взаимодействия с хиральным селектором является составной частью макроскопического механизма адсорбции, поэтому информация о нём содержится в величине фактора удерживания. Для извлечения этой информации выполняют измерения удерживания энантиомеров серии веществ сходной структуры, отличающихся заместителями у хирального центра или наличием/отсутствием функциональных группы в различных положениях исходного молекулярного скелета. Характеристикой степени энантиоразделения служит фактор (коэффициент) разделения:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (1.3)$$

где индексы 1 и 2 обозначают первый и второй элюируемые энантиомеры. Наблюдая как те или иные заместители или структурные элементы влияют на α и k , делают выводы о конфигурации связывания. Кавацини и др. [51], изучая энантиоразделение аминокислот, их метилированных и *N*-ацилированных производных на ХНФ с привитым антибиотиком тейкопланином, продемонстрировали важность карбоксильной группы аминокислот для прочного связывания с антибиотиком. В совместной работе Армстронга и Илиша было показано влияние алифатических и ароматических заместителей у хирального центра пролина на энантиораспознавание на ХНФ с привитыми антибиотиками [52]. Иногда для анализа экспериментальных данных привлекают численные методы исследования связи «структура-свойство», известные в хроматографической литературе как метод QSRR (quantitative structure-retention relationships) [53; 54; 55].

Изучение механизма энантиораспознавания можно осуществлять, модифицируя структуру хирального селектора. Так, например, было прояснено значение углеводных остатков тейкоплина для его энантиоселективности по отношению к различным классам хиральных соединений [47]. Авторы изучали энантиоразделение на ХНФ с привитым тейкоплином и его агликоном и обнаружили, что коэффициенты разделения энантиомеров одних и тех же аминокислот на сорбенте с агликоном существенно выше, чем на сорбенте с нативным тейкоплином. Это указывает на то, что углеводные остатки играют роль стерических препятствий для проникновения аминокислот к энантиоселективному центру связывания, который для аминокислот находится в агликоновой части молекулы антибиотика. Для соединений, не содержащих NH_2 -группы и у которых хиральный атом связан с бензольным кольцом, таких как варфарин или 4-гидроксиминдальная кислота, наоборот наличие углеводных остатков необходимо для энантиоразделения, указывая на локализацию энантиоселективного центра не внутри агликонового макроцикла. Староверов и др. исследовали энантиоразделение аминокислот на антибиотике эремомицине и трёх его производных [56]. Анализируя влияние химической модификации на энантиоселективность эремомицина, они установили, что карбоксильная группа антибиотика не участвует в энантиораспознавании, важную роль в котором играет первое бензольное кольцо его олигопептидного скелета.

Применение метода нелинейной хроматографии, т.е. измерение изотерм адсорбции оптических изомеров, позволяет определить распределение адсорбционных центров (РАЦ) по энергиям в том, однако, случае, если верхняя граница исследованного диапазона концентраций

адсорбтива достаточно велика [57], что не всегда доступно для хиральных соединений либо в силу их ограниченной растворимости, либо по причине их высокой стоимости. Даже если определение РАЦ невозможно, экспериментальные изотермы адсорбции позволяют определить концентрацию адсорбционных центров (q^*) и среднюю (по всем группам адсорбционных центров) константу адсорбционного равновесия. Это могут оказаться кажущиеся характеристики, но даже в этом случае сравнение указанных параметров для энантиомеров позволяет получить дополнительную информацию о взаимодействии аналитов с хиральной поверхностью [58]. Например, неравенство величин q^* для оптических антиподов говорит о наличии нескольких групп адсорбционных центров. Часто экспериментальные данные для хиральных систем описываются двухцентровой моделью адсорбции, допускающей существование двух типов адсорбционных центров. Обычно предполагают, что одна группа центров энантиоселективная, а другая – неселективная, что открывает возможность изучения свойств энантиоселективных центров без мешающего влияния остальной поверхности [59]. Такое отнесение, однако, не всегда корректно. Критерии идентификации типа адсорбционных центров будут рассмотрены в разделе 1.2.6.

1.2. Механизмы удерживания в жидкостной хроматографии

1.2.1. Адсорбционный механизм

Хронологически первая адсорбционная модель удерживания была предложена Снайдером для объяснения элюирования неэлектролитов на полярных адсорбентах (силикагель, оксид алюминия) [60]. Конечно, и до указанной публикации исследователи понимали, что удерживание в хроматографической колонке осуществляется по механизму адсорбции. Заслуга Снайдера заключается в том, что он предложил теорию, которая количественно описывала связь между фактором удерживания и свойствами элюента. В модели Снайдера поверхность адсорбента предполагается энергетически гомогенной и покрытой мономолекулярным слоем, состоящим из молекул аналита (Z) и молекул элюента (S). Таким образом адсорбция Z предполагается конкурентной. Чтобы адсорбироваться, молекула Z должна вытеснить с поверхности эквивалентное количество молекул S :

$$Z_m + nS_s = Z_s + nS_m \quad (1.4)$$

где индексы m и s указывают на подвижную и неподвижную фазы соответственно, а коэффициент n равен отношению площадей молекул аналита (A_0) и элюента в адсорбционном слое. Снайдер показал, что для такой модели будет справедливо следующее уравнение, связывающее факторы удерживания вещества Z в растворителях I и II:

$$\lg(k_{II}/k_I) = \alpha' A_0 (\zeta_I - \zeta_{II}) \quad (1.5)$$

В этом уравнении α' – параметр активности адсорбента, а ζ – условная сила элюента в некоторой эмпирической шкале. Для бинарных элюентов, составленных из растворителей a и b Снайдер рассчитывал силу элюента ζ_{ab} через значения соответствующих параметров для чистых растворителей, величину молекулярной площадки (A_b) и мольную долю (X_b) растворителя b :

$$\zeta_{ab} = \zeta_a + \frac{\lg(X_b 10^{A_b(\zeta_b - \zeta_a)} + 1 - X_b)}{\alpha' A_b} \quad (1.6)$$

Используя аналогичную модель, но допуская, что растворитель a играет роль инертного разбавителя и только растворитель b обладает элюирующей способностью, Сочевинский вывел выражение, связывающее фактор удерживания и концентрацию растворителя [61]:

$$\lg k = \text{const} - n \lg X_b \quad (1.7)$$

В оригинальной работе Сочевинский полагал значение стехиометрического коэффициента n в уравнении (1.4) равным 1, но в более поздних исследованиях допускал $n > 1$. Уравнение (1.7) получило название модель Снайдера-Сочевинского. Модель оказалась полезной в нормально-фазной хроматографии, где используются полярные адсорбенты и подвижные фазы, составленные из смеси неполярного и полярного растворителей [62]. Гьемеш-Форра и др. наблюдали линейные зависимости в координатах уравнения Снайдера-Сочевинского для хиральных производных имидазолхинолидина на ХНФ на основе карбамата хинина [63]. Указанная модель, как и близкая ей модель Ланина-Никитина [64], также допускающая существование только одного активного компонента в ПФ и пренебрегающая сольватационными взаимодействиями в жидкости, предсказывают монотонную зависимость k от концентрации этого активного компонента. Скотт и Кучера использовали другой подход, рассматривая фактор удерживания как отношение обобщённых сил взаимодействия между элюируемым веществом и неподвижной фазой и между элюируемым веществом и ПФ [65]. Итоговая модель также оказалась монотонной. В то же время, известно, что зависимости характеристик удерживания от состава ПФ часто бывают немонотонными. Тсуи с соавт. [66] расширил модель Снайдера-Сочевинского, учтя в явном виде сольватационные взаимодействия в подвижной фазе, но сохранив допущение об одном активном компоненте в ней. Стехиометрическая схема модели Тсуи и др. представлена ниже. Она включает уравнение образования сольватного комплекса в ПФ:



и уравнения взаимодействия растворителя и аналита с адсорбционным центром А:



Как видно, Тсуи и др. предполагали для взаимодействия растворителя с адсорбционным центром стехиометрию 1:1, а для взаимодействия аналита с адсорбционным центром стехиометрию 1: x . Итоговое уравнение модели представлено в выражении (1.11).

$$k = \frac{k_0}{(1 + K_S C_S^y)(1 + K_{SA} C_S)^x} \quad (1.11)$$

где k_0 – фактор удерживания аналитов измеренный в инертном разбавителе в качестве ПФ, C_S – концентрация активного компонента в ПФ, постоянные K_S и K_{SA} – константы равновесия реакций (1.8) и (1.9) соответственно. Уравнение (1.11) позволяет описывать немонотонные зависимости.

1.2.2. Распределительный механизм

Распределительный механизм рассматривает хроматографическое удерживание как результат распределения элюируемого вещества между двумя объёмными фазами наподобии равновесия экстракции. Он был предложен для объяснения процессов элюирования в обращённо-фазной хроматографии на алкилированном силикагеле [67]. В качестве ПФ в этом случае, как правило, используют водно-органические растворители. Привитой алкильный слой обычно состоит из остатков, содержащих 16 или 18 атомов углерода и действительно может рассматриваться как объёмная проницаемая фаза. Мартир и Бём [68], используя статистико-термодинамический подход, вывели выражение, связывающее фактор удерживания с составом водно-органической ПФ:

$$\ln(k/\phi) = \varphi_a \ln(k_a/\phi) + \varphi_b \ln(k_b/\phi) - \varphi_a \varphi_b r \chi_{ab} \quad (1.12)$$

где индексы a и b как и ранее указывают на растворители в составе бинарного элюента, φ_a и φ_b обозначают объёмную долю соответствующего растворителя ($\varphi_a + \varphi_b = 1$), постоянные k_a и k_b обозначают фактор удерживания аналита в чистом растворителе a или b , r – структурный параметр аналита, а χ_{ab} – параметр взаимодействия компонентов a и b в ПФ.

Известны другие модели распределительного механизма удерживания, полученные с использованием статистико-термодинамического подхода [69], однако они не нашли широкого применения на практике. Больше распространение получили эмпирические модели. В частности, ещё на ранних этапах применения обращённо-фазовой хроматографии было

замечено, что логарифм k в большом числе случаев линейно уменьшается с объёмной долей органического компонента [70]:

$$\lg k = \lg k_0 - S\phi_b \quad (1.13)$$

где k_0 - фактор удерживание в чистой воде, S – параметр, зависящий от природы аналита. Позже было показано, что уравнение (1.13) можно вывести теоретически как частный случай распределительно-адсорбционной модели, в приближении полного доминирования распределительного механизма [71].

1.2.3. Сольвофобная теория удерживания

Хорват с сотр., основываясь на теоретических представлениях Синаноглу о влиянии растворителя на процессы ассоциации [72], выдвинули сольвофобную теорию удерживания, которая не может быть сведена ни к адсорбционному, ни к распределительному механизму [73]. В рамках этой теории удерживание рассматривается как результат взаимодействия молекул аналита с закреплёнными на поверхности алкильными цепочками, которые авторы называют лигатами. Свободная энергия удерживания (ΔG_R^0) представляется как сумма нескольких энергетических вкладов: (i) образования пустоты в объёме ПФ, в которую помещается молекула аналита, (ii) взаимодействия аналита и компонентов ПФ, (iii) ассоциации аналита и лигатов в газовой фазе, (iv) уменьшение вклада (iii), благодаря образованию ассоциата в присутствии растворителя и (v) вклад, связанный с изменением свободного объёма ($-RT \ln(RT/V_S)$, где V_S – молярный объём элюента, R – универсальная газовая постоянная, T – температура). Каждое составляющее ΔG_R^0 в свою очередь разбивается на несколько вкладов, описывающих различные типы взаимодействий. В итоге, пользуясь тем, что $\Delta G_R^0 = -RT \ln(k/\phi)$, получают выражения (разные для неполярных, полярных и ионных аналитов) связывающие $\ln k$ с физико-химическими свойствами аналита и элюента. Простейшее выражение для неполярного аналита включает 11 параметров [69], часть из которых трудно определима и сложным, не всегда заранее предсказываемым образом зависит от состава подвижной фазы. По этой причине уравнения сольвофобной теории крайне редко используются в практических расчётах, но её положения часто применяются в теоретических рассуждениях.

1.2.4. НЛІС механизм

Разделение полярных молекул, таких как углеводы, производные карбоновых кислот, аминокислоты, на полярных адсорбентах из водно-органических ПФ с низким содержанием воды (5-30 %) было объединено Альпертом под термином НЛІС (hydrophilic interaction

chromatography) или хроматография гидрофильных взаимодействий [74]. Название подчеркивало тип взаимодействий, определяющих удерживание, чей механизм, однако, до сих пор остаётся не вполне ясным. Ранняя модель предполагала, что вследствие преимущественной адсорбции воды на поверхности полярной неподвижной фазы образуется стационарный водообогащённый слой, который и обуславливает удерживание полярных молекул за счёт их распределения между этим полярным слоем и менее полярной ПФ с низким содержанием воды [75]. Таким образом, неподвижная фаза играла роль носителя адсорбированного водообогащённого слоя. В последующем было высказано предположение об активном участии поверхности адсорбента в удерживании и разделении [76].

В HILIC-системах удерживание уменьшается с увеличением содержания воды в ПФ в отличие от классических обращённо-фазных систем, в которых органический компонент ПФ является более сильным элюентом, при этом редко наблюдается линейная зависимость между $\lg k$ и φ_w ($= \varphi(\text{H}_2\text{O})$), которая считается характерным признаком распределительного механизма удерживания [75; 76]. Некоторые авторы сообщали об успешной аппроксимации экспериментальных данных моделью Снайдера-Сочевинского, однако число таких примеров не велико и более внимательный анализ данных в некоторых случаях заставляет сомневаться в обоснованности адсорбционной гипотезы [75]. Значительно лучшего качества аппроксимации удалось добиться со смешанной моделью (1.14) [76].

$$\ln k = a + b \ln \varphi_w - c\varphi_w \quad (1.14)$$

Коэффициенты b и c отражают энергию взаимодействия аналита с поверхностью неподвижной фазы и растворителем соответственно; коэффициент a зависит от обоих типов взаимодействий [77]. Такая интерпретация коэффициентов предполагает независимое действие адсорбционного и распределительного механизмов удерживания. Яндера и Гаек предложили дуальный (HILIC-обращённо-фазный) механизм удерживания, в котором гидрофильные взаимодействия при малом содержании воды постепенно переходят в сольвофобные взаимодействия, характерные для обращённо-фазной хроматографии при увеличении концентрации воды [76]. Уравнение модели (1.15) хорошо описывает U-образные зависимости $k(\varphi_w)$ нередко наблюдаемые в HILIC-системах.

$$\lg k = \lg k_0 + m_{RP}\varphi_w - m_{HILIC} \lg(1 + b\varphi_w) \quad (1.15)$$

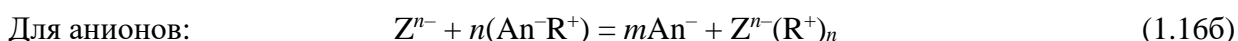
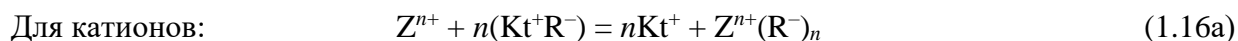
где k_0 – фактор удерживания в чистом органическом растворителе ($\varphi_w = 0$), индексы RP и $HILIC$ у коэффициента m указывают на отношение параметра к обращённо-фазному или HILIC режимам, параметр b корректирует вклад искажений в гидрофильный механизм удерживания.

В хиральной хроматографии чистый (распределительный) ННЛС-режим невозможен, поскольку энантиоразделение требует непосредственного контакта аналита с селектором. Однако известны примеры использования хиральных колонок в условиях ННЛС-хроматографии. Так Матарашвили с соавт. продемонстрировали ННЛС-подобное поведение энантиомеров слабokислых соединений на полисахаридных ХНФ с водно-ацетонитрильными элюентами [78]. Авторы отмечали отличие механизма удерживания от обращённо-фазной хроматографии, указывая на появление гидрофобных и гидрофильных взаимодействий в зависимости от содержания воды в ПФ. При энантиоразделении полярных соединений на ХНФ с привитыми циклодекстринами и макроциклическими антибиотиками фактор удерживания может расти при уменьшении содержания воды в ПФ ниже 20 % [79]. Выше этой точки фактор удерживания увеличивался, образуя типичную U-образную зависимость $k(\varphi_w)$. Авторы последней работы указывали на возрастающую роль водородных связей при увеличении содержания органического компонента.

Следует отметить, что ННЛС-хроматография в отличие от обращённо-фазной хроматографии характеризуется лучшим массопереносом из-за более низкой вязкости ПФ, что уменьшает размывание пиков и позволяет использовать большие скорости потока.

1.2.5. Ионнообменный механизм

Ионный обмен возникает в системах, в которых адсорбат является заряженной частицей и в неподвижной фазе имеются заряженные группы со знаком заряда противоположным знаку заряда адсорбата. Другими словами, для ионного обмена катионных веществ, неподвижная фаза должна обладать свойствами катионообменника, для обмена анионных веществ – свойствами анионообменника. Равновесие ионного обмена иона адсорбата с абсолютной величиной заряда m и одновалентного противоиона¹, находящегося в контакте с одновалентной ионнообменной группой неподвижной фазы записывается следующим образом.



где R^- (R^+) обозначает фиксированный заряд на поверхности катионообменной (анионообменной) неподвижной фазы, Kt^+ и An^- – соответствующий противоион (катион или анион), а Z^{m+} или Z^{m-} обозначают положительно или отрицательно заряженный ион адсорбата.

¹ Рассмотрение ограничено одновалентными противоионами, поскольку только такие противоионы использованы в работе.

Легко показать, что фактор удерживания связан с концентрацией противоиона в ПФ (C) обратно-степенной зависимостью:

$$k = \phi \frac{K_{ion} (q^*)^n}{C^n} \quad (1.17)$$

где K_{ion} – константа равновесия реакции (1.16а) или (1.16б), а q^* – обменная ёмкость неподвижной фазы. Для одновалентных ионов Z выражение (1.17) превращается в обратно-пропорциональную зависимость. Для подтверждения ионообменного механизма часто используют логарифмические координаты ($\lg k - \lg C$) [80]. Угловым коэффициентом такого графика равен n . При элюировании ионогенного вещества смесью нескольких электролитов выражение для k значительно усложняется и включает константы равновесия ионного обмена хроматографируемого вещества со всеми противоионами в растворе [81].

Строгое термодинамическое описание ионообменного равновесия требует использования активностей вместо концентраций [82]. Сложность такого подхода заключается в трудности определения коэффициентов активности, особенно для твёрдой фазы. Поэтому на практике для выявления ионообменного механизма удерживания часто пользуются соотношением (1.17) и, если оно не выполняется на экспериментальных данных, механизм удерживания считают смешанным и ищут причины отклонения от идеального ионообменного процесса. Таковыми могут быть поглощение части аналита по механизму молекулярной адсорбции, ион-парное взаимодействие, доннановское равновесие и т. п. Упрощающим обстоятельством при анализе данных для исследуемой группы материалов (низкомолекулярные органические лиганды, привитые к поверхности силикагеля), является тот факт, что они в отличие от полимерных ионообменников не набухают в подвижной фазе. Примером применения описанного подхода к анализу механизмов удерживания органических оснований на хиральных катионообменниках служат работы [83; 84], в которых были получены линейные зависимости логарифма k от логарифма концентрации противоиона с угловым коэффициентом близким к единице. Другим интересным примером являются работы [85; 86], в которой наблюдали аналогичные линейные зависимости для энантиомеров цвиттерионных соединений (β -аминокислот) на ХНФ с привитыми амфотерными селекторами, однако угловым коэффициентом составлял всего 0.20–0.35, указывая на отличия ионообменных равновесий в системах с амфотерными и неамфотерными электролитами.

1.2.6. Особенности механизмов удерживания в хиральной хроматографии

Явление хроматографического разделения объясняется процессом обратимого образования переходного комплекса между аналитами и адсорбционными центрами неподвижной фазы. Если один из двух аналитов образует более прочный комплекс, то он будет удерживаться в хроматографической колонке дольше, чем второй компонент, образующий более слабый комплекс. В контексте хиральной хроматографии это означает, что один оптический изомер удерживается прочнее, чем другой. Прочность переходного комплекса характеризуется константой адсорбционного равновесия. Допуская справедливость лэнгмюровской модели адсорбции для взаимодействия энантиомеров (E_i , $\{i = 1, 2\}$) с гомогенными адсорбционными центрами (A), можем записать



и для константы равновесия

$$b_i = \frac{[E_iA]}{[E_i][A]} \quad (1.19)$$

В условия линейной хроматографии при $[E_i] \rightarrow 0$ и $[A] \rightarrow q^*$ (общая концентрация адсорбционных центров, адсорбционная ёмкость) приходим к уравнению

$$b_i = \frac{K_{c,i}}{q^*} \quad (1.20)$$

Откуда связь между постоянной Генри и константой адсорбционного равновесия в лэнгмюровской модели даётся выражением

$$K_{c,i} = b_i q^* \quad (1.21)$$

Поверхность реальной ХНФ, однако, имеет более сложное строение, чем предполагается классической моделью Лэнгмюра, допускающей существование только одного типа адсорбционных центров. Общехимические соображения, подкреплённые большим объёмом экспериментальных данных, подсказывают, что на хиральной поверхности наряду с центрами энантиоселективной адсорбции будут находиться центры неселективной адсорбции [87; 88]. К первой группе центров относятся хиральные селекторы в конформации, обеспечивающей энантиоселективное взаимодействие. Во вторую группу центров входят нехиральные участки поверхности и хиральные селекторы, не способные в данный момент к энантиоселективному взаимодействию по причине конформационных изменений или блокировки центра связывания компонентами растворителя. Между двумя категориями хиральных селекторов, способных и неспособных к энантиоселективному связыванию, может существовать динамическое

равновесие [58]. То есть в разные моменты времени один и тот же селектор может играть роль энантиоселективного и неселективного адсорбционного центра, но усреднённая по поверхности концентрация энантиоселективных центров всегда будет постоянной. Описанные положения составляют ядро так называемой двухцентровой модели поверхности [58; 88]. Дальнейшее упрощение, предполагающее, что каждая группа центров является гомогенной, приводит к би-Лэнгмюровской модели адсорбции, предложенной Гиюшоном с сотр. [89]. Её выражением является система равновесных уравнений, описывающих взаимодействие энантиомеров с энантиоселективными (SA) и неселективными (NA) адсорбционными центрами:

$$E_i + SA = E_iSA \quad (1.22a)$$

$$E_i + NA = E_iNA \quad (1.22b)$$

Константа Генри в данном случае будет равна линейной комбинации парциальных констант для соответствующих уравнений:

$$\begin{aligned} K_{c,i} &= \frac{[E_iSA] + [E_iNA]}{[E_i]} = \frac{[E_iSA]}{[E_i]} + \frac{[E_iNA]}{[E_i]} = b_{es,i} [SA] + b_{ns} [NA] = \\ &= b_{es,i} q_{es}^* + b_{ns} q_{ns}^* \end{aligned} \quad (1.23)$$

где $b_{es,i}$ и $b_{ns,i}$ – равновесные константы связывания энантиомеров с энантиоселективными и неселективными центрами, а q_{es}^* и q_{ns}^* – адсорбционные ёмкости соответствующих групп центров. Заметим, что поскольку неселективные центры одинаково взаимодействуют с обоими энантиомерами, то для них должно выполняться условие $b_{ns,1} = b_{ns,2} = b_{ns}$. Кроме того, экспериментально определённые значения адсорбционных ёмкостей для энантиомеров должны совпадать, т.е. должны выполняться равенства $q_{es,1}^* = q_{es,2}^* = q_{es}^*$ и $q_{ns,1}^* = q_{ns,2}^* = q_{ns}^*$. Этот набор условий составляет необходимый критерий соответствия би-Лэнгмюровской модели. Его невыполнение будет свидетельствовать о более сложном устройстве адсорбционной системы, чем предполагалось уравнениями (1.22), например, существовании более чем двух типов адсорбционных центров [58].

Вспоминая связь между константой Генри и фактором удерживания (1.2), можем записать для би-Лэнгмюровской модели адсорбции

$$k_i = \phi b_{es,i} q_{es}^* + \phi b_{ns} q_{ns}^* = k_{es,i} + k_{ns} \quad (1.24)$$

где k_{es} и k_{ns} – факторы удерживания на энантиоселективных и неселективных адсорбционных центрах соответственно. Отсюда для фактора разделения следует записать

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{(k_{es,2} + k_{ns})}{(k_{es,1} + k_{ns})} \quad (1.25)$$

Как видно, эта величина включает вклады как энантиоселективных, так и неселективных взаимодействий. Это обстоятельство побудило Гётмара и др. ввести истинный фактор энантиоразделения $\alpha_{ист} = k_{es,2}/k_{es,1}$, который зависит только от энантиоселективных взаимодействий [59]. Величину α , определённую согласно выражению (1.25), они назвали кажущимся фактором энантиоразделения. В рамках линейной хроматографии, как правило, доступна только эта последняя характеристика, поскольку для определения $\alpha_{ист}$ необходимо разделение энантиоселективного и неселективного вкладов в общее удерживание, для чего обычно выполняют измерение изотерм адсорбции обоих энантиомеров в широком диапазоне концентраций, обязательно охватывающем нелинейную область [58; 59]. Левкин с соавт. [90] предложили подход к определению α_{true} методом линейной хроматографии, заключающийся в измерении факторов удерживания энантиомеров на серии ВЭЖХ колонок с различным содержанием хирального селектора. Этот метод предполагает, что все хиральные селекторы участвуют в энантиоселективных взаимодействиях, что является скорее исключением, чем правилом [58; 88; 87]. Кроме того, он не применим для коммерческих колонок, которые выпускаются только с одной, оптимальной, концентрацией хирального селектора.

1.2.7. Влияние концентрации элюируемого вещества на фактор удерживания

Как следует из уравнения (1.1), экспериментальный фактор удерживания остаётся постоянным в линейной области изотермы адсорбции, однако с выходом за пределы линейной области он начинает изменяться согласно уравнению (44)

$$k(c) = \phi \frac{dq(c)}{dc} \quad (1.26)$$

Таким образом, вид зависимости $k(c)$ определяется формой изотермы адсорбции. Вогнутые (выпуклые вверх) изотермы обуславливают уменьшение фактора удерживания с ростом концентрации аналита. Это наиболее часто встречающийся в хиральной хроматографии случай. Такие изотермы адсорбции наблюдаются для веществ разной природы, как ионогенных, так и неионогенных, на самых разных ХНФ [58]. Типичными примерами таких изотерм адсорбции являются изотерма Лэнгмюра (1.27) и би-Лэнгмюра (1.28).

$$q(c) = \frac{q^*bc}{1+bc} \quad (1.27)$$

$$q(c) = \frac{q_I^* b_I c}{1 + b_I c} + \frac{q_{II}^* b_{II} c}{1 + b_{II} c} \quad (1.28)$$

Индексы *I* и *II* в уравнении (1.28) отличают два разных типа адсорбционных центров.

Выпуклые (вниз) изотермы адсорбции соответствуют возрастающей зависимости $k(c)$. Такие изотермы должны наблюдаться для систем, в которых взаимодействие адсорбат-адсорбат прочнее взаимодействия адсорбат-адсорбент. Типичным примером является так называемая изотерма анти-Лэнгмюра:

$$q(c) = \frac{q^* bc}{1 - bc} \quad (1.29)$$

Такая ситуация не является редкой в ахиральной, но крайне редка в хиральной хроматографии. Известно всего два примера, относящихся к лигандо-обменной хроматографии – адсорбция L-метионина и энантиомеров триптофана на алкилированном силикагеле, модифицированном N-гексадецил-L-гидроксипролином, из раствора ацетата меди [91].

Если изотерма адсорбции имеет точку перегиба, то зависимость $k(c)$ будет менять направление от убывания к возрастанию или наоборот. Такие ситуации не редки в хиральной хроматографии и обычно наблюдаются при элюировании слабых электролитов ПФ с низкой концентрацией буферного или небуферного модификатора. В первом случае причиной указанного поведения является влияние концентрации аналита на его степень диссоциации на фоне низкой буферной ёмкости растворителя. Поскольку обе формы аналита, ионизированная и неионизированная, могут адсорбироваться на поверхности ХНФ, а соотношение между этими формами, в свою очередь, зависит от общей концентрации аналита, то итоговая изотерма адсорбции становится сложной функцией c и на ней могут появиться одна и даже более точек перегиба. Эта ситуация подробно рассмотрена в работе [92]. Искажение изотермы адсорбции в ситуации с небуферным модификатором, если таковой играет роль десорбента, объясняется влиянием конкурентной адсорбции. Тогда вместо одного уравнения изотермы адсорбции (для аналита, $q(c)$), адсорбционное равновесие будет контролироваться двумя связанными уравнениями изотерм конкурентной адсорбции: для аналита ($q(c, c_M)$) и для модификатора ($q_M(c, c_M)$), где c_M – концентрация модификатора). В этих условиях k становится функцией и c и c_M [93]:

$$k(c, c_M) = \phi \left(\frac{\partial q}{\partial c} + \frac{\partial q}{\partial c_M} \frac{dc_M}{dc} \right) \quad (1.30)$$

Даже в простом случае изотермы конкурентной адсорбции Лэнгмюра для обоих компонентов, k будет рациональной функцией второго порядка от c и при определённом сочетании

адсорбционных параметров и концентрации модификатора может демонстрировать немонотонное поведение [94].

Важным вопросом является определение границы линейной области изотермы адсорбции, той концентрации, ниже которой фактор удерживания станет постоянной величиной. На практике поиск этой концентрации осуществляют, определяя время выхода проб объемом 1-10 мкл, последовательно разбавляемых в 2 раза. Когда время выхода перестаёт зависеть от концентрации хроматографируемого вещества, считают, что достигнуты условия линейной хроматографии. Для аналитических хиральных колонок и низкомолекулярных веществ такие условия достигаются обычно для концентрации < 1 мМ для объёма пробы 1-2 мкл.

1.2.8. Влияние вторичных равновесий на механизм удерживания

В хроматографической колонке помимо адсорбционного равновесия возникают процессы, вызванные присутствием ПФ. Ионизация ионогенных аналитов и селекторов, сольватация аналита и хиральных селекторов, ассоциация молекул адсорбатов между собой, диссоциация электролитических добавок ПФ – эти и другие процессы, не относящиеся к чистой адсорбции аналитов, называют вторичными равновесиями. Последние могут оказывать значительный эффект на удерживание и разделение аналитов.

Сольватация

Адсорбция на границе жидкость-твёрдое тело представляет собой процесс переноса адсорбируемого вещества из жидкой фазы на поверхность твёрдой фазы. Он включает несколько стадий: (i) десольватация вещества в жидкой фазе, (ii) освобождение поверхности адсорбента от молекул растворителя, (iii) собственно адсорбция вещества на поверхности твёрдой фазы с образованием адсорбционного комплекса и (iv) ресольватация адсорбционного комплекса. В терминах стандартной свободной энергии этот процесс может быть выражен следующим равенством:

$$\Delta G^0 = \Delta G_{\text{десольв}}^0 + \Delta G_{\text{десорб}}^0 + \Delta G_{\text{ч.адс}}^0 + \Delta G_{\text{ресольв}}^0 + \Delta G_{\text{разб}}^0 \quad (1.31)$$

где члены с первого по четвёртый соответствуют стадиям (i)–(iv). Последний член уравнения ($\Delta G_{\text{разб}}^0$) описывает термодинамический эффект от разбавления подвижной фазы десорбированными молекулами растворителя. Обычно его абсолютная величина пренебрежимо мала. Аналогичные уравнения можно записать для энтальпии (H) и энтропии (S).

Энтальпия сольватации (противоположна по знаку энтальпии десольватации) варьируется от -90 до -130 кДж/моль при участии в растворении полярных и ионных взаимодействий. Это в 2-5 раз превышает наблюдаемые энтальпии адсорбции в жидко-твердофазных системах и указывает на то, что вклад сольватации в общий тепловой эффект адсорбции должен быть значительным. Червенак и Туни, исследуя термодинамику связывания белков с субстратами, установили, что сопутствующая реорганизация растворителя обеспечивает 25–100% общей энтальпии процесса [95].

Показательно сравнение энтальпий сольватации в водных растворах и сублимации дипептидов [96]. (Энтальпия сублимации – характеристика взаимодействия полярной молекулы с полярной поверхностью – может рассматриваться как грубая оценка величины чистой энтальпии адсорбции в исследуемых системах). Эти величины практически совпадают, указывая на то, что эти два эффекта в значительной мере компенсируют друг друга. Таким образом, наблюдаемые в жидкостной хроматографии умеренные, положительные или отрицательные, значения теплового эффекта адсорбции обусловлены суммой разницы между $\Delta H^0_{десольв}$ и $\Delta H^0_{ч.адс}$ и энтальпией ресольватации. Энтальпия десорбции растворителя, как правило, невелика, поэтому не оказывает существенного влияния.

Свободная энергия сольватации обычно заметно меньше её энтальпии, благодаря энтропийному терму, однако то же будет верно и для других значимых составляющих уравнения (1.31), поэтому соотношение между вкладами различных процессов в ΔG^0 адсорбции будет примерно таким же, как и в случае энтальпии адсорбции.

Сольватация в подвижной фазе, как ахиральный процесс, не будет оказывать влияния на энантиоразделение, однако ресольватация, зависящая от величины доступной поверхности энантиомера в составе адсорбционного комплекса (рис. 1.5), уже будет оказывать такое влияние, тем более сильное, чем сильнее отличаются конфигурации адсорбционных комплексов энантиомеров. Для общей разностной энергии Гиббса ($\Delta\Delta G^0 = \Delta G^0_2 - \Delta G^0_1$) можем записать

$$\Delta\Delta G^0 = \Delta\Delta G^0_{десорб} + \Delta\Delta G^0_{ч.адс} + \Delta\Delta G^0_{ресольв} + \Delta\Delta G^0_{разб} \quad (1.32)$$

В уравнении (1.32) первый и последний члены зависят от количества и состава десорбированного растворителя. В принципе при разной конфигурации связывания энантиомеров они могут вытеснять разные количества растворителя, но так как свободные энергии десорбции и разбавления малы, а их разности будут еще меньше, то их вкладом можно пренебречь. Таким образом, энантиоразделение будет определяться только эффектами чистой адсорбции и ресольватации.

Гаспаррини и сотр. продемонстрировали влияние ресольватации на процесс энантиоразделения на примере трипептидов на ХНФ с макробизицическим селектором при элюировании 3% метанолом, растворенным в дихлорметане [97]. Адсорбция сильнее удерживаемого энантиомера была слабо экзотермической ($\Delta H^0 = -4.1$ кДж/моль), а слабее удерживаемого – эндотермической ($\Delta H^0 = 14.6$ кДж/моль). Авторы объясняли это сильной реструктуризацией молекул растворителя вокруг адсорбированных молекул, сопровождающейся поглощением тепла. Экзотермический эффект энтальпии, возникающий из-за адсорбции, превышал эндотермический энтальпийный эффект реорганизации молекул растворителя. Решетовой и др. было выдвинуто предположение о значительном вкладе процессов сольватации/ресольватации энантиомеров дипептидов в общее изменение энтальпии на колонках Chirobiotic T и R в условиях обращенно-фазной хроматографии [98].

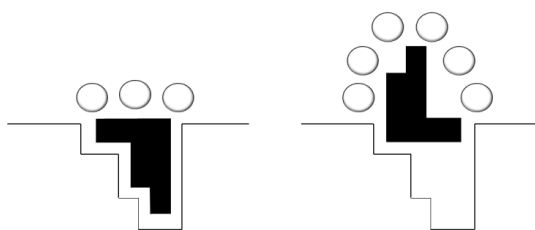


Рис. 1.5. Сильнее удерживаемый энантиомер (слева) имеет лучшее стерическое соответствие хиральной полости селектора, оставляя меньшую свободную площадь для сольватации растворителем, нежели слабее удерживаемый энантиомер (справа).

Электролитическая диссоциация

Слабые электролиты в определённом диапазоне рН присутствуют в растворах в виде ионов и нейтральных молекул. Логично предположить, что сродство к адсорбенту нейтральных и заряженных частиц будет отличаться. Первое математическое описание влияния этого явления на хроматографическое удерживание было дано Хорватом, Меландером и Молнармом (ХММ) [99]. Они предположили, что неподвижная фаза представляет собой совокупность одинаковых лигандов, равномерно распределённых по инертной поверхности. Ионогенный аналит существует в растворе в нескольких ионных (включая нейтральную) формах, находящихся между собой в равновесии, определяемом константами диссоциации K_{ai} по числу ионизируемых групп. Каждая ионная форма может образовывать с лигандом временный комплекс. Общий фактор удерживания складывается из парциальных факторов удерживания каждой ионной формы (k_j) с учётом её доли в ПФ (χ_j):

$$k = \sum_j k_j \chi_j \quad (1.33)$$

Например, для ионного равновесия $\text{AH} \rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+$ с константой равновесия K_a выражение для фактора удерживания выглядит следующим образом:

$$k = k_0\chi_0 + k_{-1}\chi_{-1} \quad (1.34)$$

где k_0 – это фактор удерживания недиссоциированной формы НА, а k_{-1} – фактор удерживания анионной формы A^- . Соответствующие доли частиц в растворе: $\chi_0 = 1 / (1 + [\text{H}^+] / K_a)$ и $\chi_{-1} = ([\text{H}^+] / K_a) / (1 + [\text{H}^+] / K_a)$. Это уравнение дает S-образную зависимость фактора удерживания аналита от рН ПФ с точкой перегиба в $\text{pH} = \text{p}K_a$. Отклонения от S-образного вида графика говорят о нарушении постулатов теории ХММ.

Аналогичным образом для цвиттер-ионных соединений выражение для k выглядит как

$$k = k_{+1}\chi_{+1} + k_0\chi_0 + k_{-1}\chi_{-1} \quad (1.35)$$

где индексы +1, 0 и -1 указывают на катионную, цвиттер-ионную и анионную формы цвиттер-иона, а соответствующие ионные доли даются уравнениями

$$\chi_{+1} = \frac{[\text{H}^+]^2}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a2}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a1}K_{a2}}\right) \cdot K_{a1}K_{a2}} \quad (1.36a)$$

$$\chi_0 = \frac{[\text{H}^+]}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a2}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a1}K_{a2}}\right) \cdot K_{a2}} \quad (1.36b)$$

$$\chi_{-1} = \frac{1}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a2}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a1}K_{a2}}} \quad (1.36в)$$

K_{a1} и K_{a2} – константы диссоциации основной и кислотной групп цвиттер-ионного аналита.

Теория ХММ была разработана для условий обращённо-фазовой хроматографии и успешно использовалась для описания зависимости удерживания слабых электролитов от рН на алкилированных силикагелях [100; 101]. Обобщение теории ХММ на случай нелинейной хроматографии было сделано Казакевичем [102].

В отличие от типичных обращённо-фазовых лигандов, макроциклические антибиотики содержат ионогенные фрагменты, которые при определённых значениях рН среды могут находиться в ионизированном состоянии и быть центрами ионообменной адсорбции, что нарушало бы постулаты теории ХММ. Тем не менее, уравнение модели хорошо описывало удерживание дипептидов (цвиттер-ионных соединений) на колонке Chirobiotic R с привитым антибиотиком ристоцетином и частично описывала данные по удерживанию на колонке Chirobiotic T с привитым антибиотиком тейкопланином [98]. S-образная зависимость $k(\text{pH})$ не

соблюдалась при адсорбции энантимеров профеновых кислот на колонке Nautilus-E с привитым антибиотиком эремомицином, что объяснялось смешанным ионообменно-адсорбционным механизмом удерживания [103]. В таких случаях учёт явления электролитической диссоциации требует привлечения более сложных моделей, которые бы описывали существование разных типов адсорбционных центров на поверхности в зависимости от величины рН, вариативность мод связывания разных форм аналита с разными формами хирального селектора и т. п.

1.2.9. Термодинамика адсорбции на границе жидкость-твёрдое тело

Равновесие адсорбции на границе жидкость-твёрдое тело определяется условиями равенства температур и давлений в твёрдой и жидкой фазах и условием равенства химических потенциалов компонентов раствора в жидкой фазе (μ_j^l) и в адсорбированном состоянии на поверхности адсорбента (μ_j^s) [44]:

$$\left. \begin{aligned} \mu_1^s &= \mu_1^l \\ \mu_2^s &= \mu_2^l \\ \dots\dots\dots \\ \mu_n^s &= \mu_n^l \end{aligned} \right\} \quad (1.37)$$

где n – число компонентов раствора. Химический потенциал каждого компонента в жидкой фазе является функцией концентраций всех компонентов жидкой фазы, потому что энергетическое состояние молекулы в растворе зависит не только от её внутренних степеней свободы, но и от её взаимодействия с окружающими молекулами. То же справедливо и для величин μ_j^s , которые являются функциями избыточных адсорбций всех компонентов на поверхности. Таким образом, для получения константы адсорбционного равновесия для некоторого компонента j в многокомпонентном растворе необходимо (1) выразить μ_j^s и μ_j^l как функции $\mu_j^s(\Gamma_1, \dots, \Gamma_j, \dots, \Gamma_n)$ и $\mu_j^l(c_1, \dots, c_j, \dots, c_n)$ и (2) решить систему уравнений (1.37). Сложность этой задачи проиллюстрирована в работе Эверетта [104], где она решена в явном виде для адсорбции бинарного раствора только после введения существенных упрощений. Метод активностей позволяет преодолеть эту сложность и вместо системы уравнений (1.37) получить n формально независимых уравнений, каждое из которых может рассматриваться отдельно.

Нас интересует только один компонент раствора – растворённое вещество, играющее роль адсорбтива, поэтому для краткости записи мы опустим нижний индекс j , зарезервировав позицию нижнего индекса для указания порядка выхода энантимеров.

Химический потенциал растворённого вещества в объёме жидкой фазы вдали от поверхности в рамках метода активностей определяется следующим выражением:

$$\mu^l = \mu^{l,0} + RT \ln(c\gamma^l) \quad (1.38)$$

где $\mu^{l,0}$ – стандартный химический потенциал адсорбтива в растворе, c – его концентрация, γ^l – коэффициент активности.

Химический потенциал вещества в адсорбированном состоянии может быть записан как

$$\mu^s = \mu^{s,0} + RT \ln(\Gamma\gamma^s) \quad (1.39)$$

где Γ – избыточная адсорбция, а γ^s – коэффициент активности адсорбированного вещества. Избыточная адсорбция задаётся по отношению к некоторой гипотетической системе сравнения, в которой присутствуют жидкая и твёрдая фазы, но адсорбционное взаимодействие между ними отсутствует [44]. В хроматографическом эксперименте такой системой сравнения является система с постоянным объёмом, что означает равенство нулю избыточного объёма (V^s).

Стандартные химические потенциалы, как следует из уравнений (1.38) и (1.39) относятся соответственно к концентрациям вещества в объёмной и адсорбционной фазах равным единице в выбранной размерности. Для жидкой фазы удобно выбрать молярность, тогда $\mu^{0,l} = \mu^l(c = 1 \text{ моль/л})$. В хроматографическом эксперименте масса сорбента в колонке, как правило, не известна. В то же время, объём неподвижной фазы в колонке может быть измерен экспериментально. Поэтому удобно в качестве размерности Γ выбрать моль/л (неподвижной фазы). Тогда $\mu^{s,0} = \mu^s(c = 1 \text{ моль/л})$.

Важно отметить, что стандартный химический потенциал не зависит от концентрации данного вещества, но зависит от концентраций всех остальных компонентов, составляющих данную фазу.

Подставляя уравнения (1.38) и (1.39) в уравнение (1.37), получим

$$\frac{\Gamma\gamma^s}{c\gamma^l} = \exp\left(-\frac{\mu^{s,0} - \mu^{l,0}}{RT}\right) \quad (1.40)$$

Для условий бесконечного разбавления, когда $\gamma^s = \gamma^l = 1$, и принимая во внимание уравнение (1.1), можем записать

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\Gamma}{c}\right) = K_c = \exp\left(-\frac{\mu^{s,0} - \mu^{l,0}}{RT}\right) \quad (1.41)$$

Из общетермодинамических соображений [105] следует, что в изохорных условиях

$$\mu^{s,0} - \mu^{l,0} = (\bar{U}^{s,0} - \bar{U}^{l,0}) - T(\bar{S}^{s,0} - \bar{S}^{l,0}) \quad (1.42)$$

тогда как в изобарных условиях

$$\mu^{s,0} - \mu^{l,0} = (\bar{H}^{s,0} - \bar{H}^{l,0}) - T(\bar{S}^{s,0} - \bar{S}^{l,0}) \quad (1.43)$$

где $\bar{U}^{s,0}$ ($\bar{H}^{s,0}$) и $\bar{S}^{s,0}$ избыточные стандартные дифференциальные внутренняя энергия (энтальпия) и энтропия вещества в адсорбированном состоянии и $\bar{U}^{l,0}$ и $\bar{S}^{l,0}$ стандартные парциальные внутренняя энергия (энтальпия) и энтропия этого вещества в жидкой фазе. Разности в первом и втором членах уравнений (1.42) и (1.43) представляют собой изменения дифференциальной внутренней энергии (энтальпии) и энтропии при переходе вещества из объема жидкой фазы на поверхность адсорбента, $\Delta\bar{U}^0$ ($\Delta\bar{H}^0$) и $\Delta\bar{S}^0$ соответственно. Откуда для изохорного процесса получаем хорошо известные уравнения изотермы и изохоры Вант-Гоффа:

$$RT \ln K_c = -\Delta\bar{F}^0 \quad (1.44)$$

$$\ln K_c = -\frac{\Delta\bar{U}^0}{RT} + \frac{\Delta\bar{S}^0}{R} \quad (1.45)$$

Аналогичным образом для изобарного процесса можем записать

$$RT \ln K_c = -\Delta\bar{G}^0 \quad (1.46)$$

$$\ln K_c = -\frac{\Delta\bar{H}^0}{RT} + \frac{\Delta\bar{S}^0}{R} \quad (1.47)$$

Изохора (1.45) и изобара (1.47) Вант-Гоффа получены при допущении независимости от температуры величин $\Delta\bar{U}^0$ ($\Delta\bar{H}^0$) и $\Delta\bar{S}^0$. Корректность такого подхода подробно обсуждалась в работе [106], где было показано, что для низкомолекулярных соединений в типичном жидкохроматографическом эксперименте, где исследованный диапазон температур относительно невелик (до 30 К), это допущение не приводит к заметным погрешностям. Также при выводе уравнений (1.46) и (1.47) допускалось, что молярная концентрация не зависит от температуры, что, строго говоря, не верно. При изменении температуры объем системы будет меняться, приводя к не связанному с адсорбцией изменению величины (Γ/c). Поскольку термическое расширение типичных хроматографических элюентов составляет величину порядка 0.1% /10 К, этим фактором можно пренебречь.

В связи с уравнениями (1.44)-(1.47) необходимо сделать несколько замечаний.

1) Уравнения выведены для равновесных процессов в закрытых системах. Хроматографический эксперимент проводится в открытых системах и является неравновесным. Однако уравнения (1.44) и (1.46) оценивают значения свободной энергии на основании величин K_c и, если экспериментальная величина K_c идентична равновесной, то полученные величины $\Delta\bar{F}^0$ или $\Delta\bar{G}^0$ тоже будут равновесными. Хроматографическое определение константы Генри основано на идеальной модели хроматографии, допускающей мгновенное установление

равновесия в зоне массопереноса [107]. Поэтому “равновесность” хроматографической константы K_c будет определяться справедливостью допущений идеальной модели. Современные колонки для ВЭЖХ характеризуются высокой скоростью достижения равновесия. Сравнение изотерм адсорбции на ХНФ, полученных в рамках идеальной и равновесно-дисперсионной моделей хроматографии, показывает их слабое отклонение друг от друга [108; 109], указывая на близость условий в хроматографической колонке к равновесным. Нами было показано [106], что в случае адсорбции на антибиотиковых неподвижных фазах “неравновесность” значений K_c приводит к сдвигу в значениях теплового эффекта и энтропии адсорбции всего на 1-2%.

2) Эмпирическим обоснованием применения уравнений (1.45) и (1.47) для определения термодинамических характеристик сорбции в хроматографии является удовлетворительное совпадение тепловых эффектов сорбции¹, найденных хроматографическим и калориметрическим методами [110; 111; 112; 113]. Кроме того, зависимости (равновесных) изостерических теплот адсорбции от величины адсорбции при экстраполяции на ось ординат ($\Gamma = 0$) хорошо совпадают с начальными, т.е. определёнными при бесконечном разбавлении по уравнению Вант-Гоффа, значениями теплот адсорбции (см., например, [114]).

3) Поскольку плотность жидкости велика (относительно плотности газа), а сжимаемость мала, слагаемое $p\Delta v$, где p – общее давление, а Δv – изменение мольного объёма жидкой фазы в процессе адсорбции, будет при невысоких давлениях пренебрежимо мало по сравнению с энтальпийным членом. Следовательно, различием между $\Delta\bar{U}^0$ и $\Delta\bar{H}^0$ или $\Delta\bar{F}^0$ и $\Delta\bar{G}^0$ можно пренебречь. При увеличении давления вклад работы расширения будет возрастать и при давлении порядка 100 атм может достигать величины 0.1-1 кДж/моль (оценка выполнена на основании типичных значений объёма сольватации [115]).

4) Процесс адсорбции в хроматографической колонке осуществляется в узкой зоне массопереноса, которая передвигается в процессе элюирования от входа к выходу. Движение ПФ осуществляется под действием градиента давления. У зоны массопереноса нет стенок в аксиальном направлении; градиент давления по ширине зоны незначительный и стационарный. Таким образом, хотя давление вдоль колонки меняется от точки к точке, в каждой точке оно остаётся неизменным во времени, т.е. процесс в этой точке является изобарным. Измеренный стандартный тепловой эффект – для определённости, допустим, это энтальпия – будет интегральным средним для всей области давлений, от p_o на выходе до p_{in} на входе в колонку:

¹ Кроме адсорбции исследовались тепловые эффекты растворения в неподвижных жидких фазах [111].

$(\Delta\bar{H}^0)_{изм} = 2(p_{in}^2 - p_o^2)^{-1} \times \int_{p_o}^{p_{in}} \Delta\bar{H}^0(p) p dp$. На практике это обстоятельство игнорируют, неявно допуская, что тепловой эффект адсорбции не зависит от давления. В условиях ВЭЖХ это допущение может быть принято, поскольку коэффициент $(\partial\bar{H}/\partial p)_T$ для низкомолекулярных соединений составляет величину порядка 0.1 кДж/100 атм.

Попытка разработать строгую термодинамическую теорию теплового эффекта адсорбции для открытых систем была предпринята Сиркаром [116], однако полученные им уравнения в силу своей сложности вряд ли могут быть использованы на практике. Более того, их применение не имеет практического смысла. Действительно, тепловые эффекты адсорбции, измеренные в открытых и закрытых системах, близки (см. п. 2), а следовательно поправки, вносимые в экспериментально измеренный температурный коэффициент K_c для получения равновесного значения теплового эффекта, будут порядка погрешности эксперимента.

Выбор набора уравнений для описания экспериментальных данных, (1.44) и (1.45) или (1.46) и (1.47), является дискуссионным и с теоретической точки зрения не будет безупречным ни в том, ни в другом случае. (С практической точки зрения между этими парами уравнений, по-видимому, нет разницы, потому что в условиях обычной ВЭЖХ ($p < 200$ атм) $\Delta\bar{U}^0$; $\Delta\bar{H}^0$ и $\Delta\bar{F}^0$; $\Delta\bar{G}^0$). Чаще в работах по жидкостной хроматографии используется изобара Вант-Гоффа [80; 106], хотя встречается и уравнение изохоры [117; 118]. Как следует из вышеприведённого обсуждения, выбор изобарных условий и соответствующих уравнений представляется более обоснованным и им будем пользоваться в дальнейшем.

Объединение уравнений (1.2) и (1.46) или (1.47) приводит к следующим выражениям, используемым для получения термодинамических характеристик адсорбции из хроматографических данных:

$$\Delta\bar{G}^0 = -RT \ln(k/\phi) \quad (1.48)$$

$$\ln k = -\frac{\Delta\bar{H}^0}{RT} + \frac{\Delta\bar{S}^0}{R} + \ln \phi \quad (1.49)$$

В данных уравнениях появляется величина отношения объёма фаз в колонке ϕ . Применение уравнения Вант-Гоффа (1.49) основано на допущении, что ϕ не зависит от температуры. Это допущение подвергалось критике [119] для октадецилсилированного силикагеля, для которого объём привитого органического слоя относительно велик. В случае исследуемых адсорбентов, где толщина привитого слоя мала по сравнению с радиусом зерна носителя (силикагеля), коэффициент температурного расширения которого не высок, можно считать допущение

постоянства ϕ в доступном нешироком интервале температур справедливым. Подробное обсуждение вопроса фазового отношения дано в обзоре [106].

При изучении адсорбции хиральных соединений измеряют удерживание обоих энантиомеров пары. На основании термодинамических характеристик индивидуальных энантиомеров, далее обозначаемых индексами 1 и 2, рассчитывают разностные характеристики $\Delta\Delta\bar{X}^0 = \Delta\bar{X}_2^0 - \Delta\bar{X}_1^0$, где X обозначает G , H или S . Разностную энергию Гиббса также можно определять непосредственно как

$$\Delta\Delta\bar{G}^0 = -RT \ln \alpha \quad (1.50)$$

Разбиение энергии Гиббса на энтальпийную и энтропийную составляющие

$$\Delta\Delta\bar{G}^0 = \Delta\Delta\bar{H}^0 - T\Delta\Delta\bar{S}^0 \quad (1.51)$$

используют для решения вопроса об энтальпийном (зависящем от прочности образующихся адсорбционных комплексов) или энтропийном (зависящем от структурных факторов) контроле энантиоразделения. Для расчёта энтропийного терма берут или среднеарифметическую, или среднегармоническую температуру исследованного температурного интервала.

Ранее существовало представление о том, что разности термодинамических характеристик отражают вклад только энантиоселективных взаимодействий. Легко доказать его ошибочность. Подставив выражение (1.25) в уравнение (1.50), получим для разностной энергии Гиббса

$$\Delta\Delta\bar{G}^0 = -RT \ln \frac{k_{es,2} + k_{ns}}{k_{es,1} + k_{ns}} \quad (1.52)$$

Как видно, величина $\Delta\Delta\bar{G}^0$ зависит от вклада как энантиоселективных, так и неселективных взаимодействий.

1.2.10. Экстратермодинамические методы

Под экстратермодинамическими методами понимают приёмы изучения механизмов удерживания и разделения, в которых связи между термодинамическими характеристиками адсорбции или термодинамическими характеристиками и экспериментальными параметрами предполагаются на основании нетермодинамических представлений. Наиболее популярными являются два метода: линейных соотношений свободных энергий и энтальпийно-энтропийной компенсации.

Линейные соотношения свободных энергий

Метод восходит к работам Гаммета и Тафта, предположившим, что свободные энергии физико-химических процессов (или функционально связанные с ними характеристики) могут

быть представлены в виде линейной комбинации параметров, отвечающих за различные стадии или различные аспекты этих процессов. В хроматографии наибольшее распространение получила модель Абрахама [120], записываемая в виде

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1.53)$$

где SP – величина, связанная со свободной энергией ($\lg k$, $\lg \alpha$, $\Delta \bar{G}^0$, $\Delta \Delta \bar{G}^0$), E , S , A , B , V – параметры, выступающие в качестве независимых переменных и описывающие свойства элюируемого вещества (поляризуемость, полярность, способность выступать донором водородной связи, способность выступать акцептором водородной связи, молекулярный объём), c – свободный член, не связанный со свойствами элюируемого вещества. Коэффициенты e , s , a , b и v отражают вклад соответствующего свойства в величину SP . Их находят методом регрессионного анализа по набору данных $SP = f(E, S, A, B, V)$ для группы веществ. В качестве примера применения метода для изучения энантиоселективных взаимодействий можно привести работы Тесаровой с сотр., выполнивших сравнительное исследование трех ХНФ на основе тейкопланина [121] и рассмотревших влияние состава подвижной фазы на энантиоселективное удерживание на данных адсорбентах [122].

Энтальпийно-энтропийная компенсация

Метод основан на предположении о наличии связи между энтальпией и энтропией физико-химического процесса [123]. Эту связь выявляют, исследуя зависимость энтальпии от энтропии для серии экспериментальных данных, в которых объекты исследования отличаются по какому-то одному параметру. Например, можно исследовать хроматографическое удерживание группы веществ на одной неподвижной фазе в идентичных условиях или одного вещества на одной неподвижной фазе из ПФ, отличающихся рН или содержанием модификатора. Считается, что если между энтальпией и энтропией процесса (в нашем случае хроматографического удерживания или энантиоразделения) наблюдается линейная зависимость, то механизм процесса для всех элементов группы одинаков.

Уравнение энтальпийно-энтропийной компенсации обычно записывают в виде

$$\Delta \bar{H}^0 = \beta \Delta \bar{S}^0 + \Delta \bar{G}_\beta^0 \quad (1.54)$$

где $\Delta \bar{G}_\beta^0$ – энергия Гиббса процесса при компенсационной температуре β . Аналогично для разностных характеристик можем записать

$$\Delta \Delta \bar{H}^0 = B \Delta \Delta \bar{S}^0 + \Delta \Delta \bar{G}_B^0 \quad (1.55)$$

Уравнение (1.54) позволяет исследовать процессы удерживания, тогда как уравнение (1.55) – механизмы энантиораспознавания.

Альтернативная форма записи компенсационного эффекта (КЭ) предполагает поиск корреляции не между энтальпией и энтропией, а между энтальпией и энергией Гиббса [124]:

$$\Delta\bar{H}^0 = \gamma\Delta\bar{G}^0 + (1-\gamma)\Delta\bar{G}_\beta^0 \quad (1.56)$$

где $\gamma = 1/(1 - T/\beta)$ и T – температура, использовавшаяся для расчёта $\Delta\bar{G}^0$. В качестве таковой рекомендуется брать среднегармоническую температуру исследованного температурного интервала. Считается, что корреляция $\Delta\bar{H}^0 = f(\Delta\bar{G}^0)$ лучше защищена от ложного КЭ, чем зависимость вида $\Delta\bar{H}^0 = f(\Delta\bar{S}^0)$. Под ложным КЭ понимают ситуацию, когда причиной линейной связи между энтальпией и энтропией являются не физически обусловленные явления, а статистическая корреляция между погрешностями определения $\Delta\bar{H}^0$ и $\Delta\bar{S}^0$ методом регрессионного анализа по уравнению Вант-Гоффа [125].

Другим способом выявления ложного КЭ является сравнение компенсационной и среднегармонической температур. Совпадение этих величин в пределах погрешности эксперимента служит серьёзным признаком ложного КЭ [124].

Поиск энтальпийно-энтропийной компенсации активно используется в хроматографии для изучения механизмов удерживания и разделения. Инуи и Хакуши установили линейные корреляции между энтальпией и энтропией адсорбции катионов одно- и бивалентных металлов для ряда лигандов, в том числе производных краун-эфиров и некоторых антибиотиков. Было показано, что электростатические взаимодействия определяют адсорбционный механизм [126]. Харун с соавт., проанализировав термодинамические данные адсорбции энантиомеров триптофана, полученные для тейкопланина и агликона тейкопланина, установила, что дегидратация межфазной поверхности играет важную роль в связывании триптофана с хиральным селектором и в некоторой степени контролирует энантиораспознавание [127]. Авторами было оценено среднее число молекул воды, вытесняемых с адсорбционных центров тейкопланина и его агликона в процессе адсорбции. Проявления компенсационного эффекта на примере адсорбции энантиомеров профенов на силикагеле с привитым антибиотиком эремомицином обсуждается в работе Аснина и Решетовой [128]. Было показано отличие механизма адсорбции ибупрофена по отношению к исследованному ряду соединений. Компенсационные зависимости, полученные при различных значениях рН элюента показали, что механизм удерживания профенов S-ряда не претерпевал существенных изменений при изменении кислотности ПФ. Этот же адсорбент использовался в обсуждении КЭ на примере энантиомеров α -фенилкарбоновых кислот [129]. С его помощью было обнаружено различие в механизмах адсорбции миндальной и других α -фенилкарбоновых кислот.

1.3 Хиральные неподвижные фазы

Для того, чтобы разделять оптические изомеры, неподвижная фаза должна содержать хиральные элементы, способные к стереоселективному взаимодействию с энантиомерами. Они могут находиться на поверхности ХНФ или быть распределены по всему её объёму. В последнем случае диффузия разделяемых компонентов в объём матрицы сорбента должна быть возможна. Исторически первые хиральные сорбенты изготавливались из натуральных хиральных материалов и за исключением кварца относились к этой последней группе. Это были природные полисахариды целлюлоза и лактоза [130; 19]. Впоследствии было установлено, что химическая модификация целлюлозы позволяет повысить селективность сорбента, и в практику хиральных разделений был введён микрокристаллический триацетат целлюлозы [131]. Эффективность разделения на таких неподвижных фазах была невысокой по причине медленной кинетики массопереноса в зерне сорбента, что приводило к сильному размыванию хроматографических пиков. В 1984 г. Окамото предложил наносить тонкие пленки производных целлюлозы на макропористые частицы силикагеля, что привело к повышению эффективности разделения за счет сокращения пути диффузии и увеличения площади поверхности [132]. Повышение механической устойчивости позволило использовать такие ХНФ при высоких скоростях потока, требующих высоких давлений на входе в колонку. В настоящее время материалы, получаемые иммобилизацией тонкого (часто мономолекулярного) хирального слоя на твёрдом ахиральном носителе (в основном силикагеле) составляют основной набор коммерческих ХНФ. В виде объёмнохиральных гранул синтезируют молекулярно-импринтированные полимеры или хиральные металлоорганические каркасы, но эти сорбенты не получили коммерческого распространения.

Неподвижные фазы с поверхностным хиральным слоем получают или путём адсорбционного нанесения хирального вещества, или путём его химической иммобилизации. Первым способом наносят белки [133] и полисахариды [134]. Первые ХНФ с краун-эфирами (Crownpak) также получали адсорбцией активного вещества на силикагеле [135]. Химическая иммобилизация используется для нанесения синтетических полимеров. Так, например, получают ХНФ Khromasil CHI-DMB, осуществляя сополимеризацию *O,O'*-бис(3,5-диметилбензол)-*N,N'*-диаллил-(*R,R*)-тартарамид в присутствии полифункциональных гидроксисиланов на поверхности винилизованного силикагеля [26]. Но чаще всего этот метод применяется для иммобилизации низкомолекулярных хиральных селекторов. Первым, в конце 1960-х гг., такой сорбент получил Даванков, привив L-пролин к полистиролу, для использования в методе лигандо-обменной хроматографии [136]. С середины 1980-х гг., благодаря работам Пиркла с сотр. [20] и Армстронга с сотр. [137], начинаются активные

исследования по синтезу ХНФ с привитыми низкомолекулярными селекторами. Принято классифицировать низкомолекулярные селекторы по их химической природе. Различают ХНФ с привитыми циклодекстринами, нативными и химически модифицированными [138], циклофруктанами [139], краун-эфирами [140], с соединениями, способными к протонодонорно-акцепторным и/или π - π -взаимодействиям (фазы Пиркла) [141], с макроциклическими антибиотиками (см. раздел 1.3.1). В последнее десятилетие всё большее распространение получают хиральные селекторы на основе производных алкалоидов хинина и хинидина. Ранее их относили к фазам Пиркла, но теперь выделяют в особый класс низкомолекулярных селекторов [26], учитывая их ионообменную активность [142; 143], которой фазы Пиркла не обладают. Периодически в литературе встречаются сообщения о хиральных адсорбентах с селекторными молекулами других классов, например, комплексов металлов [144] или циклических триптиценов [145], однако они не нашли коммерческого применения. Представленная работа посвящена ХНФ на основе привитых макроциклических антибиотиков. Они будут рассмотрены подробно далее.

1.3.1. Хиральные неподвижные фазы с привитыми антибиотиками

В 1994 году Армстронг, основываясь на возможности циклодекстринов образовывать стереоселективные комплексы включения, предложил использовать макроциклические антибиотики (МА) в качестве хиральных селекторов для ВЭЖХ. Было известно, что эти соединения способны селективно связывать терминальный фрагмент рецепторного белка клеточной стенки бактерий $-D-Ala-D-Ala$, но не образуют прочного комплекса с его энантиомерным антиподом $-L-Ala-L-Ala$ [146]. Армстронг предположил, что МА, привитые к твёрдому носителю, будут обладать энантиоселективностью по отношению к аминокислотам и низкомолекулярным пептидам. Разработав с сотрудниками методику ковалентной иммобилизации МА на силикагеле [79], он продемонстрировал возможности полученных ХНФ в энантиоразделении не только аминокислот и пептидов, но и большого круга других соединений [45; 147; 79]. Армстронг коммерциализировал свои неподвижные фазы под торговой маркой Chirobiotic. Тип привитого селектора обозначался первой буквой названия антибиотика, следующей за именем торговой марки (Chirobiotic T (тейкопланин), Chirobiotic V (ванкомицин) и Chirobiotic R (ристоцетин А)). Благодаря своей универсальности, совместимости почти с любыми хроматографическими растворителями: обращённо-фазовыми, полярно-органическими, неполярно-фазовыми, антибиотиковые ХНФ получили широкое распространение в хроматографической практике [148; 26]. Наиболее часто используют ХНФ с привитыми тейкопланином, ристоцетином А, ванкомицином и эремомицином. Особенности

структуры этих МА позволяют им проявлять различные типы взаимодействий с адсорбатом: ион-ионные, ион-дипольные, диполь-дипольные, водородное связывание, π - π -связывание и гидрофобные взаимодействия. Наличие хиральных фрагментов, включающих функциональные группы, делает часть этих взаимодействий стерически зависимыми. Способ ковалентного закрепления антибиотика на поверхности носителя влияет на число и качество свободных функциональных групп (если закрепление происходит через них) и на то, какая часть селектора будет направлена в сторону жидкой фазы, и, следовательно, на его адсорбционные свойства.

Селекторы с привитыми МА содержат в своей структуре ионизируемые группы: первичные и вторичные амины, которые в кислой и нейтральной среде имеют положительный заряд, а также карбоксильные группы, приобретающие отрицательный заряд в нейтральной и щелочной средах, что позволяет «настраивать» ионное состояние хирального селектора с помощью рН подвижной фазы. Общий заряд частицы селектора в среде с данной рН зависит от значения рI МА, определяющегося значениями констант диссоциации кислотных карбоксильных и фенольных групп и основных аминогрупп.

Все используемые в хроматографии МА имеют сходное строение (рис. 1.6) [10]. В основе структуры лежит агликоновая часть, состоящая из четырех макроциклов, содержащих по два ароматических кольца и последовательность пептидных связей. Первый макроцикл образован двумя бензольными кольцами 1 и 2, связанными метокси-группой и двумя аминогруппами. Второй и третий макроциклы, образованные соответственно бензольными кольцами 2 и 3, одной метокси и двумя амидными группами, соединены с 4-м и 5-м макроциклами. Четвертый макроцикл (только у тейкопланина и ристоцетина А) образован 6-м и 7-м бензольными кольцами, связанными метокси-группой и двумя амидными группами. Эти макроциклы формируют объемную структуру, так называемый «карман», способный к образованию комплексов включения [35]. Наличие первых трех макроциклов, составляющих агликоновую часть молекулы, характерно для всех гликопептидных антибиотиков. Агликоновый «карман» имеет полужесткую структуру и ориентируется в пространстве в С-образную фигуру с разной степенью спирального скручивания, то есть имеет сложное изогнутое отверстие, образованное группами, расположенными на противоположных сторонах полости [149]. Отверстие имеет диаметр от 4.5 Å (для тейкопланина) до 9.3 Å (для ванкомицина). Такая структура селектора позволяет образовывать комплексы включения путем вхождения молекулы или ее части в полость МА. Некоторые важные физико-химические свойства МА приведены в табл. 1.1. Применению МА в хроматографии посвящено несколько обзоров [9; 10; 11; 26; 150; 151; 152; 153; 154; 155]. Далее будут обобщены сведения об использованных в данной работе антибиотиковых селекторах.

Физико-химические свойства хиральных селекторов

Характеристика	Тейкопланин	Ристоцетин А	Эремомицин	Ванкомицин
Молекулярный вес, Да	1878	2066	1556	1449
pK_a	2.8; 7.4; 8.5; 8.9; 9.3; 11.0	7.0; 8.3; 9.2; 9.9; 10.1; 10.9	2.9; 7.1; 8.3; 9.2; 10.1; 10.9; 12.0	2.9; 6.8; 7.7; 8.5; 10.4; 11.7
pI	3.8 [10], 6.5 [156]	7.5	8.5	7.2

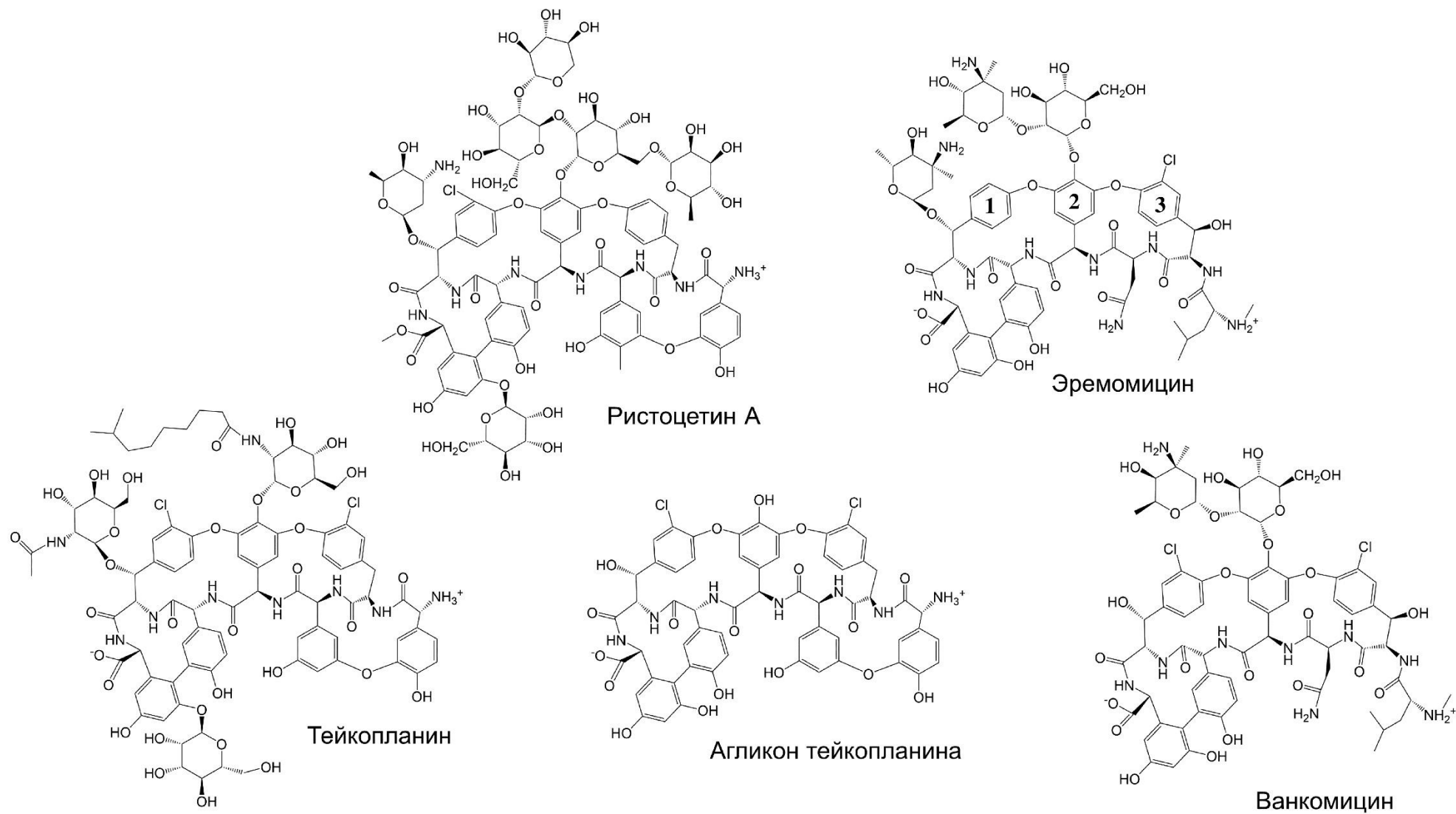


Рис. 1.6. Структуры пяти макроциклических гликопептидных антибиотиков, в основе каждого по крайней мере 3 макроцикла.

1.3.1.1. Эремомицин

Антибиотик эремомицин – структурный аналог ванкомицина – был выделен из культуры бактерий *Amycolatopsis orientalis* в Институте по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе [157]. Молекула эремомицина содержит 22 хиральных центра, 3 углеводных остатка (глюкоза и аминсахарид эремозамин), 5 ароматических колец, 1 карбоксильную группу, 9 гидроксигрупп, 7 амидных групп и 3 аминогруппы. Использовать эремомицин в качестве хирального селектора для хроматографии предложил Староверов с соавт., для чего ими был разработан оригинальный способ закрепления антибиотика на поверхности силикагеля [158]. Полученные ХНФ выпускались сначала под названием Diaspher-Chirasel-E, но позже были переименованы в Nautilus-E.

Эремомицин в отличие от ванкомицина содержит на один атом хлора меньше в макроциклическом фрагменте и имеет дополнительный углеводный остаток. При этом эремомициновая ХНФ показывает более высокую энантиоселективность по отношению к аминокислотам, чем ванкомициновая [159]. Было высказано предположение, что эремозаминовый углеводный остаток вблизи первого бензольного кольца молекулы эремомицина (рис. 1.6) – он отсутствует у ванкомицина – является дополнительным фактором облегчающим энантиораспознавание аминокислот [153]. Возможно, роль в этом играет аминогруппа эремозамина. Сравнивая ХНФ с привитыми нативным эремомицином и его эремозаминилагликоном, Кузнецов и др. [160] обнаружили, что удаление дисахаридного фрагмента приводит к улучшению разделения энантиомеров аминокислот с боковым алифатическим радикалом, но потеря энантиоселективности по отношению к аминокислотам с боковой ароматической группой, что также демонстрирует важную роль, которую играют углеводные остатки в энантиоразделении на эремомициновом селекторе.

В работе [159] на эремомициновой колонке было осуществлено разделение энантиомеров некоторых α -амино, α -гидрокси и 2-арилпропановых кислот (профенов). Этой же группой авторов были изучены зависимости фактора удерживания α -аминокислот и коэффициента энантиоразделения от структуры бокового радикала кислот, рН элюента, содержания органического модификатора в нём и температуры [160]. Было показано, что L-энантиомеры удерживаются слабее, чем их оптические антиподы. С увеличением доли этанола в ПФ удерживание увеличивалось, тогда как энантиоселективность уменьшалась. Добавление NaH_2PO_4 снижало коэффициенты удерживания и улучшало разделяющую способность ХНФ. Объяснение данного явления ограничивалось констатацией факта наличия ионных взаимодействий. Подробное исследование удерживания 2-арилпропановых кислот на Diaspher-

Chirasel-E была выполнено в работе [128]. Продемонстрировано отличие в механизмах удерживания кислот, содержащих разное количество бензольных колец в структуре. Показано, что состав ПФ влияет на элюционные характеристики в том числе посредством влияния на ионное состояние селектора и аналитов. Измерение термодинамических характеристик адсорбции ряда 2-арилпропановых кислот из ацетатных буферных растворов с разным содержанием буферных компонентов позволило подтвердить влияние рН и ионной силы раствора на удерживание [103]. Петрушевской с соавт. были измерены изотермы адсорбции D- и L-метионина на ХНФ Diaspher-Chirasel-E [161]. Экспериментальные данные хорошо описывались моделью би-Лэнгмюра, указывая на существование на поверхности неподвижной фазы адсорбционных центров, как минимум, двух типов. Энергетическая неоднородность поверхности данной ХНФ была предположена и в работе [115], в которой исследовали адсорбцию ибупрофена. Изотермы адсорбции обоих энантиомеров ибупрофена имели сложную форму с кривизной нелэнгмюровского типа [114]. Никитина с соавт. изучали природу поверхности ХНФ Nautilus-E методом адсорбции бинарных растворителей [162]. Измерение изотерм адсорбции воды из водно-метанольных и водно-ацетонитрильных ПФ показало, что поверхность адсорбента является гидрофильной. Такие свойства обусловлены наличием множественных полярных групп в структуре хирального лиганда, а также остаточных силанольных групп силикагелевого носителя. В этой же работе показано, что толщина адсорбционного слоя для водно-ацетонитрильных ПФ составляла величину порядка четырёх диаметров молекул растворителей, тогда как для водно-метанольных ПФ не превышала толщины мономолекулярного слоя. В этой же работе была предложена двухкамерная модель строения адсорбционного слоя на поверхности антибиотиковых неподвижных фаз, согласно которой адсорбированный слой ПФ состоит из двух «отделений». Первое включает слой жидкости между твердой подложкой и верхней границей привитых селекторов, а второй – адсорбированную жидкость на внешней поверхности селекторов. Первое «отделение» оказывается недоступно для крупных органических молекул (диаметром более 8 Å) но доступно для молекул растворителя, тогда как второе доступно и для мелких, и для крупных молекул.

1.3.1.2. Ристоцетин А

Гликопептидный антибиотик ристоцетин А производится бактериями *Nocardia lurida*. Этот же штамм производит его структурный аналог – гликопептид ристоцетин В, отличающийся от ристоцетина А количеством углеводных остатков. Ристоцетин В не используется при изготовлении ХНФ, однако может попадать в них в незначительных

количествах в виде примеси. Ристоцетин А имеет 38 стереогенных центров, 7 ароматических колец, 21 гидроксигруппу, 2 первичных аминогруппы (одна из которых находится в агликоновой части, а другая – в составе аминсахарида ристозамина), 1 метоксигруппу, ароматические фрагменты и 6 углеводных остатков, присоединённых к агликоновой части в виде двух моносахаридов (ристокзамин и манноза) и тетрасахарида, состоящего из рамнозы, арабинозы, маннозы и глюкозы. Карбоксильная группа ристоцетина метилирована. Хиральный «карман», свойственный структуре гликопептидных МА, присутствует также и в молекуле ристоцетина А [35].

В качестве хроматографического селектора ристоцетин А впервые был использован Армстронгом с сотр. [79]. Селектор они прививали к силикагелю путём дериватизации антибиотика (3-изоцианатопропил)-триэтоксисиланом с последующей реакцией аддукта антибиотика и силана с силикагелем [79]. Поскольку pI ристоцетина А равно 7.5, это предопределяет слабые анионообменные свойства селектора в стандартных экспериментальных условиях ($pH = 3.5-7.5$). Действительно, ХНФ Chirobiotic R показала хорошую эффективность в разделении энантиомеров хиральных органических кислот и цвиттер-ионных соединений [153], однако с её помощью разделяли рацематы и нейтральных соединений [149]. В зависимости от гидрофобности аналита можно использовать различные режимы ВЭЖХ. Водорастворимые вещества разделяют в режиме обращённо-фазовой хроматографии, тогда как гидрофобные – в полярно-органическом и нормально-фазовом режимах. В разных режимах действуют разные наборы межмолекулярных сил. Армстронг и др. предполагали, что для нормально-фазового режима характерны π - π взаимодействия и образование водородных связей. В обращённо-фазовом режиме удерживание осуществляется преимущественно за счёт электростатических взаимодействий между адсорбатом и заряженной аминогруппой селектора и гидрофобных взаимодействий между возникающих в относительно гидрофобном хиральном «кармане» частицы ристоцетина А [147]. Водородные связи и стерические взаимодействия играют вторичную роль. Согласно этой модели, важное значение для удерживания имеет расстояние, на которое отрицательно заряженный (или нуклеофильный) фрагмент молекулы адсорбата может приблизиться к аминогруппе. Соответственно энантиоразделение будет зависеть от того, как разные энантиомеры ориентируются относительно этой аминогруппы. Описанная модель вызывает сомнения, поскольку не согласуется с экспериментально доказанной моделью Вильямса (рис. 1.4) [36], в которой связывание аминокислот и пептидов осуществляется за счёт комбинации водородных связей и гидрофобных взаимодействий между селектандом и внутренними стенками хирального «кармана» селектора, а разделение основано на стерических соответствиях, возникающих внутри хирального «кармана». Отметим, что собственные

экспериментальные данные Армстронга и др. [147] указывали на важность водородных связей в обращённо-фазовом режиме. Так они наблюдали различие зависимостей фактора удерживания от доли органического растворителя в ПФ при элюировании дансилфенилаланина и N-3,5-динитро-2-пиридилсерина водно-метанольными и водно-ацетонитрильными буферными смесями в области содержаний CH_3CN более 70 % об. Этот факт разумно объясняли неспособностью апротонного ацетонитрила в отличие от метанола конкурировать с аналитом за образование водородных связей с селектором. Петер с совт., исследуя удерживание на Chirobiotic R аналогов триптофана, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолина и γ -бутиролактона, заключили, что в обращённо-фазовом режиме реализуются водородные связи, ион-ионные, гидрофобные и электроориентационные взаимодействия, без выделения предпочтительных типов взаимодействий [163; 164; 48].

В работе [165] изучали энантиоразделение хиральных производных ксантона, веществ строение скелета которых близко строению пирролохинолонного фрагмента ОПХ, на Chirobiotic R в четырех режимах элюирования. Лучшее разделение энантиомеров было достигнуто в нормально-фазовом режиме. Докинговые расчеты показали, что образование адсорционных комплексов происходит благодаря π - π связям между каркасом производных ксантона и ароматическими кольцами селектора ристоцетина А. При этом для каждого селектора характерен свой тип связывания.

Отечественный аналог Chirobiotic R выпускается под названием Nautilus-R. Имобилизация ристоцетина А осуществлялась реакцией антибиотика с эпоксицированным силикагелем [158]. Различие способов синтеза Chirobiotic R и Nautilus-R отразилось на свойствах адсорбентов. Их сравнение было выполнено в рамках представленной работы и подробно обсуждается в разделе 4.1.4. ХНФ Nautilus-R является мало изученной. Гоголишвили и Решетова провели сравнительное исследование колонок Nautilus-R, Nautilus R и Chirobiotic T, используя в качестве тестовых веществ гидроксикислоты [166]. Они пришли к выводу, что на ХНФ с привитыми ристоцетином А и эремомицином ключевую роль в удерживании играют ион-ионные взаимодействия, тогда как на ХНФ с привитым тейкоплатином – неионные. Возможно, в случае с ристоцетиновой неподвижной фазой нет противоречия с вышеупомянутой моделью Вильямса, поскольку она разработана для аминокислот и низкомолекулярных пептидов.

1.3.1.3. Тейкоплатин

Тейкоплатин является наиболее часто используемым хиральным селектором из числа МА для хроматографического разделения энантиомеров. Известно более сотни оптически

активных соединений, разделенных на ХНФ на основе тейкопланина [167], среди которых природные и синтетические аминокислоты и дипептиды [45; 168; 151; 163]. Тейкопланин синтезируется актиномицетами *Actinoplanes teichomyceticus* и является близким структурным аналогом ристоцетина А. Его молекула включает три углеводных остатка, к одному из которых присоединён гидрофобный фрагмент в виде остатка жирной кислоты. Молекула имеет одну карбоксильную группу и две аминогруппы, одна из которых или обе участвуют в иммобилизации по методу Армстронга при изготовлении Chirobiotic Т. Сообщалось о тейкопланиновых ХНФ, полученных другими методами [11], но они не получили коммерческого распространения. Тейкопланин характеризуется более низким значением изоэлектрической точки (табл. 1.1), чем другие МА. Углеводные фрагменты селектора затрудняют подход аминокислот к хиральному «карману» и способствуют снижению их удерживания и энантиораспознавания [47]. Однако, на энантиоселективность по отношению к таким веществам как дигидрофурукумарин, гидрокси-миндальная кислота, N-бензоил-фенилаланин [169] наличие углеводной части сказывалось положительно. Это говорит о том, что в процесс энантиоразделения могут быть включены разные части селектора в зависимости от природы аналита.

Сяо и Армстронг полагали, что в условиях обращенно-фазовой хроматографии гликопептидные антибиотики выступают как относительно неполярные центры адсорбции (по сравнению с полярной подвижной фазой) по причине наличия гидрофобного хирального «кармана» в своей структуре [153]. Это должно быть тем более справедливо для тейкопланина, благодаря наличию длинноцепочечного алкильного фрагмента. Действительно, Пейрин и др. наблюдали увеличение характеристик удерживания дансилированных аминокислот на Chirobiotic Т с увеличением гидрофобности аналита из преимущественно водной (10% об. CH_3OH) ПФ [170], т.е. более гидрофобные аналиты сильнее «выталкивались» из ПФ на поверхность адсорбента. Интересно, что сам хиральный «карман» тейкопланина, возможно, не был задействован, поскольку значения фактора разделения энантиомеров были невелики ($\alpha = 1.1-1.2$), заставляя предположить, что стереозависимые комплексы включения не образовывались.

Влияние содержания в ПФ органического растворителя (метанола или ацетонитрила) на удерживание рассматривалось на примере 5-метил-5-фенилгидантоина [46]. Наблюдались U-образные зависимости k от доли органического компонента для ацетонитрила и монотонно убывающие с ростом φ для метанола. Авторы объясняли возрастающую ветвь зависимости $k(\varphi)$ при $\varphi > 80\%$ об. в первом случае тем, что апротонный ацетонитрил не может конкурировать с аналитом за образование водородных связей с поверхностью неподвижной фазы. Берто с соавт.

[171] рассматривали удерживание аминокислот фенилаланина и триптофана на ХНФ с привитыми тейкопланином и структурно близким макроциклическим антибиотиком А-40,926 из водно-метанольных ПФ. Увеличение удерживания фенилаланина с ростом доли метанола в ПФ авторы объясняли уменьшением растворимости аминокислоты в обогащённых метанолом растворителях. Более корректным объяснением на наш взгляд было бы ухудшение сольватации аминокислоты в жидкой фазе при увеличении доли спирта. U-образная зависимость $k(\varphi)$ для триптофана не получила объяснения.

В работе [46] также изучалось влияние рН на удерживание кислотных и нейтральных аналитов. Было установлено, что подкисление ПФ до 4.1 приводит к заметному увеличению удерживания соединений со свободными карбоксильными группами, указывая на то, что протонированные кислоты прочнее связываются с тейкопланином, чем соответствующие анионы. Похожие результаты сообщались и в работе [172]. Ожидаемо рН не сильно влияло на удерживание нейтральных аналитов. Авторы приводят интересное наблюдение, что значение рН (~ 7.0) оптимальное для фактора разделения энантиомеров (α) не совпадает со значением рН (~ 4.1) оптимальным для разрешения (R_s)¹ пиков энантиомеров. Это свидетельствует о том, что рН по-разному влияет на адсорбционное равновесие и кинетику массопереноса в слое адсорбента.

Для изучения адсорбции аминокислот на тейкопланиновых ХНФ привлекался метод нелинейной хроматографии (измерение изотерм адсорбции). Яндера с соавт. изучали адсорбцию энантиомеров фенилглицина и триптофана из смесей вода-метанол и вода-этанол соответственно. Было показано, что адсорбция слабее удерживаемых L-энантиомеров хорошо описывается изотерма адсорбции Лэнгмюра, тогда как для сильнее удерживаемых D-энантиомеров требовалось использовать изотерму адсорбции би-Лэнгмюра, тем самым позволяя предположить, что более прочная адсорбция D-формы достигается за счёт включения в процесс дополнительных адсорбционных центров, которые способны к удерживанию D-формы, но не способны к удерживанию L-формы. Неравномерное распределение адсорбционных центров по энергиям предполагали и Каваццини с соавт., исследовавшие энантиоселективную адсорбцию пролина, аланина и аланилаланина [173].

¹ Величина R_s определяется как отношение разности между временами выхода пиков к сумме полуширин пиков.

1.4. Хиральная хроматография исследуемых классов соединений

1.4.1. Хинолоны

Хиральные хинолоны хорошо известны в качестве антибактериальных агентов [174]. В клинической практике активно используются фторхинолоны офлоксацин, флуомекин, ломефлоксацин и др., аминохинолоны примакин, хлорокин и др. Известны и другие виды биологической активности хинолонов. Так, например, пирролохинолоны могут обладать гипергликемическим эффектом [175]. Поскольку эти соединения могут существовать в виде двух оптических изомеров, интерес фармакологов и медиков вызывало изучение биологической активности индивидуальных энантиомеров, что послужило движущей силой для создания методов разделения энантиомеров хинолонов. Для энантиоразделения хиральных фторхинолонов использовались адсорбенты с привитыми хиральными селекторами на основе гликопротеинов [176; 177], краун-эфиров [178; 179] и полисахаридов [180; 181; 182]. Механизмы энантиоселективного удерживания в данных работах не исследовались. В [178] авторы пришли к выводу, что на энантиоразделение фторхинолонов на ХНФ с привитым 18-краун-6 эфиром может влиять расположение аминогруппы по отношению к хиральному центру молекулы аналита, поскольку механизм разделения на краун-эфирах зависит от водородных взаимодействий, возникающих между протонированными аминогруппами и атомом кислорода эфирных групп. Так, аналиты, имеющие в своем составе аминогруппу, расположенную в непосредственной близости от хирального центра, разделялись лучше, нежели те, у которых данная группа находилась на удалении от асимметрического центра молекулы. Штерном с сотрудниками сообщалось о разделении до нулевой линии производных 4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-карбоксамидов на колонках Chiralpak AD-H, AD, AS на основе силикагеля с привитым полисахаридом амилозой [183]. В [182] сообщалось о разделении энантиомеров флуомекина, офлоксацина и ломефлоксацина с использованием адсорбентов на основе различных полисахаридов (производных 3-хлор-4-метилфенилкарбаматов амилозы и целлюлозы) в нормально-фазовом и обращенно-фазовом режимах. Было установлено влияние органического растворителя ПФ на энантиоразделение исследуемых веществ. Молекулы органического растворителя вступали в конкурентную адсорбцию с энантиомерами исследуемых веществ за энантиоселективные и неселективные адсорбционные центры хирального селектора.

Аль-Отман с соавт. сообщали об успешном энантиоразделении энантиомеров ломефлоксацина, офлоксацина, примахина и хинакрина на ХНФ Chirobiotic V с использованием в качестве ПФ смесей состава MeOH:ACN:H₂O:TEA (50:30:20:0.1) и MeOH:ACN:H₂O:TEA

(70:10:20:0.1) [184]. Было выдвинуто предположение, что энантиораспознавание происходит благодаря стереоспецифическому связыванию аналитов с функциональными группами внутри хиральной «полости» селектора. Наибольшее влияние на связывание оказывают π - π взаимодействия и водородные связи. Были измерены термодинамические характеристики адсорбции, однако обсуждение этой информации в статье отсутствует.

Али, Сухаилом и Асниним было изучено хиральное разделение некоторых модельных хинолонов на ХНФ Chirobiotic T [185]. По данным хроматографического удерживания, а также докинговых исследований было установлено, что водородные связи и π - π взаимодействия определяют энантиоразделение хинолонов. Согласно оценкам компьютерного моделирования R-энантиомеры образовывали с адсорбентом более прочные адсорбционные комплексы, чем S, что подтверждалось порядком выхода энантиомеров, наблюдаемом в хроматографическом эксперименте.

Анализ доступной литературы показал, что механизмы энантиоселективной адсорбции веществ хинолонового ряда практически не изучены. Среди ХНФ, на которых удалось успешно разделить энантиомеры данного класса веществ, преобладают фазы с привитыми краун-эфирами. Среди ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками известно две работы: по разделению на тейкопланине и ванкомицине. Термодинамические характеристики адсорбции на антибиотиковых колонках не изучались. Вещества подкласса оксазолопирролохинолонов до сих пор не изучались.

1.4.2. Дипептиды

Для разделения энантиомеров дипептидов и трипептидов используются ХНФ с селекторами разной природы [186]. Скриба с соавт. сообщали об энантиоразделении различных дипептидов на ХНФ с привитыми тетракарбоксо-производными краун-эфиров [187]. Сообщалось, что удерживание LL- и LD-стереоизомеров было сильнее по сравнению с DD- и DL-формами в аналогичных условиях. Авторы заключили, что стереохимия хирального центра, расположенного ближе к протонированной первичной аминогруппе, определяет порядок элюирования энантиомеров. А энантиораспознавание основано на формировании комплексов включения посредством образования водородных связей между протонированными аминогруппами пептидов и атомами кислорода полиэфирного кольца краун-эфира.

Известно об успешном использовании селекторов на основе циклодекстринов для разделения ди-, три- и тетрапептидов. В основе энантиоразделения лежит свойство олигосахаридного кольца образовывать комплексы включения с молекулами адсорбатов. Так,

энантиомеры циклических и линейных [188], а также дериватизированных по N-концу пептидов [189] были разделены на ХНФ на основе β - и γ -циклодекстринов.

Группой Линднера было предложено использовать алкалоиды хинина в качестве хиральных селекторов для разделения пептидов олиго-аланинов. Этой же группой была проведена систематическая оценка структурных особенностей хиральных селекторов данного типа с последующей оптимизацией энантиоселективности и расшифровкой механизма молекулярного распознавания [190].

Впервые энантиоразделение дипептидов на ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками было осуществлено группой Армстронга [46]. Сообщалось об оптимальных условиях разделения энантиомеров: использование метанола в качестве органического модификатора ПФ способствовало лучшему разделению на ХНФ на основе тейкопланина по сравнению с ацетонитрилом. Позже этой же группой было осуществлено разделение энантиомеров дипептидов на ХНФ с привитым ристоцетином А в условиях обращенно-фазовой хроматографии [147]. В качестве ПФ использовали смеси водного буфера с ацетонитрилом или метанолом в соотношении 50:50.

В отношении механизма хирального распознавания дипептидов опубликовано ограниченное количество работ, касающееся преимущественно особенностей связывания Ala-Ala фрагмента с макроциклическими гликопептидами [11; 45; 147; 191]. Для ХНФ на основе данных селекторов была определена очередность элюирования энантиомеров Ala-Ala (DL<LL<DD<LD) и Leu-Leu (DL<LD<LL<DD). Лучшее энантиоразделение достигалось в случае, когда аминокислота в C-терминальном положении имела D-энантиомер [45]. Такое связывание оказалось термодинамически более предпочтительным [147]. Предположительно, это отражение природного механизма связывания макроциклических антибиотиков с D-карбокситерминальным фрагментом мукопептида бактериальной клеточной стенки. Более сильное связывание сопровождалось снижением эффективности разделения, выражающемся в замедлении кинетики адсорбционно-десорбционных процессов и замедлении массообмена. Выдвигалась гипотеза, что сильное электростатическое притяжение между ионизированными карбоксильными группами аминокислот и аминогруппами селектора, находящимися снаружи хирального «кармана», играет важную роль в образовании адсорбционного комплекса [147]. Позже на примере N-ацетилированных дипептидов было показано, что удерживание осуществляется путем вхождения аналитов внутрь хиральной полости концом, содержащим карбоксильную ионогенную группу, что поставило под сомнение главенствующую роль ионных взаимодействий [11]. С этими взглядами соглашался Каваццини с соавт. [51] и Пейрин с соавт. [192]. Вильямсом с соавт. на основе ЯМР-анализа было выдвинуто предположение о

том, что основные адсорбционные центры располагаются внутри хиральной полости и представляют собой амидные группы – доноры водородных связей, которые стабилизируют аналит за счет взаимодействия с его карбоксильной группой [36].

Каваццини было выдвинуто предположение о том, что адсорбционный механизм для *N*-ацетилированных и незамещенных аминокислот и дипептидов может отличаться [51]. В этой же работе авторы предложили ион-эксклюзионную модель энантиораспознавания на основе эффекта Доннана. Недавно было показано, что рН ПФ влияет на удерживание дипептидов на ХНФ с привитыми антибиотиками через регулирование ионного статуса аналита [98]. Авторы сообщали, что разные ионные формы характеризуются разным сродством к заряженным селекторам. В случае ХНФ с антибиотиком тейкопланином наибольшим сродством обладали катионы, за которыми следовали цвиттер-ионы и анионы. Для ХНФ с привитым ристоцетином А, изоэлектрическая точка которого сдвинута относительно тейкопланина в основную область (табл. 1.1) порядок сродства ионных форм дипептидов был противоположным.

Таким образом, накоплен обширный эмпирический материал о хроматографическом поведении дипептидов на антибиотиковых ХНФ, выполнена работа по выяснению механизма энантиораспознавания. (Следует, однако, отметить, что наиболее важные исследования группы Вильямса [33-35] выполнены с антибиотиками в растворах. Механизм связывания на привитых антибиотиках может отличаться.) В то же время, отсутствуют сведения о термодинамике адсорбции дипептидов. Слабо изучены различия адсорбции дипептидов на разных антибиотиковых ХНФ. Выполнено всего одно систематическое исследование такого рода [98], которое показывает, что механизмы удерживания на разных МА могут иметь отличия. Наименее изученным является вопрос о влиянии состава ПФ на элюирование дипептидов. Исследований такого рода, посвящённых собственно дипептидам, в доступной литературе не обнаружено. Но и авторы, рассматривающие влияние соотношения вода-органический растворитель на удерживание аминокислот (которые не являются полными аналогами дипептидов, поскольку у них отсутствует пептидная связь), ограничивались общими рассуждениями о различии формы зависимостей $k(\varphi)$ на антибиотиковых колонках и в обращённо-фазовой хроматографии [45], о типах взаимодействий, участвующих в формировании профиля удерживания [45; 160], или о корреляции между удерживанием аминокислоты и её растворимостью в водно-органических смесях [171]. Систематических объяснений влияния состава водно-органического растворителя и рН ПФ на механизм удерживания дано не было.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования в данной работе служили представители двух классов соединений: оксазолопирролохинолонов (ОПХ) и дипептидов. Исследовано 7 хиральных ОПХ (табл. 2.1) с различными заместителями как у хирального центра, так и у других атомов молекулы. Все рассмотренные ОПХ синтезированы на кафедре химии и биотехнологии ПНИПУ в виде рацематов. Их получали методом [193] и очищали двойной перекристаллизацией. Нумерация исследованных веществ в работе соответствует нумерации в нижеследующей таблице.

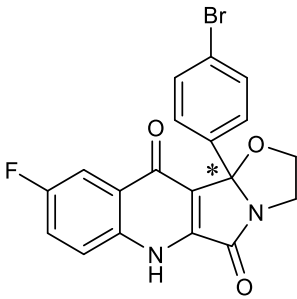
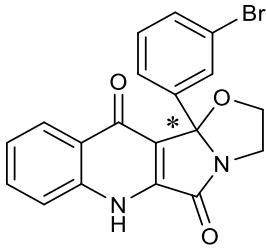
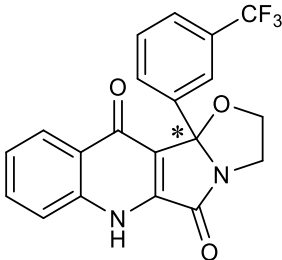
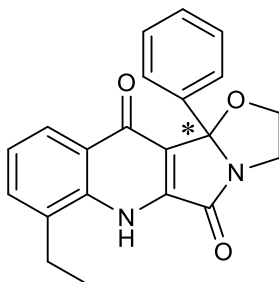
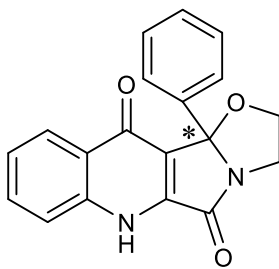
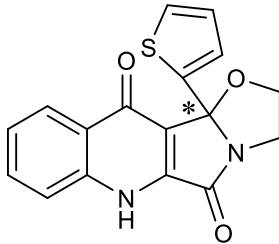
Исследованные дипептиды перечислены в табл. 2.2. Энантиомеры дипептидов были получены от разных производителей: L-Leu-L-Leu, L-Leu-Gly, Gly-L-Asp («MP Biomedicals», Франция), D-Leu-Gly, L-Leu-D-Leu, Gly-DL-Asp («Sigma-Aldrich», США), D-Leu-L-Leu, D-Leu-D-Leu, L-Ala-L-Ala, D-Ala-D-Ala, Gly-L-Ala, L-Ala-Gly, L-Leu-L-Tyr, D-Leu-L-Tyr («Bachem», Швейцария). Чистота всех дипептидов была не менее 98% (по информации производителей) и дополнительно контролировалась методом ВЭЖХ в нашей лаборатории.

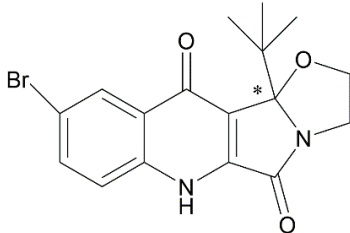
Реактивы и хроматографические колонки

В работе использовали хроматографические колонки Nautilus-R и Nautilus-E (4.6 × 250 мм) производства ЗАО «БиоХимМак СТ» (Москва), заполненные силикагелем (размер частиц 6 мкм) с привитыми антибиотиками ристоцетином А и эремомицином соответственно, и колонки Chirobiotic-R и Chirobiotic-T (4.6 × 250 мм) производства фирмы «Supelco» (США), заполненные силикагелем (размер частиц 5 мкм) с привитыми антибиотиками ристоцетин А и тейкопланин соответственно.

Для приготовления ПФ использовали деионизированную воду, очищенную на установке Millipore Synergy (Millipore, Франция), метанол «х.ч.» (Вектон, Санкт-Петербург) и ацетонитрил «х.ч.» (Криохром, Санкт-Петербург), уксусную кислоту и ацетат натрия, оба реактива марки «для ВЭЖХ» производства Sigma-Aldrich (Швейцария). Для измерения мертвого объёма колонки использовали 1,2,3-три-*трет*-бутилбензол (> 98%) от Sigma-Aldrich (США).

Строение исследованных ОПХ

Соединение	Название	Формула*
1	2	3
I	11b-(4-бромфенил)-9-фтор-2,3,6,11b-тетрагидрооксазоло-[3',2':1,5]-пирроло-[3,4-b]-хинолин-5,11-дион	
II	11b-(3-бромфенил)-2,3,6,11b-тетрагидрооксазоло-[3',2':1,5]-пирроло-[3,4-b]-хинолин-5,11-дион	
III	11b-(3-трифторметил-фенил)-2,3,6,11b-тетрагидрооксазоло-[3',2':1,5]-пирроло-[3,4-b]-хинолин-5,11-дион	
IV	(R)-7-этил-11b-фенил-2,3,6,11b-тетрагидрооксазоло-[3',2':1,5]-пирроло-[3,4-b]-хинолин-5,11-дион	
V	11b-фенил-2,3,6,11b-тетрагидрооксазоло-[3',2':1,5]-пирроло-[3,4-b]-хинолин-5,11-дион	
VI	11b-(тиофен-2-ил)-2,3,6,11b-тетрагидрооксазоло-[3',2':1,5]-пирроло-[3,4-b]-хинолин-5,11-дион	

1	2	3
VII	9-бром-11b-(трет-бутил)-2,3,6,11b-тетрагидрооксазоло-[3',2':1,5]-пирроло-[3,4-b]-хинолин-5,11-дион	

* Звёздочкой отмечен хиральный центр.

2.2. Оборудование

Работу выполняли на двух жидкостных хроматографах. Эксперименты, описанные в главах 3, частично 4 (с использованием метанола в качестве органического компонента подвижной фазы на колонках Nautilus) проведены на приборе LC-20 ADXR (Shimadzu, Япония), оснащённом двумя прецизионными насосами, дегазатором, диодно-матричным детектором, автодозатором и термостатом колонок с точностью поддержания температуры $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Запись хроматограмм и их обработку осуществляли с использованием ПО LabSolution. Эксперименты, описанные в главе 4 (с использованием ацетонитрила в качестве органического компонента подвижной фазы на колонках Nautilus, а также с использованием метанола на колонке Chirobiotic-R) выполнены на хроматографе Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Германия), оснащённом прецизионным насосом с системой смешения низкого давления, дегазатором, автодозатором, УФ-детектором и термостатом колонок ($\pm 0.1^\circ\text{C}$). Обработку хроматограмм осуществляли с помощью ПО Chromeleon 7. pH растворов определяли pH-метром («Гомельский завод измерительных приборов», Беларусь), откалиброванным по водным стандартным растворам.

2.3. Методики исследования

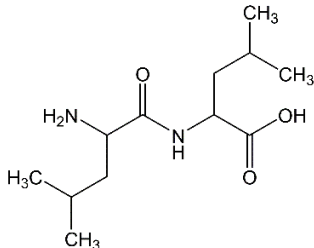
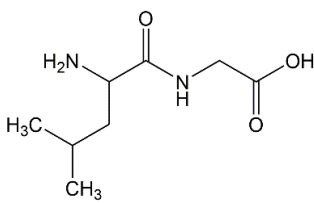
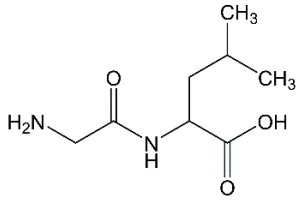
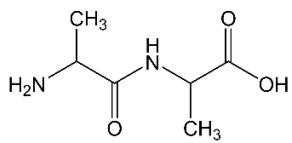
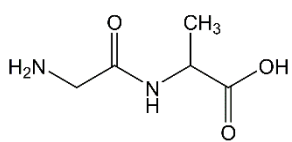
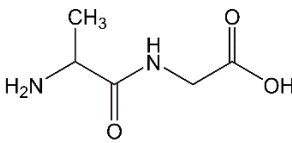
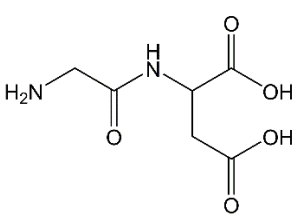
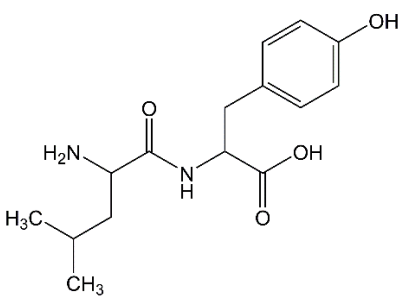
2.3.1. Определение pH водно-органических ПФ

При определении pH водно-органических подвижных фаз pH-метром со стеклянным электродом, откалиброванным по водным буферным растворам, учитывали, что измеренное (кажущееся) значение pH сдвинуто относительно термодинамического значения показателя кислотности (pH_s), на величину поправки δ , зависящей от состава растворителя [194]:

$$\text{pH}_s = -\lg(a_{\text{H}^+}) = \text{pH} - \delta \quad (2.1)$$

где a_{H^+} - активность ионов водорода в данном растворителе. Значение поправки δ для водно-органических растворов брали из работы [194].

Строение исследованных энантимеров дипептидов

Название	Формула
Leu-Leu	
Leu-Gly	
Gly-Leu	
Ala-Ala	
Gly-Ala	
Ala-Gly	
Gly-Asp	
Leu-Tyr	

2.3.2. Измерение элюционных характеристик

Эксперименты выполняли в изократическом режиме, при объемной скорости потока $F_v = 1$ мл/мин и температуре 25°C . Объем вводимой пробы был 2 мкл, концентрация исследуемых веществ не превышала 1 мг/мл. Пробы готовили растворением: ОПХ – в ацетонитриле, дипептидов – в воде для работы с водно-органическими ПФ или в метаноле для работы с чистыми органическими растворителями в качестве ПФ. В последнем случае дипептиды, которые плохо растворяются в метаноле (Gly-Leu, Gly-Phe, Ala-Ala), растворяли в 80% об. CH_3OH . Концентрацию подбирали таким образом, чтобы её двукратное увеличение не изменяло времени выхода пика вещества (t_R), что свидетельствует о проведении измерений в линейной области изотермы адсорбции. Хроматограммы ОПХ записывали на длине волны детектора 254 нм, дипептидов – 220 нм. Измерения начинали после периода кондиционирования выбранной ПФ не менее 40 мин и при условии, что последовательно измеряемые времена выхода флуктуируют в пределах ± 0.005 мин. Каждое измерение повторяли 3 раза и в дальнейших расчётах использовали среднеарифметический результат.

Фактор удерживания рассчитывали по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_{extra} - t_0}{t_0} \quad (2.2)$$

где t_{extra} , поправка на внеколоночный объем, который определяли в системе без колонки, t_0 – мёртвое время колонки. Его находили расчётным путём из мёртвого объема колонки V_0 как $t_0 = V_0/F_v$. Величину V_0 определяли по элюированию 1,3,5-три-*трет*-бутилбензола чистым метанолом [106]. Величину фактора разделения α рассчитывали по формуле (1.3).

Изучение влияния состава и pH подвижной фазы на удерживание и разделение оксазолопирролохинолонов

В качестве ПФ использовали водно-метанольные растворы с концентрацией метанола от 30 до 100 % об. и водно-ацетонитрильные растворы с концентрацией ацетонитрила от 20 до 100 % об. на колонке Nautilus-R. В экспериментах с колонкой Nautilus-E использовали водно-органические буферные смеси на основе метанола 50% об. с составом буферов (0.1 М $\text{CH}_3\text{COONa} + 5 \cdot 10^{-4}$ М CH_3COOH) и (0.1 М $\text{CH}_3\text{COONa} + 0.005$ М CH_3COOH), а также водно-органические безбуферные смеси с концентрацией ацетонитрила от 20 до 50% об.

Изучение влияния состава и рН подвижной фазы на удерживание и разделение дипептидов

В качестве ПФ использовали водно-метанольные буферные растворы с содержанием метанола от 30 до 100% об. и водно-ацетонитрильные буферные растворы с содержанием CH_3CN от 20 до 100% об. ПФ готовили из двух ацетатных буферных смесей, А (0.097 М CH_3COOH + 0.003 М CH_3COONa) и В (0.003 М CH_3COOH + 0.097 М CH_3COONa), растворённых в соответствующем водно-органическом растворителе путем смешения их в требуемых количествах для получения желаемого рН.

Изучение влияния индифферентного электролита на удерживание дипептидов

Влияние индифферентного электролита изучали на примере ХНФ Nautilus-E. Эксперименты выполняли с двумя ПФ, состоящими из подвижных фаз, состоящих из буферов А и В (см. выше), растворенных в 60 % об. метаноле с добавкой хлорида натрия с концентрацией 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 М.

2.3.3. Определение термодинамических характеристик адсорбции

ПФ для определения термодинамических характеристик адсорбции ОПХ на колонке Nautilus-R служили смеси воды и метанола с содержанием последнего 50, 90 и 100 % об. Концентрации растворителей соответствовали таковым, при которых наблюдались резкие изменения в величинах факторов удерживания оптических изомеров. В случае водно-ацетонитрильных растворов использовали 30 и 98 % об. растворы ацетонитрила. На колонке Nautilus-E в качестве ПФ использовали смеси вода-метанол (50:50) и вода-ацетонитрил (70:30).

При измерении термодинамических характеристик адсорбции дипептидов на колонках Nautilus-E и Nautilus-R в качестве ПФ использовали ацетатные буферные смеси, приготовленные в бинарных растворителях вода-метанол (40:60) и (20:80) и вода-ацетонитрил (40:60). Измерения для каждого бинарного растворителя производили при трёх значениях рН, соответствующих содержанию буфера 100% А, 100% В и соотношению А:В = 50:50.

Измерения осуществляли при температурах 20, 25, 30 и 40°C и скорости потока ПФ 1 мл/мин. Каждое измерение повторяли 2-5 раз. Значения стандартных дифференциальных молярных энтальпии ($\overline{\Delta H}_i^0$) и энтропии ($\overline{\Delta S}_i^0$) адсорбции для каждого энантиомера, обозначаемого нижним индексом i , определяли по уравнению (1.49), пользуясь линейной зависимостью $\ln k$ от $1/T$. Полученные значения энтальпии и энтропии, которые считаются независимыми от T , относят к среднегармонической температуре исследованного температурного интервала.

Погрешность определения энтальпии и энтропии адсорбции зависела от числа измерений и степени линейности графика, характеризуемого величиной коэффициента детерминации R^2 . Как правило, наблюдалось $R^2 > 0.995$, и доверительные интервалы для $\Delta \bar{H}_i^0$ варьировались в диапазоне 100-500 Дж/моль, а для $\Delta \bar{S}_i^0$ – в диапазоне 1-10 Дж/(моль·К).

2.3.4. Измерение изотерм адсорбции

Изотермы адсорбции определяли для энантиомеров ОПХ V (из CH_3OH) и VI (из 90% об. CH_3OH) при температуре 25°C. Рабочие растворы адсорбтива готовили растворением вещества (в виде рацемата) в ПФ. Концентрацию варьировали в диапазоне 0.004 – 0.04 г/л, объем проб составлял 50 мкл. Хроматограммы записывали на длине волны 254 нм. Объёмная скорость ПФ составляла 1 мл/мин. Во всём диапазоне исследованных концентраций наблюдалось полное разделение энантиомеров указанных соединений. Обработку экспериментальных данных осуществляли по методу Глюкауфа, модифицированному Ланиным и др. [195]. Данный метод основан на модели идеальной равновесной хроматографии, то есть пренебрегает кинетическими факторами размывания пиков. В рамках данной модели удельный исправленный удерживаемый ($V'_{R,V}$) объём адсорбата связан с изотермой адсорбции простым уравнением:

$$V'_{R,V}(c) = \frac{V_R(c) - V_0}{V_s} = \frac{dq}{dc} \quad \text{или} \quad dq = V'_{R,V}(c) dc \quad (2.3)$$

где величина q (моль/л) выражена на единицу объёма неподвижной фазы в колонке V_s , а c (моль/л) – на единицу объёма подвижной фазы.

В целях интегрирования уравнения (2.3) удобно представить зависимость $V'_{R,V}(c)$ в виде вириального разложения:

$$V'_{R,V}(c) = b_0 + b_1c + b_2c^2 + \dots \quad (2.4)$$

где b_i – коэффициенты вириального разложения.

После интегрирования, и принимая постоянную интегрирования равной нулю, так как $q = 0$ при $c = 0$, получаем выражение для изотермы адсорбции также в форме вириального разложения:

$$q = b_0c + \frac{b_1c^2}{2} + \frac{b_2c^3}{3} + \dots \quad (2.4)$$

Процедура метода заключается в измерении серии хроматографических пиков для постепенно увеличивающейся концентрации адсорбтива в пробе. Далее зависимость $V'_{R,V}$ от концентрации

адсорбтива в максимуме пика описывается в виде полинома с применением методов нелинейного регрессионного анализа. Обычно достаточно полинома третьей или четвёртой степени. Полученные коэффициенты b_0, b_1, b_2, \dots одновременно являются коэффициентами вириальной изотермы адсорбции (2.4).

Для перехода от сигнала детектора (h) к концентрации необходимо определить калибровочную зависимость детектора $c(h)$. Полагая эту зависимость линейной ($c = D \cdot h$, где D – коэффициент чувствительности детектора), что с хорошей точностью подтверждалось экспериментом, её находили по известной формуле: $D = m/F_v S_{пик}$, где m – масса адсорбируемого вещества в пробе, $S_{пик}$ – площадь пика.

ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМЫ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОГО УДЕРЖИВАНИЯ ОКСАЗОЛОПИРРОЛОХИНОЛОНОВ

3.1. Удерживание и разделение энантиомеров оксазолопирролохинолонов на неподвижных фазах Nautilus-E, Nautilus-R и Chirobiotic T

3.1.1. Влияние состава подвижной фазы

3.1.1.1. Колонка Nautilus-E

На колонке Nautilus-E были исследованы ОПХ IV, V, VI и VII. Данные соединения характеризуются довольно высокой гидрофобностью, оцениваемой по значению логарифма коэффициента распределения *n*-октанол/вода ($\lg K_{ow}$) (табл. 3.3). По этой причине увеличение доли органического растворителя в ПФ вело к уменьшению удерживания. Параллельно этому происходило уменьшение коэффициента разделения энантиомеров, и при содержании метанола в ПФ выше 70% об. энантиоселективность была потеряна. При содержании метанола 50% об. энантиоселективность была достаточной для расщепления рацематов ОПХ, и при этом время удерживания не было слишком большим. Поэтому при изучении влияния pH на удерживание ОПХ из водно-метанольных элюентов использовали эту концентрацию метанола. Для водно-ацетонитрильных элюентов оптимальной концентрацией органического растворителя оказалась 30% об (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Влияние концентрации ацетонитрила в подвижной фазе H₂O-CH₃CN на характеристики элюирования соединения VII

Содержание ацетонитрила, %	k_1	α
20	5.69	1.100
30	1.79	1.096
35	1.05	1.096
40	1.00	1.000
50	1.00	1.000

Энантиоселективность на колонке Nautilus-E в безбуферных ПФ в общем была невелика и обеспечивала неполное разделение пиков оптических изомеров, как показано на рис. 3.1 на примере соединения IV.

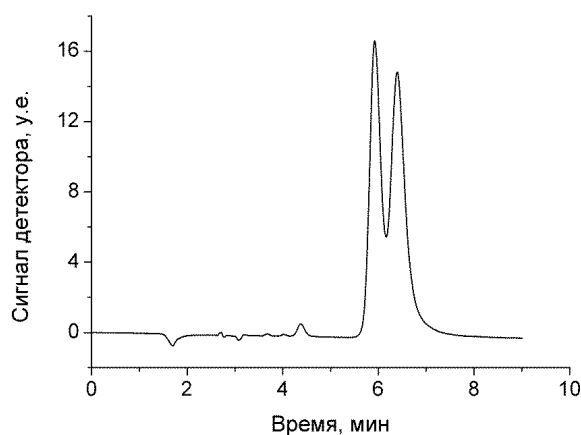


Рис. 3.1. Хроматограмма рацемического ОПХ IV. ПФ: вода-ацетонитрил (70:30).

Влияние pH ПФ на хроматографическое поведение ОПХ на исследуемой колонке проиллюстрировано в табл. 3.2. Несмотря на то, что ОПХ являются крайне слабыми электролитами (pK_a хинолоновой NH-группы обычно меньше 5 [196]), pH оказывала некоторое влияние на удерживание и разделение исследуемых веществ. В водно-метанольном элюенте при значении pH 7.8 тенденцию к разделению энантиомеров показывают все исследованные рацематы ОПХ. Незначительное подкисление элюента до pH 6.9 приводило к потере разделения энантиомеров хинолонов V и VII. Наиболее вероятным объяснением кажется влияние pH на ионное состояние и конформацию селектора. Конформационные изменения в строении хиральной полости селектора, индуцируемые ионизацией функциональных групп, хорошо изучены на примере ХНФ с привитыми производными хинина и хинуклидина [197; 198].

Таблица 3.2

Характеристики удерживания и энантиоселективности оксазолопирролохинолонов на ХНФ Nautilus-E при 25°C

Вещество	Ацет. буфер – CH ₃ OH (50:50)				Ацет. буфер – CH ₃ CN (70:30)	
	pH = 6.86		pH = 7.78		pH = 6.62	
	k_1	α	k_1	α	k_1	α
IV	0.84	1.15	0.93	1.14	0.53	1.21
V	1.10	1.00	1.07	1.10	0.65	1.14
VI	–	–	–	–	0.75	1.12
VII	0.92	1.00	0.93	1.16	0.71	1.00

3.1.1.2. Колонка Nautilus-R

На ХНФ Nautilus-R были исследованы соединения I-VII, отличающиеся природой заместителя у хирального центра, а также положением и природой боковых заместителей (табл. 2.1). Данный адсорбент в целом характеризовался более высоким удерживанием и энантиоселективностью, чем эремомициновая неподвижная фаза. Последнее обстоятельство позволяло в некоторых случаях осуществить полное разделение рацемата. Пример такой хроматограммы показан на рис. 3.2, где также указан знак вращения плоскости поляризации плоскополяризованного света каждого энантиомера, определённый по собранным фракциям пиков на поляриметре Perkin Elmer 341.

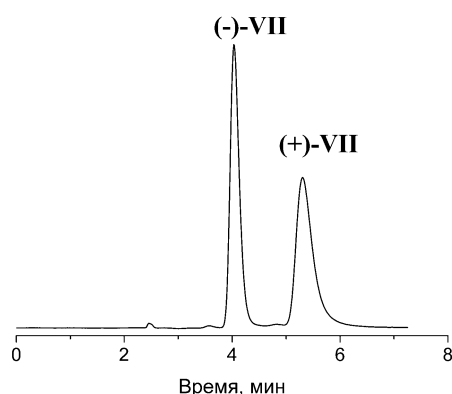


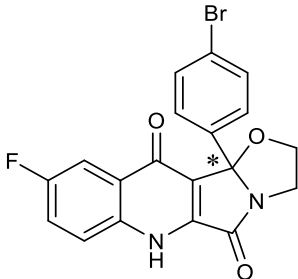
Рис. 3.2. Хроматограмма рацемата ОПХ VII. ПФ: H₂O-CH₃CN (65:35).

Подвижные фазы состава вода-ацетонитрил

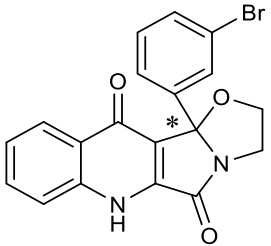
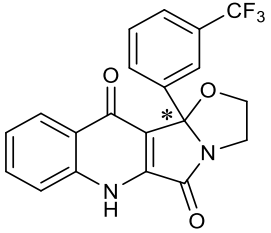
В табл. 3.3 представлены характеристики удерживания и энантиоразделения исследованных ОПХ как функции состава ПФ. Видно, что для всех соединений наблюдается U-образная зависимость фактора удерживания от содержания ацетонитрила, причём для пирролохинолонов I-IV и VII с относительно высокой общей гидрофобностью ($\lg K_{ow} = 2.2-2.3$) удерживание в чистом ацетонитриле меньше, чем в 20% об. CH₃CN. Обратная закономерность наблюдается для менее гидрофобных ($\lg K_{ow} \approx 1.3$) соединений V и VI, что, вероятно, объясняется различием в сольватации молекул с разной гидрофобностью в водной и органической подвижных фазах. В чистой воде ни один из исследованных ОПХ не растворяется и из колонки не элюируется. В общем, растворимость ОПХ в водно-ацетонитрильных смесях не велика, тем не менее в элюентах, содержащих 20-30% об. воды, они практически не удерживаются и даже характеризуются незначительными отрицательными значениями k , то есть элюируются быстрее неудерживаемого трейсера.

Таблица 3.3

Факторы удерживания и разделения энантимеров оксазолопирролохинолонов на колонках Nautilus-R и Chirobiotic T для различных составов подвижных фаз

Соединение Структурная формула* (lgK _{ow})**	Nautilus-R							Chirobiotic T		
	CH ₃ CN				CH ₃ OH			CH ₃ OH		
	<i>φ</i> , % об.	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	<i>α</i>	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	<i>α</i>	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	<i>α</i>
<i>I</i>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
I (2.32) 	20	7.71	7.71	1.00	–	–	–	–	–	–
	30	2.00	2.00	1.00	26.66	37.62	1.41	9.74	20.56	2.11
	40	0.59	0.59	1.00	11.28	17.24	1.53	4.14	8.17	1.97
	50	0.17	0.17	1.00	4.93	8.29	1.69	1.76	3.11	1.77
	60	0.00	0.00	–	2.42	4.29	1.77	0.84	1.33	1.59
	70	-0.06	-0.06	–	1.38	2.53	1.84	0.45	0.64	1.43
	75	–	–	–	1.14	2.13	1.87	–	–	–
	80	–	–	–	0.99	1.92	1.94	0.28	0.35	1.27
	90	0.16	0.16	1.00	0.79	1.63	2.06	0.21	0.21	1.00
	95	–	–	–	–	–	–	0.18	0.18	1.00
	98	1.70	1.70	1.00	–	–	–	0.17	0.17	1.00
100	5.80	5.80	1.00	0.96	2.25	2.35	0.16	0.16	1.00	

Продолжение таблицы 3.3

<i>I</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>
II (2.17) 	20	4.69	5.11	1.09	–	–	–	–	–	–
	30	1.21	1.34	1.11	–	–	–	–	–	–
	35	–	–	–	9.95	9.95	1.00	–	–	–
	40	0.43	0.43	1.00	6.28	6.28	1.00	–	–	–
	50	0.12	0.12	1.00	2.71	2.71	1.00	–	–	–
	60	–	–	–	1.37	1.37	1.00	–	–	–
	70	–	–	–	0.80	0.88	1.10	–	–	–
	80	-0.02	-0.02	–	0.58	0.69	1.20	–	–	–
	90	0.19	0.19	1.00	0.52	0.69	1.32	–	–	–
	95	0.59	0.63	1.08	–	–	–	–	–	–
	98	1.44	1.59	1.10	0.56	0.85	1.51	–	–	–
100	4.38	4.38	1.00	0.58	0.91	1.56	–	–	–	
III (2.26) 	20	2.57	2.75	1.07	–	–	–	10.73	21.32	1.99
	30	0.69	0.69	1.00	7.26	7.26	1.00	4.79	9.86	2.06
	40	0.16	0.16	1.00	3.14	3.14	1.00	2.22	4.49	2.03
	50	–	–	–	1.36	1.46	1.07	1.04	1.97	1.89
	60	–	–	–	0.70	0.79	1.13	0.55	0.95	1.74
	70	–	–	–	0.42	0.50	1.19	0.33	0.52	1.59
	75	–	–	–	0.35	0.43	1.22	–	–	–
	80	-0.09	-0.09	–	0.31	0.39	1.27	0.23	0.33	1.45
	90	0.08	0.08	1.00	0.29	0.41	1.41	0.18	0.25	1.42
	95	0.35	0.35	1.00	–	–	–	0.17	0.23	1.33
	98	0.84	0.89	1.06	–	–	–	–	–	–
100	2.28	2.28	1.00	0.30	0.52	1.72	0.21	0.21	1.00	

Продолжение таблицы 3.3

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>
IV (2.24)	20	2.70	3.37	1.25	–	–	–	17.67	45.38	2.57
	30	0.75	0.94	1.25	8.87	10.75	1.21	7.49	20.86	2.79
	40	0.22	0.29	1.31	3.82	4.65	1.22	3.40	9.49	2.80
	50	0.05	0.05	1.00	1.73	2.06	1.19	1.63	4.32	2.65
	60	–	–	–	0.92	1.05	1.14	0.87	2.10	2.41
	70	–	–	–	0.62	0.62	1.00	0.54	1.17	2.18
	75	–	–	–	0.51	0.51	1.00	–	–	–
	80	-0.06	-0.06	–	0.45	0.45	1.00	0.39	0.76	1.96
	90	0.11	0.11	1.00	0.41	0.41	1.00	0.32	0.56	1.77
	95	0.35	0.39	1.12	0.42	0.42	1.00	0.30	0.51	1.68
	98	0.80	0.91	1.14	0.42	0.49	1.17	0.29	0.48	1.64
100	2.27	2.27	1.00	0.43	0.53	1.22	0.28	0.46	1.63	
V (1.34)	20	2.64	3.14	1.19	–	–	–	13.13	26.69	2.03
	30	0.88	1.06	1.21	8.86	8.86	1.00	5.70	12.09	2.12
	40	0.34	0.42	1.24	4.36	4.36	1.00	2.73	5.61	2.05
	50	0.13	0.16	1.30	2.20	2.20	1.00	1.39	2.68	1.92
	60	–	–	–	1.24	1.24	1.00	0.79	1.39	1.77
	70	0.00	0.00	–	0.79	0.86	1.10	0.51	0.82	1.60
	75	–	–	–	0.66	0.76	1.15	–	–	–
	80	0.04	1.00	1.00	0.60	0.72	1.20	0.39	0.56	1.42
	90	0.26	1.12	1.12	0.56	0.75	1.33	0.35	0.45	1.27
	95	0.70	1.15	1.15	–	–	–	0.36	0.44	1.23
	98	1.60	1.17	1.17	–	–	–	0.37	0.44	1.20
100	4.21	1.15	1.15	0.66	1.03	1.56	0.39	0.46	1.18	

Окончание таблицы 3.3

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>
VI (1.32)	20	3.31	3.31	1.00	–	–	–	–	–	–
	30	1.12	1.12	1.00	10.11	11.74	1.16	–	–	–
	40	0.46	0.46	1.00	4.94	5.94	1.20	–	–	–
	50	0.19	0.19	1.00	2.48	3.10	1.25	–	–	–
	60	–	–	–	1.40	1.81	1.30	–	–	–
	70	–	–	–	0.92	1.22	1.34	–	–	–
	75	–	–	–	0.78	1.07	1.37	–	–	–
	80	0.07	0.07	1.00	0.71	1.00	1.40	–	–	–
	90	0.31	0.31	1.00	0.68	1.03	1.52	–	–	–
	98	1.73	1.88	1.08	–	–	–	–	–	–
100	5.32	5.32	1.00	0.83	1.41	1.70	–	–	–	
VII (2.20)	20	3.58	8.27	2.31	–	–	–	6.73	7.01	1.04
	30	1.04	2.11	2.03	8.76	28.46	3.25	2.92	3.08	1.05
	40	0.34	0.70	2.05	3.78	12.07	3.19	1.35	1.35	1.00
	50	0.08	0.24	2.99	1.72	5.24	3.05	0.68	0.68	1.00
	60	-0.04	0.05	–	0.89	2.44	2.76	0.68	0.68	1.00
	70	-0.08	-0.02	–	0.54	1.34	2.50	0.37	0.37	1.00
	75	–	–	–	0.44	1.06	2.40	–	–	–
	80	-0.05	0.00	–	0.39	0.90	2.32	0.25	0.25	1.00
	90	0.12	0.18	1.53	0.32	0.75	2.34	0.21	0.21	1.00
	95	0.41	0.52	1.26	–	–	–	0.21	0.21	1.00
98	0.99	1.15	1.16	–	–	–	0.21	0.21	1.00	
100	2.98	2.98	1.00	0.33	0.90	2.73	0.21	0.21	1.00	

* Звездочкой отмечен хиральный центр.

** Значения $\lg K_{ow}$ находили методом инкрементов, встроенным в модуль ChemBioDraw программного пакета ChemOffice 2008.

В сопоставимых условиях наибольшее удерживание демонстрируют соединения I и II с объемным бромфенильным радикалом у хирального атома углерода. В то же время, соединение III также с объемным *m*-трифторметилфенильным радикалом у хирального центра характеризуется наименьшим удерживанием. При этом общая гидрофобность всех трех молекул примерно одинаковая (табл. 3.3). Можно предположить, что в отличие от меньшего по размеру атома Br разветвлённая CF₃ группа препятствует оптимальному, необходимому для прочного связывания, расположению молекулы аналита относительно привитого селектора.

Отчетливо прослеживается влияние заместителя у хирального центра на селективность разделения энантиомеров, характеризуемую коэффициентом разделения α . Лучше всего расщепляются на исследуемой ХНФ рацематы ОПХ с относительно небольшим трет-бутильным заместителем VII. Среди ОПХ, имеющих ароматический заместитель у хирального центра, наилучшим разделением характеризовались соединения с фенильным (IV и V) заместителем. Меньшую энантиоселективность демонстрируют ОПХ с более крупным фенильным радикалом, модифицированным в *мета*-положении (II и III). Природа модифицирующей группы (Br или CF₃) не сильно влияет на энантиоселективность, но влияет на удерживание. Положение модифицирующей группы, наоборот, оказывает некоторое влияние на энантиоразделение. Так, энантиомеры I с *n*-бромфенильным заместителем у асимметрического центра не разделяются ни при каких условиях. Вероятно, боковая группа в *пара*-положении не приводит к стерическим затруднениям при вращении заместителя вокруг связи, соединяющей его с хиральным атомом углерода, когда молекула аналита взаимодействует с хиральным селектором. В то же время, при вращении *m*-бромфенильного радикала такие затруднения могут возникать. Стерические осложнения часто оказываются благоприятными для энантиоразделения, хотя и приводят к образованию менее прочных адсорбционных комплексов.

Замена фенильного радикала тиенильным приводит к ухудшению энантиоселективности – соответствующий тиенилзамещенный пирролохинолон VI демонстрирует слабую способность к разделению энантиомеров только с ПФ, содержащей 98% об. CH₃CN. Мы связываем это с (а) меньшим размером тиенильного радикала и (б) лучшей способностью этого радикала по сравнению с фенильной группой к π -взаимодействию (сольватохромный параметр π -взаимодействия тиофена превышает таковой бензола [199]). Действительно, тиенилпроизводное VI прочнее удерживается в колонке, чем его фенилзамещенный аналог V. Возможно, оба оптических изомера тиенил- и фенилпроизводных пирролохинолона участвуют в π -донорно-акцепторном взаимодействии между данным заместителем и одной из групп ристоцетина А. При этом формирование более прочной связи и отсутствие стерических

ограничений вследствие меньшего размера тиенильного радикала стабилизируют такую структуру комплекса «гость-хозяин» для VI, прочность которой оказывается менее чувствительной к стереоконфигурации «гостя». Отметим, что в исследованных системах более прочное удерживание в целом ассоциируется с меньшими значениями α .

Приведенные выше рассуждения основаны на гипотезе, что исследуемые соединения входят в хиральную полость привитого селектора оксазольным фрагментом, содержащим асимметричный атом углерода. Указанная полость образована четырьмя макроциклическими кольцами, составляющими агликоновый скелет ристоцетина А (рис. 3.3). Ее отверстие имеет сложную изогнутую форму с минимальным диаметром 5.2 Å [149].

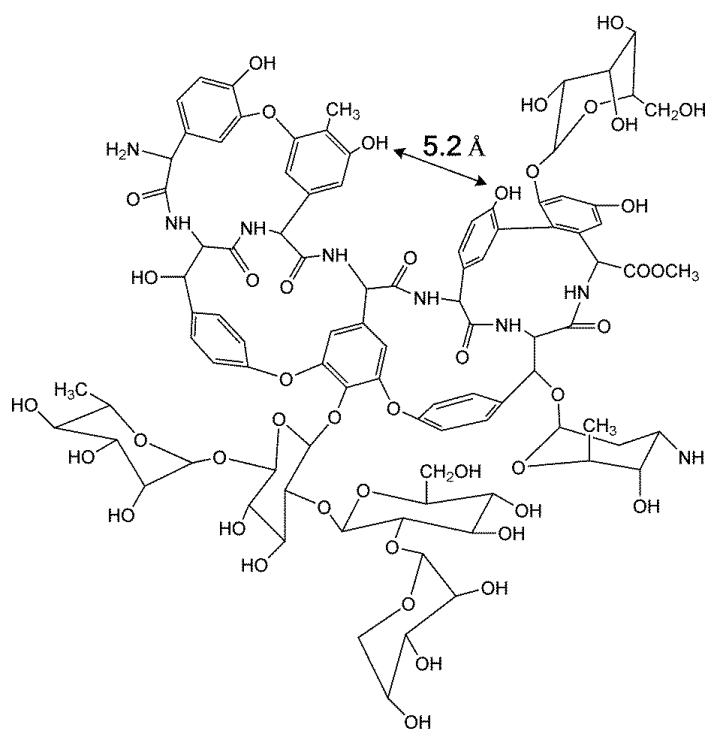


Рис. 3.3. Хиральный селектор ристоцетин А. Двусторонней стрелкой показано минимальное расстояние между функциональными группами на противоположных стенках хиральной полости.

Включение ОПХ внутрь этой полости через хинолоновый конец маловероятно по стерическим соображениям, так как ширина этого фрагмента составляет 5.2 Å (рис. 3.4) и принимает еще большие значения при наличии боковых заместителей как в IV. В то же время, ширина оксазольного фрагмента в наибольшем сечении составляет ~ 3.1 Å; хинолоновая группа и арильный заместитель отклоняются от него на угол 110-120°, позволяя этому фрагменту входить в полость агликоновой части селектора. Арильный заместитель играет при этом модулирующую роль за счёт взаимодействия с периферийными группами макроцикла. Косвенно это подтверждается сравнением аналитов IV и V.

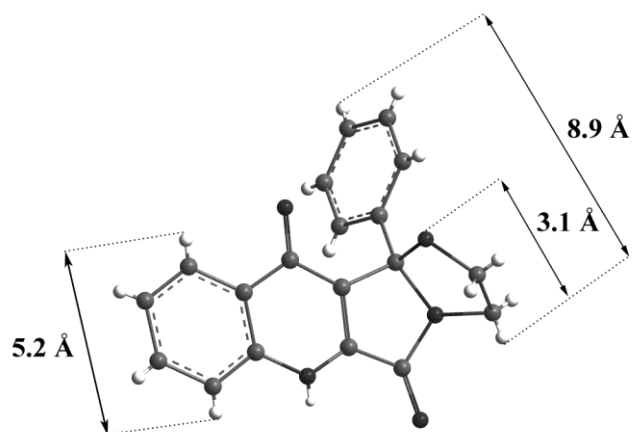


Рис. 3.4. Структура оксазолопирролохинолонов на примере соединения V.

Несмотря на наличие боковой этильной группы в положении C-7 у IV, не наблюдается существенного различия в разделении энантиомеров данных соединений, что указывает на отсутствие взаимодействия хинолонового фрагмента с центром хирального распознавания.

Наличие U-образной зависимости фактора удерживания от содержания органического растворителя свидетельствует о действии разнонаправленных факторов, являющихся функциями состава ПФ. Указанная зависимость представлена на рис. 3.5 в координатах $\lg k - \varphi$ (за исключением точек с отрицательным значением k). Как видно, $\lg k$ линейно уменьшается в диапазоне φ от 20 до 50% об., то есть до концентрации ацетонитрила, при которой наблюдается потеря удерживания. Считается, что такое поведение характерно для обращенно-фазового режима хроматографии [200] и свидетельствует об увеличении элюирующей силы бинарного растворителя за счет улучшения его сольватирующей способности по отношению к аналиту. Действительно, гидрофобные ОПХ должны хуже сольватироваться водой и лучше органическим растворителем. На практике наблюдалось улучшение растворяющей способности смесей $\text{H}_2\text{O}-\text{MeCN}$ в отношении исследуемых веществ с ростом доли ацетонитрила. Армстронг с соавт. объясняли уменьшение удерживания гидрофобных соединений на антибиотиковых адсорбентах с ростом доли органического компонента ПФ ослаблением гидрофобных взаимодействий [46; 79]. Этот эффект (если присутствует) будет действовать в том же направлении, что и эффект сольватации, но его вклад в падение k не будет преобладающим. Только ослаблением гидрофобных взаимодействий нельзя объяснить падение фактора удерживания до нуля, наблюдавшееся в наших системах. Для этого должен действовать более мощный фактор, каковым является повышение сольватирующей способности элюента.

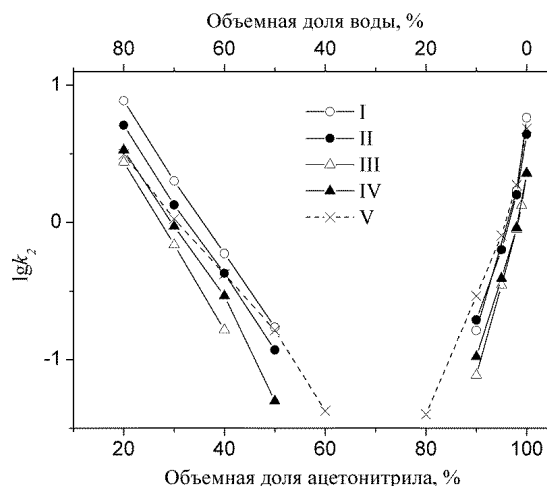


Рис. 3.5. Зависимость логарифма фактора удерживания второго элюируемого энантиомера от состава ПФ. На нижней шкале показана концентрация ацетонитрила, на верхней шкале – концентрация воды. Данные для соединения VI не отличались в масштабе графика от данных для соединения V, поэтому не показаны на рисунке.

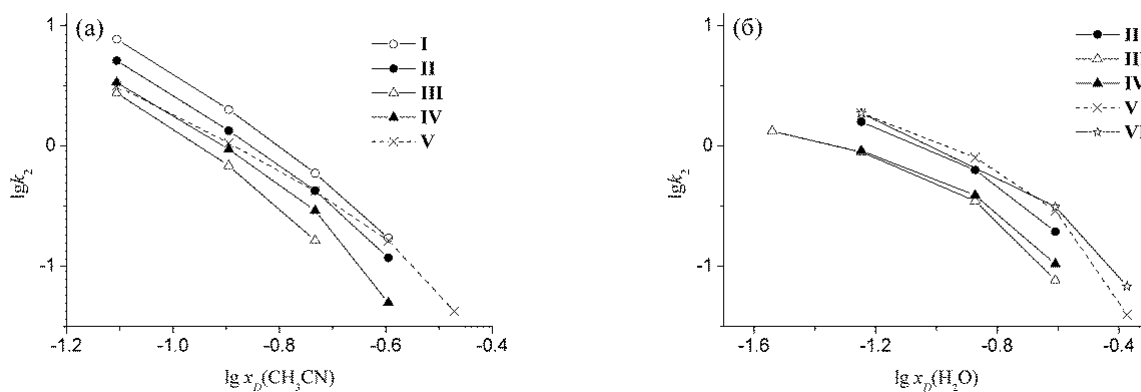


Рис. 3.6. Зависимость фактора удерживания второго элюируемого энантиомера от состава ПФ для убывающей ветви зависимости $k(\varphi)$ как функция мольной доли ацетонитрила (а) и для возрастающей ветви зависимости $k(\varphi)$ как функция мольной доли воды (б) в координатах модели Снайдера-Сочевинского. На вкладке (а) не показаны данные для соединения VI (совпадают в масштабах графика с данными для V), на вкладке (б) не показаны данные для соединения I (совпадают в масштабах графика с данными для II).

На рис. 3.6 данные представлены в координатах модели Снайдера-Сочевинского (уравнение (1.7)). В указанной модели $\lg k$ должен линейно зависеть от $\lg X_D$, где X_D – мольная доля десорбента. Логично в качестве такового на убывающей ветви (рис. 3.6а) принять ацетонитрил, а на возрастающей ветви (рис. 3.6б) – воду, потому что в этой области составов

ПФ увеличение содержания воды приводит к уменьшению удерживания. В модели Снайдера-Сочевинского элюирующая сила ПФ зависит от адсорбционного сродства к неподвижной фазе, определяющего ее способность вытеснять молекулы аналита с поверхности адсорбента [62]. Очевидно, что механизм удерживания в хиральной хроматографии адсорбционный, поскольку для энантиоразделения требуется непосредственный контакт разделяемых энантиомеров и хирального селектора. Однако сольватирующая способность растворителя влияет на его элюирующую силу. Особенно учитывая отмеченную выше связь между составом ПФ и растворимостью в ней исследуемых аналитов. Возможно, это обстоятельство и объясняет худшую линейность графиков на рис. 3.6а по сравнению с рис. 3.5 (коэффициенты корреляции в последнем случае были выше, чем для графиков на рисунке 3.6а для всех рассмотренных соединений).

В области высокой концентрации ацетонитрила (низкой концентрации воды, меньше 20% об.) элюирующая сила ПФ увеличивается с ростом содержания воды, то есть изменяется обратно увеличению сольватирующей способности ПФ. Как видно на рисунке 3.5, линейная связь между $\lg k$ и φ , а также между $\lg k$ и $(100 - \varphi)$ (объемной долей воды) в этом диапазоне отсутствует. Сочетание этих фактов показывает, что изменение сольватирующей способности ПФ более не определяет изменение ее элюирующей силы. Более значимыми оказываются факторы, влияющие на адсорбционное взаимодействие. Во-первых, вода выступает в качестве сильного десорбента, конкурируя с молекулами аналита за взаимодействие с протонодонорными/акцепторными группами привитого селектора. Влияние этого фактора примерно постоянно, пока содержание воды в ПФ, а, следовательно, и в адсорбционном слое, велико, но становится зависимым от концентрации воды при её существенном уменьшении.

Измерения изотерм адсорбции воды из смеси $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ на ХНФ с привитыми антибиотиками показывают, что содержание воды в адсорбционном слое практически не меняется в интервале ее концентраций от 60 до 20%, но начинает резко уменьшаться при дальнейшем падении доли воды в растворе [162; 201]. Именно в этом диапазоне низких концентраций воды наблюдается увеличение k с уменьшением $(100 - \varphi)$. Во-вторых, на поверхности привитых ХНФ может существовать небольшая фракция особо активных центров. Молекулы воды, прочно связываясь с такими центрами, предотвращают их сильное взаимодействие с молекулами аналита. Удаление воды из ПФ освобождает эти центры для образования прочного адсорбционного комплекса. На это указывает резкий рост k при уменьшении доли воды в ПФ от 2 до 0% об.. Отметим, что адсорбция на таких центрах сильного связывания приводит к потере энантиоселективности по отношению ко всем изученным соединениям, кроме V.

Несмотря на то, что механизм удерживания должен быть адсорбционным, результаты, представленные в координатах уравнения Снайдера-Сочевинского, демонстрируют явную нелинейность в области низкого содержания воды (рис. 3.6б). Очевидно, допущения указанной модели не выполняются. Во-первых, распределение адсорбционных центров по энергии адсорбции не является равномерным и изменяется с изменением концентрации воды в ПФ. Кроме того, вода не является единственным десорбентом. Такую же роль выполняют, только в меньшей степени, молекулы ацетонитрила.

Подвижные фазы состава вода-метанол

Хроматографические характеристики удерживания и разделения ОПХ как функции концентрации метанола в ПФ на ХНФ с привитым ристоцетином А представлены в табл. 3.3. В общем удерживание исследуемых соединений в водно-метанольных ПФ характеризуется более высокими значениями k , по сравнению с водно-ацетонитрильными элюентами. Для всех веществ наблюдается убывающая зависимость k от содержания метанола с относительно небольшим увеличением удерживания в ПФ, содержащих менее 10% об. воды. В водно-метанольных средах наибольшим удерживанием в сопоставимых условиях характеризуется соединение I с *para*-бромфенильным заместителем у хирального центра. Близкие по значению факторы удерживания показывают соединения II и VI с *m*-бромфенильным и тиенильным заместителями соответственно. Наименьшее удерживание наблюдается для энантиомеров соединения III с наиболее объемным *m*-трифторметилфенильным радикалом у хирального центра. Возможно, большая по размеру CF_3 -группа препятствует оптимальному расположению молекулы внутри хиральной полости. Подобное влияние заместителей на удерживание ОПХ наблюдали и для систем вода-ацетонитрил. Вероятно, размер бромфенильного заместителя оптимален для образования прочных адсорбционных комплексов обоих энантиомеров I и II с хиральным селектором. При этом соединения с заместителями меньшего размера удерживаются слабее.

Природа органического растворителя оказывала влияние на энантиоселективность. Лучше всего разделялись энантиомеры ОПХ I с *n*-бромфенильным заместителем (ПФ: 100% об. CH_3OH , $\alpha = 2.35$) которые не разделялись ни при каких условиях в ПФ с ацетонитрилом. При этом рацематы соединений с фенильным заместителем (IV и V) при элюировании метанолом показали наихудшее разделение, наравне с соединением II с *m*-бромфенильным радикалом. Наоборот, при элюировании ацетонитрилом эти анализы характеризовались более высокими значениями α . Замена фенильного радикала тиенильным приводит к улучшению энантиоселективности, что противоположно результатам, полученным с CH_3CN . Наилучшее

энантиоразделение с метанольными ПФ демонстрировал ОПХ VII с коротким, но разветвлённым *трет*-бутильным заместителем у хирального центра. Энантиоселективность ХНФ по отношению к этому соединению оказалась выше, чем по отношению к ОПХ с крупными арильными радикалами. По-видимому, размер заместителя у VII способствуют более оптимальному размещению его сильнее удерживаемого энантиомера внутри хиральной полости селектора.

При использовании CH_3OH в качестве органического модификатора энантиоселективность в целом была выше и наблюдалась в большем диапазоне концентраций растворителя, по сравнению с ацетонитрильной ПФ. Такое же поведение наблюдалось в работе Екбор-Отт и др., в которой разделение рацематов дипептидов было выше для водно-метанольных смесей [147]. Возможно, такое различие в энантиодискриминации связано с различной величиной энергии десорбции, которая выделяется при вытеснении молекул растворителя с поверхности ХНФ молекулами энантиомеров. Также это может быть связано с особенностями взаимодействия ПФ с хиральным селектором или особенностями сольватации растворителем адсорбционного комплекса. Это не может объясняться сольватацией аналита в ПФ, так как сольватация – ахиральный процесс, и он не влияет на величину α .

Зависимость k от концентрации ацетонитрила в ПФ имела U-образную форму. В водно-метанольном элюенте ярко выраженная возрастающая ветвь зависимости при высоком содержании органического компонента ($\varphi > 90\%$ об.) исчезла (рис. 3.7). Увеличение концентрации метанола свыше 90% об. приводило лишь к небольшому подъёму ветви зависимости $k(\varphi)$. Похожее поведение демонстрировали энантиомеры липофильного Leu-Leu при элюировании водно-метанольными растворителями на колонке Chirobiotic R [50].

Как видно из рис. 3.7, зависимость k от φ метанола убывает с увеличением концентрации последнего. ПФ с апротонным ацетонитрилом обеспечивают лучшую сольватацию молекул ОПХ, чем водно-метанольные смеси при сопоставимых составах ПФ, до $\varphi < 80\%$. Дальнейший рост доли органического растворителя не приводит к существенному увеличению сольватирующей способности смеси, и другой фактор начинает играть важную роль – десорбирующая активность воды. Молекулы воды, адсорбируясь на полярных участках неподвижной фазы, экранируют их от взаимодействия с аналитом. Поскольку антибиотиковые ХНФ преимущественно адсорбируют воду из бинарных водно-органических смесей [202], небольшого содержания воды в элюенте (~ 20% об.) достаточно для насыщения активных центров неподвижной фазы. По мере роста φ содержание воды уменьшается, как и ее экранирующее действие, что приводит к росту фактора удерживания. Очевидно, этот эффект будет менее выражен для метанола, потому что, являясь протонным соединением, он сам может

экранировать активные центры образования водородной связи. Резкий рост k для смесей H_2O - CH_3CN при переходе от ПФ, содержащей 2% об. воды, к чистому ацетонитрилу указывает на существование небольшой группы очень активных брэнстедовских центров, которые освобождаются при удалении последней порции воды из ПФ.

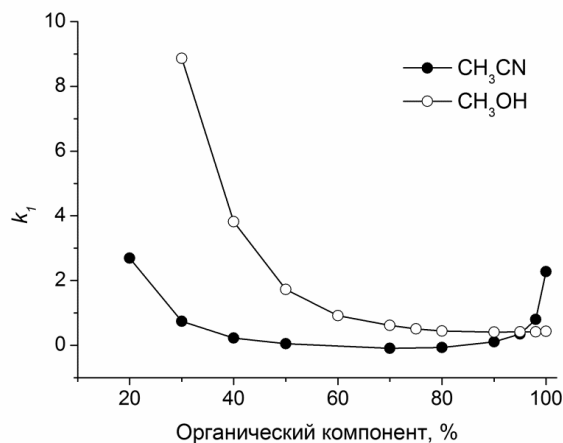


Рис. 3.7. Влияние природы органического растворителя на удерживание соединения IV для первого элюируемого энантиомера на колонке Nautilus-R. $T=25^\circ\text{C}$.

Как отмечалось в разделе 1.2, классические модели удерживания не могут описать немонотонные зависимости фактора удерживания от состава ПФ, поскольку учитывают только один, доминирующий, влияющий фактор. Модель Тсуи (уравнение (1.11)) учитывает влияние факторов сольватации аналита в ПФ и конкурентной адсорбции аналита и активного компонента ПФ (предполагается, что такой компонент один). Как отмечалось выше, именно такая комбинация влияющих эффектов определяет вид зависимостей фактора удерживания от состава ПФ. Результат аппроксимации экспериментальных данных для водно-метанольной системы моделью Тсуи показаны на рис. 3.8. Видно, что модель хорошо описывает убывающую ветвь графика. Однако при переходе от низкой концентрации воды к чистому метанолу модельный график продолжает убывать, в то время как экспериментально полученный фактор удерживания растет, хотя и незначительно.

Дифференцирование уравнения модели показывает, что генерируемая ей функция $k(C)$ не имеет экстремумов, следовательно, не может описать увеличение удерживания в маловодных ПФ. Очевидно, это следствие того, что модель допускает участие в процессе адсорбции только одного компонента растворителя, тогда как в общем случае оба компонента могут участвовать в процессах как в жидкой фазе, так и на поверхности адсорбента, причём

согласно предложенному качественному объяснению один компонент ПФ является доминирующим на нисходящей ветви зависимости $k(C)$, а второй – на её восходящей ветви.

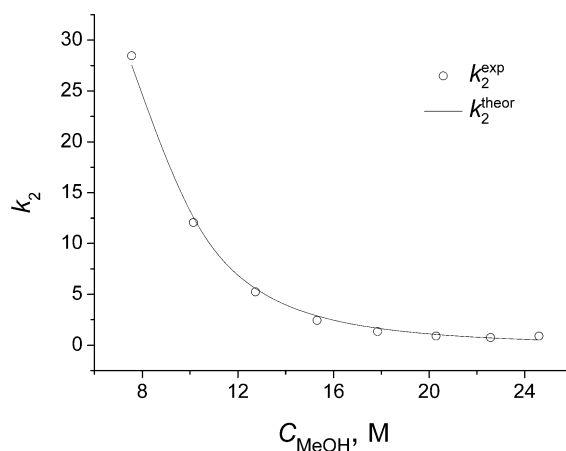


Рис. 3.8. Влияние концентрации метанола на удерживание ОПХ VII на колонке Nautilus-R при $T = 25^\circ\text{C}$ для второго элюируемого энантиомера. Точки описывают экспериментальные данные, линии – аппроксимация уравнением (1.11).

Мы расширили модель Тсуи на случай участия обоих компонентов бинарной ПФ – в данной работе воды и метанола – в сольватации (1) и в конкурентной адсорбции (2):



В уравнениях (3.1) и (3.2) A обозначает аналит, S – хиральный селектор неподвижной фазы, u и v – количество молекул воды (W) и метанола (M), участвующих в сольватации аналита в ПФ, а x и y – количество молекул воды и метанола, вытесняемых аналитом с адсорбционного центра.

Путем несложных математических преобразований, аналогичных описанным в работе [66], из системы уравнений (3.1) и (3.2), дополненных определением k как отношения количеств аналита в неподвижной и подвижной фазах, можно получить следующее выражение:

$$k = \frac{q_s \phi K_A}{C_W^x C_M^y (1 + K_S C_W^u C_M^v)} \quad (3.3)$$

где C_W и C_M – молярная концентрация воды и метанола в ПФ, K_S и K_A – константы равновесия сольватации и конкурентной адсорбции соответственно, ϕ отношение объемов неподвижной и подвижной фаз в колонке и q_s – концентрация хиральных селекторов на поверхности неподвижной фазы.

Представленная расширенная модель Тсуи, основанная на сочетании процессов вытеснительной адсорбции и сольватации в жидкой фазе, хотя и является упрощенным отражением реального процесса удерживания, хорошо описывает экспериментальные данные (табл. 3.4). Типичный пример аппроксимации экспериментальных данных модельной кривой показан на рис. 3.9. Параметры модели, относящиеся к процессу в ПФ (K_S , u и v), для энантиомеров одинаковы, так как процесс сольватации ахирален. Поэтому регрессионные вычисления выполнялись для зависимостей $k(C_M)$ для обоих энантиомеров одновременно, что позволило увеличить число степеней свободы и тем самым устойчивость решения. Произведение $q_s \phi K_A$ в рамках регрессионной процедуры выступает как один подгоночный параметр. Поскольку форма уравнения не позволяет выполнять расчеты с чистым метанолом, когда $C_W = 0$ моль/л, аппроксимация выполнена до предпоследней экспериментальной точки. В предварительных расчетах было установлено, что параметр u , относящийся к воде, не превышал значения 0.16 для всех исследованных ОПХ и почти не сказывался на точности подгонки. Поэтому его в дальнейших вычислениях приняли равным нулю для сокращения числа подгоночных параметров. С физической точки зрения это указывает на то, что вода плохо сольватирует молекулы ОПХ, что подтверждается тем фактом, что вода не растворяет исследованные соединения.

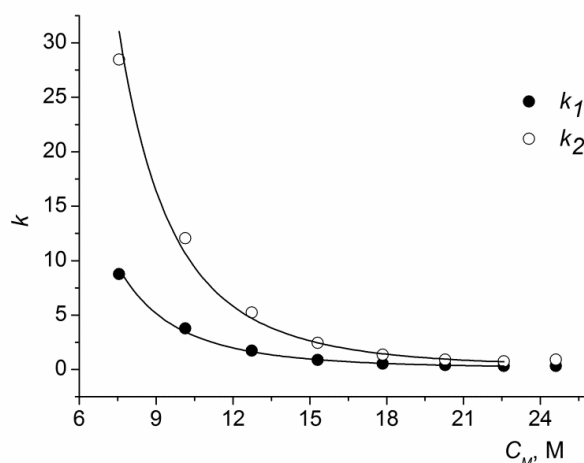


Рис. 3.9. Зависимость фактора удерживания энантиомеров соединения VII на колонке Nautilus-R от концентрации метанола в ПФ. $T = 25^\circ\text{C}$. Точки – экспериментальные данные, линии – результат аппроксимации уравнением (3.3).

Значения подгоночных параметров расширенной модели Тсуи приведены в табл. 3.4. Кажущееся число молекул метанола, вступающих в сильное сольватационное взаимодействие с аналитом в ПФ близко к 2 для всех соединений, кроме V (1.7) и VI (1.6), которые характеризуются относительно низкой липофильностью (см. значения $\lg K_{ow}$ в табл. 3.3).

Согласно модели молекулы ОПХ вытесняют с поверхности от одной до двух молекул метанола и значительно менее одной молекулы воды. Очевидно, это условные цифры, которые, по-видимому, указывают на то, что при адсорбции ОПХ молекулы воды не удаляются, а остаются связанными с хиральным селектором. Сравнение значений подгоночных параметров для энантиомеров ожидаемо показывает, что энантиоселективность обеспечивается не столько различием в значениях стехиометрических коэффициентов уравнения (3), сколько различием в значениях констант адсорбционного равновесия.

Таблица 3.4

Подгоночные параметры расширенной модели Тсуи и др.

Вещество*	$q_s \phi K_A \cdot 10^{-8}$ **	$K_S \cdot 10^{-3}$ ***	x	y	ν	R^2
I ₁	2.66	3.32	0.17	1.68	1.93	0.9905
I ₂	2.30	3.32	0.20	1.39	1.93	0.9899
II ₁	0.58	0.42	0.29	1.62	2.25	0.9998
II ₂	0.82	0.42	0.41	1.59	2.25	0.9984
III ₁	2.70	5.91	0.34	1.55	2.11	0.9896
III ₂	4.23	5.91	0.50	1.49	2.11	0.9926
IV ₁	1.44	7.85	0.24	1.48	1.85	0.9980
IV ₂	4.10	7.85	0.30	1.77	1.85	0.9903
V ₁	1.08	8.69	0.26	1.33	1.75	0.9905
V ₂	3.00	8.69	0.39	1.63	1.75	0.9965
VI ₁	1.51	8.34	0.31	1.47	1.64	0.9914
VI ₂	2.10	8.34	0.40	1.39	1.64	0.9909
VII ₁	8.20	3.93	0.20	1.51	1.94	0.9933
VII ₂	3.60	3.93	0.14	1.76	1.94	0.9856

* Нижний индекс указывает на порядок выхода энантиомера соответствующего вещества;

** Размерность q_s – моль/л(ТВ),

размерность постоянной K_A – (моль^(x+y-1)(л(ТВ)/л^(x+y)));

*** Размерность постоянной K_S – ((л/моль)^(v+u)).

Таким образом, механизм удерживания ОПХ на ХНФ Nautilus-R из водно-метанольных смесей объясняется сочетанием процессов сольватации аналита в ПФ и конкурентной адсорбцией на поверхности неподвижной фазы, причём сольватирующая способность элюента определяется содержанием метанола. Десорбирующая активность воды, играющая важную роль в элюировании ОПХ из водно-ацетонитрильных смесей в области высоких содержаний органического компонента (более 80% об.) [203], в данном случае не оказывает существенного

влияния, поскольку метанол, в отличие от ацетонитрила, сам эффективно экранирует брэнстедовские активные центры. Этим объясняется различие в форме кривых $k(\varphi)$ ОПХ для ПФ с метанолом и ацетонитрилом. Природа органического соразтворителя также влияет на энантиоселективность Nautilus-R по отношению к изученным ОПХ. Другим важным фактором энантиораспознавания является природа заместителя у хирального центра: разветвлённый *трет*-бутильный радикал обуславливает более высокие значения α , чем арильные заместители.

3.1.1.3. Колонка Chirobiotic-T

На колонке Chirobiotic-T было изучено удерживание ОПХ I, III, IV, V, VII при элюировании смесями воды с метанолом. Было обнаружено, что для получения воспроизводимых данных на указанной колонке в ПФ должны модифицироваться небольшим количеством электролита. Так как Chirobiotic T является слабым ионообменником, добавление электролита способствует установлению равновесия в колонке.

В данном исследовании колонка использовалась после длительной работы с буферными смесями. Вероятно, большая часть ионогенных центров селектора была в ионизированном состоянии. Обычного времени кондиционирования (40-60 минут) безбуферными водно-метанольными смесями оказалось недостаточно для того, чтобы «нейтрализовать» заряды неподвижной фазы. Поэтому данные по удерживанию, полученные на начальном этапе использования безбуферных ПФ $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$ отличались по величине от тех, что были получены в конце эксперимента. Однако характер зависимостей удерживания от концентрации метанола оставался прежним. Так, например, для соединения III наблюдалось уменьшение удерживания после длительного использования водно-метанольных ПФ, хотя форма кривой удерживания не изменялась (рис. 3.10).

Общие закономерности удерживания ОПХ при элюировании водно-метанольными смесями на ХНФ с привитым тейкопланином и ристоцетином А были близки (табл. 3.3). Однако удерживание на Nautilus-R было слабее, чем на Chirobiotic T для всех веществ, кроме VII. Форма зависимостей фактора удерживания от доли метанола в ПФ на тейкопланиновой колонке имела монотонно убывающую форму для всех соединений, кроме соединения V, для которого наблюдалось слабое возрастание k в чистом метаноле. На ристоцетиновой колонке такое поведение было характерно для всех ОПХ, что может быть связано с различиями в структуре селекторов, а также в упомянутом выше факте влияния добавки электролита на ионное состояние селектора.

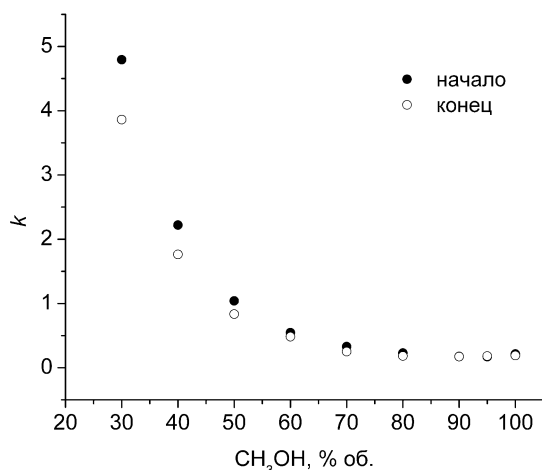


Рис. 3.10. Зависимость удерживания первого элюируемого энантиомера соединения III от концентрации метанола в ПФ на колонке Chirobiotic T в начале эксперимента (темные круги) и в конце после промывания водно-метанольными ПФ (светлые круги).

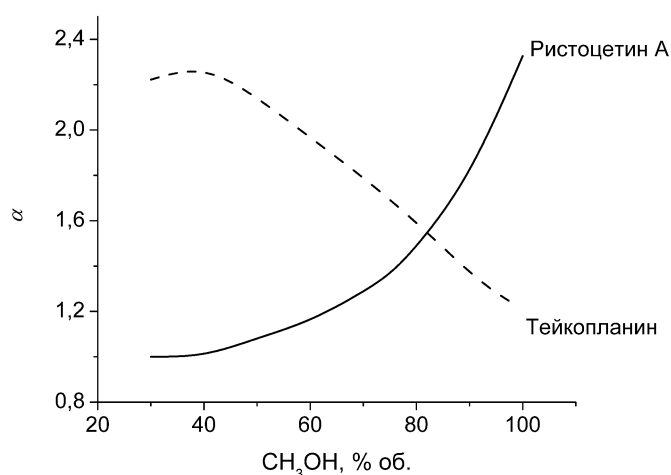


Рис. 3.11. Влияние концентрации метанола в ПФ на энантиоселективность ХНФ по отношению к энантиомерам соединения III на колонках с привитыми антибиотиками ристоцетином А (сплошная линия) и тейкопланином (штриховая линия).

Основное различие двух селекторов проявлялось во влиянии концентрации метанола в ПФ на энантиоселективность. На рис. 3.11 в качестве примера показано влияние концентрации метанола на фактор разделения энантиомеров соединения III для обеих ХНФ. Такое поведение наблюдалось для всех исследованных веществ. Энантиоселективность возрастала с увеличением доли метанола на Nautilus-R, тогда как на Chirobiotic T фактор разделения убывал. Подобное поведение тейкопланиновой ХНФ по отношению к гидрофобному веществу 5-метил-

5-фенилгидантоину наблюдалось в работе [46]. Заметим, что разделению энантиомеров гидрофобных веществ на тейкопланине способствуют условия, обеспечивающие реализацию гидрофобных взаимодействий (низкие концентрации метанола в ПФ), а разделению на ристоцетине А – условия, в которых гидрофобные взаимодействия не возможны (высокие концентрации метанола). Это подтверждает, обсуждавшуюся в разделе 1.3.1.3 важность гидрофобных взаимодействий для разделения именно на тейкопланиновом селекторе.

3.2. Термодинамика адсорбции оксазолопирролохинолонов на неподвижных фазах Nautilus-E и Nautilus-R

3.2.1. Колонка Nautilus-E

Термодинамика адсорбции энантиомеров ОПХ была изучена в ПФ с добавлением буферной смеси. Данные для первого элюируемого энантиомера приведены в табл. 3.5 и относятся к составам ПФ с содержанием органического растворителя оптимальным для разделения энантиомеров (50% об. для CH_3OH и 30% об. для CH_3CN). Как видно, исследованные системы характеризуются умеренным тепловым эффектом (10-30 кДж/моль), что типично для жидко-твердофазной адсорбции без химического взаимодействия. Природа органического компонента существенно влияет на термодинамические характеристики адсорбции – в водно-ацетонитрильном элюенте абсолютные величины энтальпии и энтропии адсорбции примерно в 2 раза ниже таковых в водно-метанольной смеси при сопоставимой величине рН. Очевидно, это связано с особенностями сольватации участников адсорбционного взаимодействия в системах $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$ и $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$. Природа заместителя у хирального центра, так же, как и наличие боковых заместителей у пирролохинолонового скелета, наоборот, не оказывают большого влияния на термодинамику адсорбции.

Поскольку знаки изменений энтальпии и энтропии исследуемых веществ при адсорбции одинаковы, происходит компенсация энтальпийного эффекта энтропийным согласно уравнению Гиббса-Гельмгольца. Нивелирующее влияние энтропийного фактора было сильным и составляло не менее 85% теплового эффекта при 25°C, что обуславливало слабое удерживание ОПХ на данной ХНФ – фактор удерживания при указанной температуре не превышал 1.1 во всех изученных случаях. Между абсолютными значениями $\overline{\Delta H}_i^0$ и $\overline{\Delta S}_i^0$ в табл. 3.7 наблюдается корреляция – более высоким значениям $\overline{\Delta H}_i^0$ соответствуют более высокие значения $\overline{\Delta S}_i^0$. Можно сделать вывод, что адсорбция с большим тепловым эффектом характеризуется более сильной реструктуризацией системы при переходе молекул ОПХ из жидкой фазы в адсорбированное состояние.

Энтальпия и энтропия адсорбции первого элюируемого энантиомера и разностные термодинамические характеристики адсорбции оксазолопирролохинолонов на ХНФ Nautilus-E (Дж/моль)

Вещество	$\Delta\bar{H}_1^0$	$T\Delta\bar{S}_1^{0*}$	$\Delta\bar{G}_1^0$	$\Delta\Delta\bar{H}^0$	$T\Delta\Delta\bar{S}^{0*}$	$\Delta\Delta\bar{G}^0$
Ацетатный буфер – CH ₃ OH (50:50), pH = 6.86						
IV	-14320	-15200	-1230	-1200	-910	-290
V	-17480	-15670	-1810	–	–	–
VII	-14480	-13040	-1440	–	–	–
Ацетатный буфер – CH ₃ OH (50:50), pH = 7.82						
IV	-21110	-19730	-1380	-810	-540	-270
V	-23750	-22090	-1660	-390	-190	-210
VII	-24670	-23370	-1300	-690	-370	-320
Ацетатный буфер – CH ₃ CN (70:30) pH = 6.62						
IV	-8030	-7630	-400	-980	-620	-360
V	-8760	-7940	-820	-930	-680	-250
VI	-9030	-7940	-1100	-460	-220	-230
VII	-6990	-5970	-1020	–	–	–

* $T = 301.6$ К (среднегармоническая температура исследованного температурного интервала)

Анализ разностных термодинамических характеристик ($\Delta\Delta\bar{H}^0, \Delta\Delta\bar{S}^0, \Delta\Delta\bar{G}^0$) показывает, что во всех исследованных случаях, где наблюдается разделение энантиомеров, оно осуществляется под энтальпийным контролем ($\Delta\Delta\bar{S}^0 < 0$ и $|\Delta\Delta\bar{H}^0| > |T\Delta\Delta\bar{S}^0|$), следовательно определяется различием прочности образующихся адсорбционных комплексов энантиомеров с хиральным селектором.

3.2.2. Колонка Nautilus-R

Подвижные фазы состава вода-ацетонитрил

На данной колонке термодинамика адсорбции изучалась для двух составов ацетонитрил содержащих ПФ, с 30 и 98% об. CH_3CN . Выбранные составы отвечали сопоставимым значениям k , но находились на разных ветвях зависимости k от φ . Значения $\Delta\bar{H}_i^0$ и $\Delta\bar{S}_i^0$ представлены в табл. 3.6.

Для всех рассмотренных примеров адсорбция была экзотермической ($\Delta\bar{H}_i^0 < 0$). Изменение энтропии в результате адсорбции тоже имела отрицательное значение и, таким образом, уменьшало удерживание. Другими словами, часть энергии, которая выделяется в результате перехода адсорбируемого вещества из жидкой фазы на поверхность адсорбента, расходуется на структурные преобразования в системе, понижающие прочность адсорбционного комплекса. Тем не менее, для всех исследуемых веществ за исключением III в 30% об. CH_3CN энтальпийный вклад в свободную энергию адсорбции несколько выше, чем энтропийный. Для III эти два вклада равны в пределах погрешности измерения. Относительно высокий вклад энтропийного терма для данного вещества в ПФ с высоким содержанием воды мы связываем с наличием гидрофобной группы CF_3 , оказывающей сильный хаотропный эффект на окружающий объём жидкой фазы.

Энтальпия адсорбции в ПФ с высоким содержанием воды в 1.7–2.2 раза выше, чем в маловодной ПФ. Вероятно, это связано с различием в энтальпиях сольватации, которые входят в величину $\Delta\bar{H}_i^0$ с обратным знаком, так как для адсорбции необходимо разрушение сольватной оболочки аналита. В ПФ с высоким содержанием воды энтальпия сольватации не должна быть высокой, учитывая плохую растворимость ОПХ в таких растворителях. Наоборот, в 98% об. ацетонитриле энтальпия сольватации будет иметь более высокое (и отрицательное) значение и будет понижать теплоту адсорбции.

В табл. 3.7 приведены разности термодинамических характеристик адсорбции оптических антиподов. Видно, что энантиоразделение, так же, как и удерживание,

контролируется энтальпийным фактором. Этот вывод справедлив для обоих рассмотренных составов ПФ, и такая ситуация наиболее часто встречается в хиральной хроматографии [87]. Энтروпийный терм, характеризующий структурные изменения в системе, оказывает негативное влияние на энантиоселективность ($T\Delta\bar{\Delta S}^0 < 0$). Вклад его существенный, но не определяющий, составляет 63–94% величины $\Delta\bar{\Delta H}^0$. Как отмечалось выше, процессы, определяющие изменение энтропии, снижают прочность адсорбционного комплекса. Для сильнее удерживаемого энантиомера это снижение больше, чем для слабее удерживаемого, поэтому $(-\Delta\bar{S}_2^0) > (-\Delta\bar{S}_1^0)$ и $\Delta\bar{\Delta S}^0 < 0$. Такое поведение понятно, так как образование более прочной связи с селектором способствует более сильному ограничению подвижности аналита в составе комплекса включения.

Таблица 3.6

Термодинамические характеристики адсорбции ОПХ на ХНФ Nautilus-R (Дж/моль)

Вещество	$\Delta\bar{H}_1^0$	$T\Delta\bar{S}_1^{0*}$	$\Delta\bar{G}_1^0$	$\Delta\bar{H}_2^0$	$T\Delta\bar{S}_2^{0*}$	$\Delta\bar{G}_2^0$
ПФ: 30% CH ₃ CN						
I	-21150	-18110	-3040	-21150	-18110	-3040
II	-15910	-14530	-1390	-17200	-15570	-1620
III	-15590	-15620	30	-15590	-15620	30
IV	-13920	-13690	-230	-16550	-15710	-840
V	-14550	-13920	-630	-16440	-15330	-1100
VI	-16380	-15080	-1300	-16380	-15080	-1300
ПФ: 98% CH ₃ CN						
I	-9470	-7150	-2320	-9470	-7150	-2320
II	-8020	-6030	-1990	-8910	-6700	-2220
III	-6820	-6190	-630	-8990	-8230	-760
IV	-8170	-7600	-570	-9600	-8720	-880
V	-9020	-6750	-2270	-10460	-7810	-2650
VI	-9230	-6770	-2450	-9740	-7100	-2650

* $T = 301.6$ К (среднегармоническая температура исследованного температурного интервала).

Разности термодинамических характеристик адсорбции для энантиомеров (Дж/моль)

Вещество	$-\Delta\Delta\bar{H}^0$	$-T\Delta\Delta\bar{S}^0$	$-\Delta\Delta\bar{G}^0$
ПФ: 30% об. CH ₃ CN			
I	0	0	0
II	1280	1050	230
III	0	0	0
IV	2630	2020	610
V	1890	1410	470
VI	0	0	0
ПФ: 98% об. CH ₃ CN			
I	0	0	0
II	890	670	220
III	2170	2050	120
IV	1430	1120	310
V	1440	1060	370
VI	520	330	190

* $T=301.6$ К (среднегармоническая температура исследованного температурного интервала)

Подвижные фазы состава вода-метанол

Для изучения термодинамики адсорбции в водно-метанольных средах были выбраны составы ПФ с 50, 90 и 100% об. метанола. Полученные значения представлены в табл. 3.8. Термодинамика адсорбции характеризуется экзотермическим тепловым эффектом для всех исследованных соединений во всех рассмотренных составах ПФ. Удерживание первого элюируемого изомера является энтальпийно контролируемым процессом ($|\Delta\bar{H}_i^0| > |T\Delta\bar{S}_i^0|$) в ПФ с высоким содержанием воды (50% об. CH₃OH) и становится энтропийно контролируемым в ПФ, обогащённых метанолом (табл. 3.8). Это обстоятельство приводит к положительным значениям $\Delta\bar{G}_i^0$ (за исключением ОПХ I и VI в чистом метаноле) и соответственно слабому удерживанию, $k < 1$ (см. табл. 3.3). Прочнее удерживаемый энантиомер характеризуется сильно превалирующим энтальпийным вкладом в 50% об. CH₃OH и сохранением энтальпийного контроля для соединений I, II, V-VII в чистом метаноле (табл. 3.8). Разделение энантиомеров (если наблюдается) во всех случаях характеризуется энтальпийным контролем, то есть происходит благодаря различию в энергиях связи между энантиомерами и

хиральным селектором. Энтропийные эффекты действуют в противоположном направлении, нивелируя до некоторой степени различия в сродстве между энантиомерами и селектором.

Изменение термодинамических характеристик адсорбции энантиомеров с увеличением доли CH_3OH в ПФ происходит симбатно или квазисимбатно (тренды зависимостей похожи, но не точно повторяют друг друга) для соединений I-III, V и VI и антибатно для соединений IV и VII. Оба последних ОПХ содержат алкильные заместители, но в разных положениях: у IV – этильный радикал удалён от хирального центра, а у VII – *трет*-бутильный радикал находится у хирального центра. Возможно, наличие неполярных заместителей влияет на особенности взаимодействия аналитов с растворителем в составе адсорбционного комплекса. (Особенности сольватации энантиомеров в ПФ не должны приводить к антибатному поведению, так как это – ахиральный процесс и соответствующие термодинамические вклады одинаковы для обоих энантиомеров).

Тепловые эффекты адсорбции ОПХ из водно-метанольных растворов заметно, на 10-20 кДж/моль, выше таковых из водно-ацетонитрильных смесей при сопоставимом составе жидкой фазы. Логично предположить, что это вызвано более высокой энтальпией сольватации ОПХ в смесях $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ по сравнению со смесями $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$, благодаря лучшему взаимодействию менее полярного ацетонитрила с гидрофобными молекулами ОПХ. Поскольку десольватация аналита предшествует его взаимодействию с адсорбентом, то тепловой эффект сольватации вычитается из общего теплового эффекта адсорбции.

3.4. Изотермы адсорбции оксазолопирролохинолонов V и VI

Поскольку нам были доступны только рацематы ОПХ, измерение изотерм адсорбции могло быть выполнено только для хорошо разделяемых энантиомерных пар и только в том диапазоне концентраций адсорбтива, в котором наблюдается полное разделение. Хроматограммы исследуемых ОПХ представлены на рисунке 3.12. Видно, что с увеличением концентрации пробы время удерживания меняется слабо; для первого пика слабее, чем для второго. Это указывает на то, что в исследованном диапазоне концентраций нелинейность изотермы адсорбции незначительна. Оба пика для обоих веществ асимметричны, с размытым задним фронтом; для первого пика это выражено слабее, чем для второго. Поскольку размытие задней ветви пиков наблюдается для самых разбавленных проб, логично предположить, что существенный вклад в это явление вносит медленная кинетика адсорбции. Это обстоятельство сделало бы невозможным применение классического метода Глюкауфа, в котором изотерма адсорбции рассчитывается на основании размытой ветви пика. Однако используемый в работе

Термодинамические характеристики адсорбции пирролохинолонов на ХНФ Nautilus-R как функции концентрации метанола в ПФ (Дж/моль)

Вещество	$\Delta\bar{H}_1^0$	$T\Delta\bar{S}_1^{0*}$	$\Delta\bar{G}_1^0$	$\Delta\bar{H}_2^0$	$T\Delta\bar{S}_2^{0*}$	$\Delta\bar{G}_2^0$	$\Delta\Delta\bar{H}^0$	$T\Delta\Delta\bar{S}^{0**}$	$\Delta\Delta\bar{G}^0$
50% об. CH ₃ OH									
I	-34100	-29780	-4330	-41800	-36240	-5560	-7700	-6470	-1230
II	-30260	-27070	-3190	-30260	-27070	-3190	0	0	0
III	-26650	-25080	-1570	-30180	-28530	-1660	-3530	-3450	-90
IV	-26600	-24790	-1810	-27850	-25630	-2220	-1250	-840	-410
V	-28100	-25680	-2420	-28100	-25680	-2420	0	0	0
VI	-27800	-25060	-2740	-32710	-29460	-3250	-4910	-4400	-510
VII	-24290	-22480	-1810	-39490	-35100	-4390	-15200	-12620	-2580
90% об. CH ₃ OH									
I	-36520	-36780	260	-41210	-39540	-1660	-4690	-2760	-1930
II	-19440	-20270	830	-25630	-25830	200	-6190	-5560	-630
III	-23690	-26150	2450	-31360	-32970	1610	-7660	-6820	-840
IV	-22090	-23770	1680	-22090	-23770	1680	0	0	0
V	-18480	-19220	740	-25760	-25850	90	-7290	-6640	-650
VI	-20900	-21210	310	-28490	-27810	-680	-7590	-6600	-990
VII	-25400	-27780	2380	-31540	-31700	170	-6140	-3930	-2210

Вещество	$\overline{\Delta H}_1^0$	$T\overline{\Delta S}_1^{0*}$	$\overline{\Delta G}_1^0$	$\overline{\Delta H}_2^0$	$T\overline{\Delta S}_2^{0*}$	$\overline{\Delta G}_2^0$	$\Delta\overline{\Delta H}^0$	$T\Delta\overline{\Delta S}^{0**}$	$\Delta\overline{\Delta G}^0$
100% об. CH ₃ OH									
I	-37810	-37680	-130	-45010	-42810	-2200	-7200	-5140	-2060
II	-19100	-19720	620	-28150	-27740	-410	-9050	-8020	-1030
III	-22400	-24370	1960	-30020	-30750	730	-7620	-6380	-1240
IV	-17000	-18360	1360	-26510	-27480	960	-9510	-9120	-390
V	-16750	-16940	200	-26410	-25610	-800	-9660	-8670	-1000
VI	-21040	-20690	-350	-30610	-29050	-1550	-9570	-8370	-1200
VII	-24860	-27110	2260	-32170	-31890	-290	-7320	-4770	-2540

* Индексы 1 и 2 относятся к первому и второму элюируемым энантиомерам соответственно.

** $T = 301.6$ К (среднегармоническая температура исследованного температурного интервала).

модифицированный метод осуществляет расчёт на основании времен выхода пиков, на значения которых кинетика адсорбции не оказывает заметного влияния. Конечно, этот технический приём не отменяет того факта, что адекватность идеальной модели хроматографии, лежащей в основе метода Глюкауфа, оказывается в таких условиях под вопросом, однако опыт применения модифицированного метода к адсорбции в хиральных системах [108; 109] показывает, что рассчитанные таким образом изотермы адсорбции мало отличаются от найденных с применением более совершенных методов.

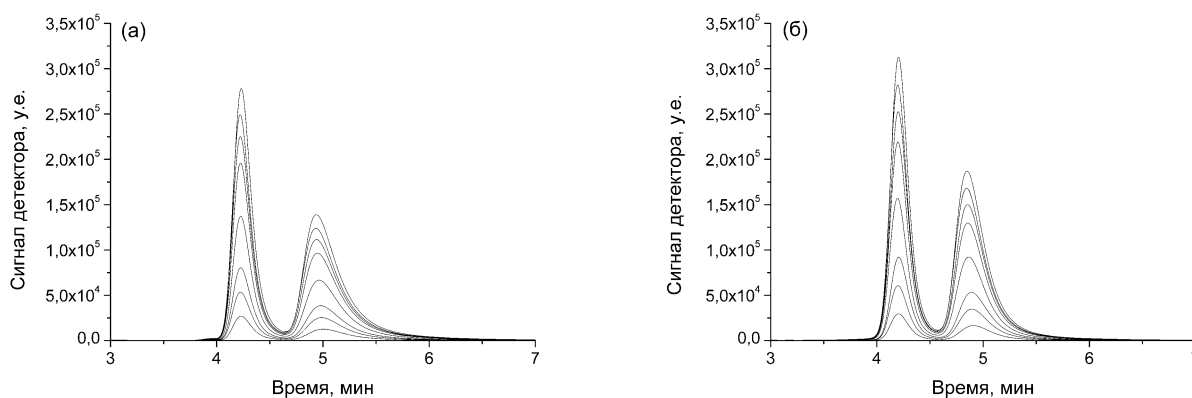


Рис. 3.12. Хроматограммы рацематов ОПХ V (а) при элюировании чистым метанолом и VI (б) при элюировании раствором CH_3OH с концентрацией 90% об. на ХНФ Nautilus-R. Концентрация верхней и нижней хроматограмм соответствуют 0.04 и 0.004 г/л вещества в пробе соответственно.

На рисунке 3.13 приведены изотермы адсорбции и графики Скэтчарда (зависимость q/c от q) вещества V. На рисунке 3.14 приведены аналогичные графики для вещества VI. Как видно, в исследованном диапазоне концентраций, ограниченном малой растворимостью ОПХ, изотермы адсорбции близки к линейным. Представление данных в координатах Скэтчарда выявляет нелинейность в адсорбции более прочно адсорбируемого энантиомера. Внимательное рассмотрение графиков Скэтчарда показывает, что адсорбция этого энантиомера характеризуется более сложной изотермой адсорбции, чем изотерма Лэнгмюра. В последнем случае график Скэтчарда должен быть наклонной прямой, чего не наблюдается для соответствующих кривых на рис. 3.13б и 3.14б. Слабые отклонения от линейности не позволяют извлечь большей информации из полученных данных.

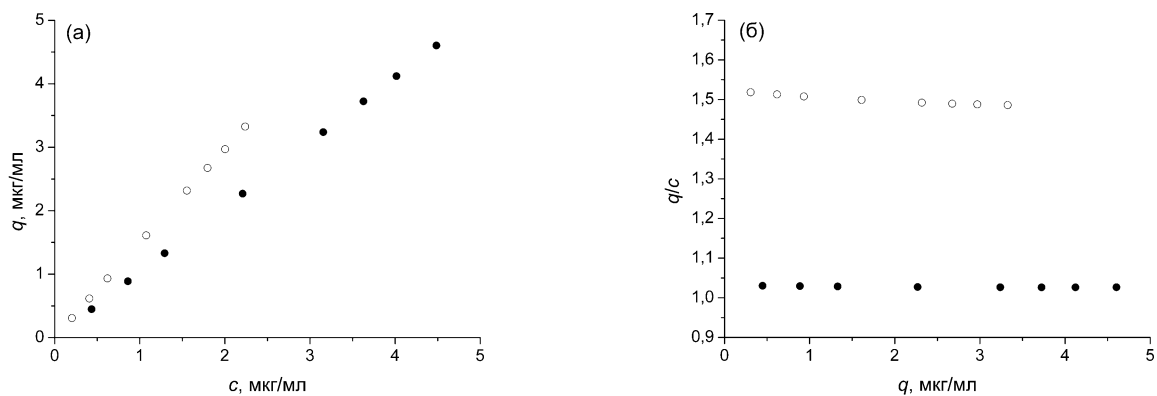


Рис. 3.13. Изотермы адсорбции (а) и график Скэтчарда (б) для энантимеров ОПХ V. ПФ: CH_3OH , ХНФ: Nautilus-R. Тёмные точки соответствуют первому, а светлые точки – второму элюируемому энантимеру.

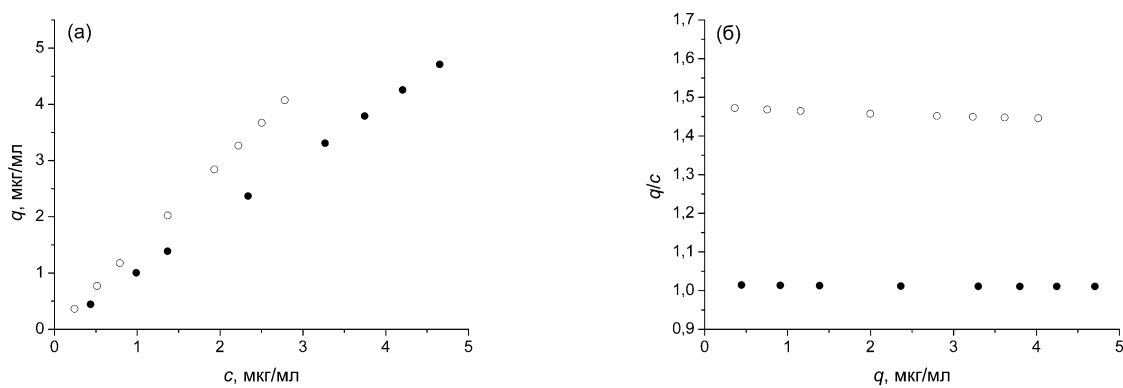


Рис. 3.14. Изотермы адсорбции (а) и график Скэтчарда (б) для энантимеров ОПХ VI. ПФ: 90% об. CH_3OH , ХНФ: Nautilus-R. Тёмные точки соответствуют первому, а светлые точки – второму элюируемому энантимеру.

ГЛАВА 4. МЕХАНИЗМЫ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОЙ АДСОРБЦИИ ДИПЕПТИДОВ

4.1. Удерживание и разделение стереоизомеров дипептидов на неподвижных фазах Nautilus-E, Nautilus-R и Chirobiotic R

4.1.1. Влияние состава подвижной фазы

Влияние состава ПФ на энантиоселективное удерживание дипептидов изучалось на примере водно-метанольных и водно-ацетонитрильных буферных смесей с содержанием органического растворителя 40-90% об. При содержании органического компонента ниже 40% об., и соответственно воды выше 60% об., дипептиды элюировались из колонки раньше неудерживаемого маркера (ТтББ). В качестве буферной системы использовалась натриево-ацетатная буферная смесь с суммарным содержанием ацетата натрия и уксусной кислоты 0.1 М; их соотношение варьировалось для достижения требуемого рН в диапазоне от ~4 до ~7.

Результаты экспериментов по изучению удерживания дипептидов на ХНФ Nautilus-E и Nautilus-R из водно-метанольных ПФ представлены в табл. 4.1. Можно увидеть, что энантиомеры с D-конфигурацией в C-концевом положении сильнее связываются с обоими хиральными селекторами. Это касается как пар DD/LL, так и пар LD/DL. C-концевые D-энантиомеры дипептидов, имеющих в своем составе ахиральный глицин, удерживались лучше, чем L-формы, в некоторых случаях в несколько раз. Так коэффициент разделения для энантиомерной пары Gly-Leu достигал значения 12-13¹ на Nautilus-R и 8-9 на Nautilus-E. При этом энантиомеры Leu-Gly с ахиральным остатком глицина в C-концевом положении разделялись слабо. Подобные закономерности наблюдались на ристоцетиновой ХНФ в работе [147]. Такой порядок выхода не удивителен, учитывая, что ристоцетин А селективно связывается с -D-Ala-D-Ala терминальным фрагментом мукопептидов [36].

Для диастереомеров DL и LL лейциллейцина и лейцилтирозина наблюдается изменение порядка выхода при изменении рН в кислой среде. Это объясняется тем, что энантиоселективный центр рассматриваемых антибиотиков не приспособлен для распознавания L-терминальных пептидов, поэтому достигаемая относительно них энантиоселективность обусловлена слабыми различиями во взаимодействиях селектор-селектанд и даже небольшого изменения в прочности образующихся комплексов, вызванного незначительным изменением

¹ Нереально большое значение $\alpha = 50.7$, наблюдавшееся в 40% об. CH_3OH при $\text{pH}_a = 3.86$ является математической фикцией и объясняется потерей удерживания Gly-L-Leu, вследствие чего его $k \rightarrow 0$.

условий, может оказаться достаточно для обращения порядка выхода. Отметим также, что указанный эффект наблюдается в области слабого удерживания рассматриваемых дипептидов.

В целом, колонка Nautilus-R показывала более высокие факторы удерживания, по сравнению с Nautilus-E. Только энантиомеры кислого дипептида Gly-Asp удерживались сильнее на ХНФ с привитым эремомицином и удерживание энантиомеров Leu-Leu было близко на обеих ХНФ.

Для большинства рассмотренных дипептидов энантиоразделение было выше на ХНФ с ристоцетином А. Это особенно заметно для ПФ с высоким содержанием воды (табл. 4.2), что говорит о различиях в специфических взаимодействиях с селектором. При этом закономерности удерживания дипептидов (вид зависимостей $k(\varphi)$ и $k(\text{pH})$) на обоих ХНФ качественно близки. Логично сделать вывод, что отличие заключается не в природе образуемых адсорбционных комплексов – в обоих случаях связывание осуществляется через хиральный «карман» селектора, – а в различии в прочности комплексов. В силу некоторого отличия строения хирального «кармана» молекулы эремомицина предпочтительно удерживаемый энантиомер, вернее его С-терминальный остаток, по которому осуществляется связывание, не обеспечивается тем набором взаимодействий, которым он обеспечивается в хиральном «кармане» ристоцетина А.

На зависимость удерживания от соотношения вода:метанол в ПФ влияла гидрофобность дипептида (её оценки в виде коэффициента распределения н-октанол/вода приведены в табл. 4.3). Относительно гидрофильные дипептиды Gly-Asp, Ala-Ala, Gly-Leu элюируются дольше при увеличении доли метанола в ПФ. Тогда как удерживание липофильного Leu-Leu наоборот уменьшается с увеличением концентрации метанола. На качественном уровне такое поведение было характерно для обеих рассматриваемых колонок. Иллюстрация сказанного приведена на рис. 4.1, где показаны зависимости фактора удерживания гидрофильного Ala-Ala и липофильного Leu-Leu от pH для ПФ с различным содержанием метанола на колонке Nautilus-R. Очевидно, такая закономерность объясняется влиянием сольватации аналита в ПФ. Для гидрофильных дипептидов увеличение доли метанола ведёт к уменьшению свободной энергии десольватации ($\Delta\bar{G}_{\text{десольв}}^0$), величины с положительным знаком, то есть, к уменьшению общей свободной энергии адсорбции (см. уравнение (1.31)) и, как результат, к увеличению удерживания (уменьшение $\Delta\bar{G}^0$ осуществляется в отрицательной области энергетической шкалы, следовательно, соответствует увеличению её абсолютного значения).

Факторы удерживания и коэффициенты разделения дипептидов на колонках с привитыми антибиотиками ристоцетином А и эремомицином для водно-метанольных подвижных фаз

CH ₃ OH, % об.	Nautilus-R						Nautilus-E					
	pH	3.86	4.80	5.33	5.86	6.79	3.86	4.80	5.33	5.86	6.79	
40	Leu-Leu	k_{DL}	-0.02	0.26	0.27	0.23	0.24	0.06	0.27	0.30	0.31	0.34
		k_{LL}	-0.05	0.29	0.36	0.32	0.31	-0.05	0.33	0.42	0.45	0.51
		k_{LD}	0.40	0.79	0.82	0.76	0.87	0.45	0.93	0.97	0.97	1.41
		k_{DD}	2.30	5.84	6.59	6.43	6.40	2.11	5.36	5.96	5.98	7.42
		$\alpha_{DD/LL}$	-	20.02	18.41	20.33	20.52	-	16.27	14.22	13.37	14.41
		$\alpha_{LD/DL}$	-	3.07	3.00	3.29	3.69	7.44	3.40	3.21	3.10	4.18
	Ala-Ala	k_{LL}	-0.02	0.25	0.27	0.23	0.23	-0.02	0.23	0.26	0.26	0.27
		k_{DD}	1.11	2.28	2.36	2.20	2.31	0.28	0.75	0.80	0.81	1.20
		$\alpha_{DD/LL}$	-	9.20	8.74	9.81	10.31	-	3.29	3.09	3.11	4.39
	Leu-Gly	k_L	0.11	0.35	0.35	0.31	0.32	0.07	0.28	0.30	0.30	0.35
		k_D	0.24	0.55	0.57	0.50	0.50	0.11	0.34	0.35	0.31	0.43
		$\alpha_{D/L}$	2.11	1.58	1.64	1.62	1.57	1.57	1.22	1.20	1.20	1.23
	Gly-Leu	k_L	0.03	0.29	0.32	0.27	0.28	0.05	0.33	0.37	0.37	0.39
		k_D	1.65	3.11	3.20	2.94	2.89	0.42	0.99	1.04	1.04	1.40
		$\alpha_{D/L}$	50.68	10.56	9.90	10.75	10.38	8.20	3.00	2.84	2.80	3.57
	Leu-Tyr	k_{LL}	0.10	0.46	0.52	0.54	0.56	0.16	0.54	0.60	0.62	0.75
		k_{DL}	0.19	0.37	0.40	0.41	0.42	0.24	0.44	0.45	0.45	0.47

CH ₃ OH, % об.	Nautilus-R						Nautilus-E					
	pH	3.86	4.80	5.33	5.86	6.79	3.86	4.80	5.33	5.86	6.79	
40	Ala-Gly	<i>k_L</i>	0.13	0.39	0.42	0.42	0.43	0.06	0.27	0.28	-	-
	Gly-Ala	<i>k_L</i>	0.00	0.21	0.24	0.25	0.27	0.04	0.26	0.28	-	-
	Gly-Asp	<i>k_L</i>	0.62	0.72	0.56	0.42	0.28	2.30	2.50	1.86	1.34	0.89
		<i>k_D</i>	1.60	1.66	1.14	0.72	0.40	3.15	3.35	2.46	1.74	1.25
		<i>α_{D/L}</i>	2.57	2.32	2.03	1.70	1.44	1.37	1.34	1.32	1.30	1.40
	pH	4.38	5.27	5.82	6.33	7.25	4.34	5.24	5.76	6.27	7.27	
60	Leu-Leu	<i>k_{DL}</i>	-0.06	0.20	0.23	0.23	0.22	0.07	0.28	0.30	0.30	0.32
		<i>k_{LL}</i>	-0.06	0.22	0.28	0.30	0.28	-0.06	0.32	0.40	0.42	0.48
		<i>k_{LD}</i>	0.33	0.65	0.66	0.66	0.82	0.37	0.73	0.70	0.80	1.31
		<i>k_{DD}</i>	1.64	4.13	4.62	4.53	4.23	1.80	4.76	5.24	5.26	6.64
		<i>α_{DD/LL}</i>	-	19.24	16.39	15.00	14.96	-	14.74	13.02	12.42	13.87
		<i>α_{LD/DL}</i>	-	3.26	2.90	2.95	3.72	5.56	2.64	2.37	2.68	4.10
	Ala-Ala	<i>k_{LL}</i>	0.19	0.43	0.46	0.46	0.45	0.08	0.41	0.44	0.43	0.46
		<i>k_{DD}</i>	2.45	4.54	4.57	4.38	4.73	0.59	1.28	1.34	1.40	2.33
		<i>α_{DD/LL}</i>	12.63	10.54	9.85	9.48	10.42	7.35	3.15	3.06	3.23	5.02
	Leu-Gly	<i>k_L</i>	0.25	0.44	0.45	0.45	0.25	0.16	0.38	0.39	0.39	0.47
		<i>k_D</i>	0.44	0.72	0.72	0.78	0.67	0.23	0.48	0.49	0.49	0.60
		<i>α_{D/L}</i>	1.80	1.64	1.60	1.71	2.65	1.41	1.26	1.24	1.23	1.28

CH ₃ OH, % об.	Nautilus-R						Nautilus-E					
	pH	4.38	5.27	5.82	6.33	7.25	4.34	5.24	5.76	6.27	7.27	
60	Gly-Leu	<i>k_L</i>	0.20	0.36	0.39	0.40	0.40	0.11	0.46	0.49	0.48	0.51
		<i>k_D</i>	2.70	4.69	4.77	4.50	4.15	0.57	1.27	1.32	1.32	1.96
		<i>α_{D/L}</i>	13.61	12.96	12.15	11.39	10.28	5.26	2.79	2.70	2.73	3.81
	Leu-Tyr	<i>k_{LL}</i>	0.07	-	-	-	0.38	0.14	0.49	0.53	0.54	0.62
		<i>k_{DL}</i>	0.17	-	-	-	0.33	0.23	0.40	0.40	0.39	0.41
	Ala-Gly	<i>k_L</i>	0.56	0.89	0.88	0.84	0.80	0.23	0.48	0.49	0.48	0.54
	Gly-Ala	<i>k_L</i>	0.19	0.47	0.49	0.49	0.50	0.19	0.49	0.50	0.50	0.53
	Gly-Asp	<i>k_L</i>	1.28	1.37	1.18	0.99	0.72	4.19	4.47	3.37	2.45	1.70
		<i>k_D</i>	3.50	3.36	2.36	1.59	0.96	5.60	5.83	4.31	3.09	2.35
		<i>α_{D/L}</i>	2.73	2.45	2.01	1.61	1.34	1.34	1.31	1.28	1.26	1.38
	pH	4.96	5.83	6.36	6.84	7.73	4.95	5.86	6.32	6.87	7.77	
80	Leu-Leu	<i>k_{DL}</i>	0.12	0.34	0.34	0.33	0.29	0.42	0.40	0.41	0.39	0.39
		<i>k_{LL}</i>	-0.01	0.31	0.34	0.33	0.25	0.03	0.43	0.49	0.48	0.46
		<i>k_{LD}</i>	0.53	0.88	0.81	0.77	0.97	0.52	0.87	0.88	0.93	1.55
		<i>k_{DD}</i>	1.61	3.62	3.51	3.13	2.49	2.26	5.17	5.33	5.05	5.41
		<i>α_{DD/LL}</i>	-	11.87	10.43	9.52	9.84	82.91	12.14	10.98	10.58	11.88
		<i>α_{LD/DL}</i>	4.21	2.59	2.43	2.39	3.27	1.24	2.14	2.13	2.37	3.97

CH ₃ OH, % об.	Nautilus-R						Nautilus-E					
	pH	4.96	5.83	6.36	6.84	7.73	4.95	5.86	6.32	6.87	7.77	
80	Leu-Gly	<i>k_L</i>	0.58	0.92	0.85	0.79	0.69	0.41	0.69	0.67	0.66	0.72
		<i>k_D</i>	0.98	1.42	1.27	1.15	0.95	0.60	0.90	0.87	0.83	0.93
		<i>α_{D/L}</i>	1.69	1.54	1.50	1.46	1.37	1.46	1.29	1.30	1.26	1.28
	Gly-Leu	<i>k_L</i>	0.32	0.78	0.79	0.77	0.69	0.40	0.89	0.90	0.85	0.81
		<i>k_D</i>	7.31	10.48	10.04	8.59	6.59	1.35	2.42	2.40	2.41	3.40
		<i>α_{D/L}</i>	22.57	13.47	12.70	11.22	9.50	3.37	2.73	2.68	2.83	4.19
	Leu-Tyr	<i>k_{LL}</i>	0.17	-	-	-	0.39	0.27	0.66	0.67	0.64	0.60
		<i>k_{DL}</i>	0.36	-	-	-	0.45	0.40	0.57	0.55	0.52	0.50
	Ala-Gly	<i>k_L</i>	1.98	-	-	-	1.92	0.81	1.21	1.18	1.12	1.21
	Gly-Ala	<i>k_L</i>	0.85	-	-	-	1.18	0.77	1.28	1.27	1.19	1.17
	Gly-Asp	<i>k_L</i>	4.06	4.99	4.91	4.70	3.98	12.12	12.94	10.36	7.90	5.62
		<i>k_D</i>	11.76	12.24	9.33	6.77	5.33	15.78	16.56	12.93	9.78	7.75
		<i>α_{D/L}</i>	2.90	2.45	1.90	1.44	1.34	1.30	1.28	1.25	1.24	1.38
		pH	5.15	-	-	-	7.98	5.24	-	-	-	7.98
	90	Leu-Leu	<i>k_{DL}</i>	0.25	-	-	-	0.36	0.36	-	-	-
<i>k_{LL}</i>			0.06	-	-	-	0.29	0.14	-	-	-	0.50
<i>k_{LD}</i>			0.85	-	-	-	1.14	0.79	-	-	-	2.07
<i>k_{DD}</i>			1.94	-	-	-	2.19	3.24	-	-	-	5.50

CH ₃ OH, % об.			Nautilus-R				Nautilus-E					
		pH	5.15	-	-	-	7.98	5.24	-	-	-	7.98
90	Ala-Ala	k_{LL}	1.21				1.25	0.88				1.29
		k_{DD}	13.36	-	-	-	17.03	3.42	-	-	-	8.20
		$\alpha_{DD/LL}$	11.05				13.60	3.87				6.36
	Leu-Gly	k_L	1.06				0.90	0.80				1.00
		k_D	1.68	-	-	-	1.19	1.09	-	-	-	1.27
		$\alpha_{D/L}$	1.58				1.32	1.37				1.27
	Gly-Leu	k_L	0.69				0.93	0.86				1.14
		k_D	13.61	-	-	-	8.35	2.63	-	-	-	5.12
		$\alpha_{D/L}$	19.87				8.97	3.06				4.49
	Leu-Tyr	k_{LL}	0.37				0.48	0.49				0.68
		k_{DL}	0.62	-	-	-	0.64	0.66	-	-	-	0.66
	Ala-Gly	k_L	4.74	-	-	-	3.21	1.69	-	-	-	2.01
	Gly-Ala	k_L	1.99	-	-	-	1.93	1.66	-	-	-	1.89
	Gly-Asp	k_L	7.46				8.05	24.32				13.19
		k_D	23.70	-	-	-	10.45	31.40	-	-	-	17.46
$\alpha_{D/L}$		3.18				1.30	1.29				1.32	

Таблица 4.2

Сравнение коэффициентов разделения для некоторых дипептидов на двух колонках при содержании метанола в ПФ 40% об.

Nautilus-R					
pH	3.86	4.80	5.33	5.86	6.79
Leu-Leu [*]	-	20.0	18.4	20.3	20.5
Gly-Leu ^{**}	50.7	10.6	9.9	10.8	10.4
Ala-Ala [*]	-	9.2	8.7	9.8	10.3
Leu-Gly ^{**}	2.1	1.6	1.6	1.6	1.6
Nautilus-E					
Leu-Leu [*]	-	16.3	14.2	13.4	14.4
Gly-Leu ^{**}	8.2	3.0	2.8	2.8	3.6
Ala-Ala [*]	-	3.3	3.1	3.1	4.4
Leu-Gly ^{**}	1.6	1.2	1.2	1.2	1.2

* $\alpha = k_{DD}/k_{LL}$, ** $\alpha = k_D/k_L$

Для липофильных дипептидов наблюдается обратная зависимость. Безусловно, состав ПФ может влиять и на другие составляющие энергии адсорбции и в некоторых случаях может пересилить тренд, задаваемый влиянием φ на процесс сольватации, как это наблюдалось для адсорбции ОПХ (см. главу 3), но в случае с дипептидами, по-видимому, влияние сольватации в жидкой фазе на вид зависимости $k(\varphi)$ был первичен, а других факторов – вторичен.

Таблица 4.3

Логарифм коэффициента распределения н-октанол/вода для некоторых дипептидов*

Дипептид	Gly-Asp	Ala-Ala	Gly-Leu	Leu-Gly	Leu-Tyr	Leu-Leu
$\lg K_{ow}$	-1.49	-1.16	-0.09	-0.09	1.36	1.66

* Найдено с помощью программного продукта ACD/Labs Percepta Platform – PhysChem Module на сайте <http://www.chemspider.com>.

Влияние концентрации метанола на энантиоразделение также зависело от гидрофобности дипептида. В случае более гидрофильного Ala-Ala увеличение доли метанола положительно сказывалось на энантиоселективности, для относительно гидрофобного Leu-Leu – вело к уменьшению фактора разделения энантиомеров. Отличия от общего тренда наблюдались для относительно гидрофильной глициласпарагиновой кислоты. Для этого дипептида α уменьшался с повышением доли метанола в ПФ.

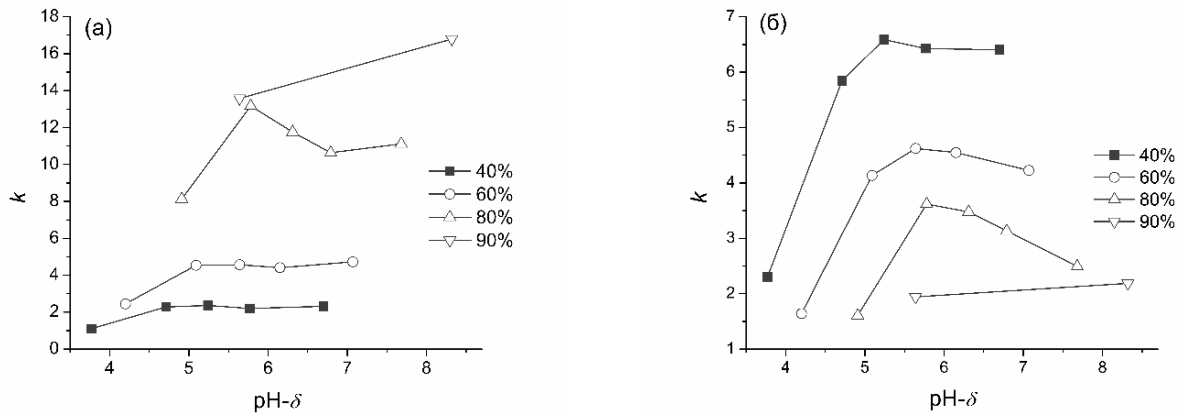


Рис. 4.1. Влияние pH и концентрации метанола в ПФ на удерживание D-Ala-D-Ala (а) и D-Leu-D-Leu (б) на колонке Nautilus-R. По шкале абсцисс отложено значение pH ПФ для данного водно-метанольного растворителя (см. раздел 2.3.1).

Данные экспериментов с водно-ацетонитрильными ПФ суммированы в табл. 4.4. Удерживание дипептидов из таких элюентов в целом подчинялось тем же закономерностям, что и из водно-метанольных смесей. Также как и с водно-метанольными ПФ более прочное связывание с хиральным селектором было отмечено для энантимеров с D-аминокислотой в C-концевом положении. Сохранился порядок выхода стереоизомеров Leu-Leu ($DL < LL < LD < DD$). Отметим интересную закономерность, касающуюся глицилсодержащих дипептидов. Факторы удерживания позиционных L-изомеров (Gly-L-Leu и L-Leu-Gly, Gly-L-Ala и L-Ala-Gly) были близки, тогда как факторы удерживания позиционных D-изомеров заметно отличались. Это означает, что ни Gly-L-X, ни L-X-Gly (X – аминокислотный остаток) не образуют с селектором прочного комплекса включения и удерживаются благодаря похожей комбинации взаимодействий.

Для большинства дипептидов факторы удерживания D(D)-стереоизомеров для водно-ацетонитрильных ПФ были ниже таковых, чем для водно-метанольных. В то же время удерживание L(L)-форм было выше в ПФ на основе смеси вода-ацетонитрил. Таким образом, использование в качестве органического модификатора ацетонитрила в общем уменьшало энантиоселективность. Примечательно, что при использовании в качестве органического модификатора ПФ ацетонитрила, значительно ослабевала связь между гидрофобностью дипептида и влиянием доли органического растворителя на его удерживание. В качестве иллюстрации на рис. 4.2 показаны зависимости $k(\text{pH})$ для Ala-Ala и Leu-Leu для трёх составов ПФ, содержащих 40, 60 и 80% об. CH_3CN . Видно, что в отличие от ситуации с системами $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$ удерживание обоих дипептидов увеличивается по мере роста доли ацетонитрила.

Факторы удерживания и коэффициенты разделения дипептидов на колонке с привитым антибиотиком ристоцетином А для водно-ацетонитрильных подвижных фаз

CH ₃ CN, % об.	pH		4.09	5.01	5.50	6.07	7.01	
40	Leu-Leu	k_{DL}	0.05	0.19	0.20	0.20	0.18	
		k_{LL}	-	0.25	0.29	0.30	0.33	
		k_{LD}	0.12	0.30	0.32	0.30	0.32	
		k_{DD}	0.28	1.01	1.07	1.04	0.98	
		$\alpha_{DD/LL}$	-	4.03	3.76	3.45	3.02	
		$\alpha_{LD/DL}$	2.77	1.57	1.67	1.51	1.75	
	Ala-Ala	k_{LL}	0.10	0.33	0.33	0.33	0.32	
		k_{DD}	0.54	0.99	0.95	0.91	0.95	
		$\alpha_{DD/LL}$	5.64	3.05	2.89	2.79	2.94	
	Leu-Gly	k_L	0.14	0.30	0.30	0.30	0.31	
		k_D	0.16	0.33	0.33	0.32	0.31	
		$\alpha_{D/L}$	1.15	1.10	1.10	1.07	1.01	
	Gly-Leu	k_L	0.07	0.30	0.33	0.30	0.30	
		k_D	0.54	1.01	0.99	0.94	0.89	
		$\alpha_{D/L}$	7.36	3.34	3.02	3.08	2.96	
	Leu-Tyr	k_{LL}	0.06	0.31	0.33	0.33	0.30	
		k_{DL}	0.15	0.27	0.26	0.26	0.24	
	Ala-Gly	k_L	0.19	0.39	0.36	0.36	0.35	
	Gly-Ala	k_L	0.15	0.34	0.34	0.33	0.33	
		k_D	1.00	1.51	1.41	1.34	1.33	
		$\alpha_{D/L}$	6.50	4.40	4.20	4.10	4.09	
	Gly-Asp	k_L	1.00	0.82	0.54	0.41	0.31	
		k_D	1.34	1.06	0.67	0.47	1.00	
		$\alpha_{D/L}$	1.34	1.30	1.23	1.14	3.26	
		pH		4.63	5.47	6.06	6.54	7.50
	60	Leu-Leu	k_{DL}	0.27	0.38	0.38	0.37	0.34
			k_{LL}	0.15	0.52	0.57	0.55	0.41
k_{LD}			0.39	0.52	0.51	0.50	0.51	
k_{DD}			0.80	1.57	1.62	1.56	1.22	

CH ₃ CN, % об.	pH		4.63	5.47	6.06	6.54	7.50	
60		$\alpha_{DD/LL}$	5.17	3.01	2.86	2.85	2.93	
		$\alpha_{LD/DL}$	1.43	1.37	1.34	1.35	1.49	
	Ala-Ala	k_{LL}	1.01	1.38	1.39	1.40	1.34	
		k_{DD}	2.74	3.46	3.26	3.12	3.25	
		$\alpha_{DD/LL}$	2.70	2.51	2.36	2.23	2.43	
	Leu-Gly	k_L	0.72	0.88	0.85	0.88	0.93	
		k_D	0.77	0.93	0.93	0.92	0.99	
		$\alpha_{D/L}$	1.07	1.06	1.09	1.04	1.06	
	Gly-Leu	k_L	0.63	0.91	0.94	0.93	0.93	
		k_D	1.86	2.41	2.28	2.15	2.04	
		$\alpha_{D/L}$	2.96	2.65	2.43	2.32	2.20	
	Leu-Tyr	k_L	0.40	0.67	0.68	0.66	0.50	
		k_D	0.48	0.56	0.55	0.55	0.52	
	Ala-Gly	k_L	1.35	1.55	1.53	1.53	1.49	
	Gly-Ala	k_L	1.18	1.44	1.45	1.46	1.45	
		k_D	4.65	5.23	4.77	4.40	4.38	
		$\alpha_{D/L}$	3.92	3.64	3.30	3.02	3.02	
	Gly-Asp	k_L	3.79	2.79	2.39	2.23	2.05	
		k_D	3.79	3.43	2.68	2.38	2.13	
		$\alpha_{D/L}$	1.00	1.23	1.12	1.07	1.04	
		pH		5.20	6.20			
	80	Leu-Leu	k_{DL}	1.93	2.19	-	-	-
			k_{LL}	1.88	2.81	-	-	-
			k_{LD}	2.45	2.63	-	-	-
			k_{DD}	4.78	6.44	-	-	-
			$\alpha_{DD/LL}$	2.54	2.29	-	-	-
			$\alpha_{LD/DL}$	1.27	1.20	-	-	-

CH ₃ CN, % об.		pH	5.20	6.20			
80	Ala-Ala	k_{LL}	11.24	17.01	-	-	-
		k_{DD}	29.29	38.08	-	-	-
		$\alpha_{DD/LL}$	2.61	2.24	-	-	-
	Leu-Gly	k_L	5.35	6.84	-	-	-
		k_D	5.70	7.02	-	-	-
		$\alpha_{D/L}$	1.07	1.03	-	-	-
	Gly-Leu	k_L	5.13	7.80	-	-	-
		k_D	13.46	16.18	-	-	-
		$\alpha_{D/L}$	2.62	2.07	-	-	-
	Leu-Tyr	k_{LL}	3.17	3.99	-	-	-
		k_{DL}	3.18	3.60	-	-	-
	Ala-Gly	k_L	13.41	19.57	-	-	-
		k_D	12.97	19.14	-	-	-
		$\alpha_{D/L}$	0.97	0.98	-	-	-
	Gly-Ala	k_L	10.36	19.11	-	-	-
		k_D	10.36	19.11	-	-	-
		$\alpha_{D/L}$	1.00	1.00	-	-	-
	Gly-Asp	k_L	27.85	73.85	-	-	-
		k_D	37.04	81.96	-	-	-
		$\alpha_{D/L}$	1.33	1.11	-	-	-

Очевидно, что апротонный ацетонитрил является «плохим» растворителем для заряженных молекул дипептидов и увеличение его доли будет негативно сказываться на сольватировании как гидрофильного аланилаланила, так и липофильного лейциллейцила. Тем не менее, в последнем случае увеличение k не происходит так сильно, как в случае с Ala-Ala, где он возрастает в 30-40 раз при увеличении $\varphi(\text{CH}_3\text{CN})$ с 40 до 80% об. Причина этого в том, что сродство (невысокое) CH₃CN к липофильному Leu-Leu позволяет лучше стабилизировать молекулу дипептида в жидкой фазе по сравнению с Ala-Ala и другими гидрофильными дипептидами.

4.1.2. Влияние pH подвижной фазы

Кислотность ПФ оказывает влияние на хроматографическое удерживание через влияние на состояние аналита, на состояние адсорбционных центров неподвижной фазы и на сольватирующую способность ПФ. Для ионогенных аналитов первые два фактора будут важнее

последнего. Дипептиды, обладая кислотной и основной группой (или группами), могут находиться в нескольких ионных состояниях. Для молекулы, обладающей одной кислотной и одной основной группами, таких состояний может быть четыре: катионное ($\text{H}_3\text{N}^+\text{-R-COOH}$), анионное ($\text{H}_2\text{N-R-COO}^-$), цвиттер-ионное ($\text{H}_3\text{N}^+\text{-R-COO}^-$), либо нейтральное ($\text{H}_2\text{N-R-COOH}$). Последняя форма присутствует в водных растворах в крайне незначительном количестве. В дальнейших расчётах её присутствием пренебрегали.

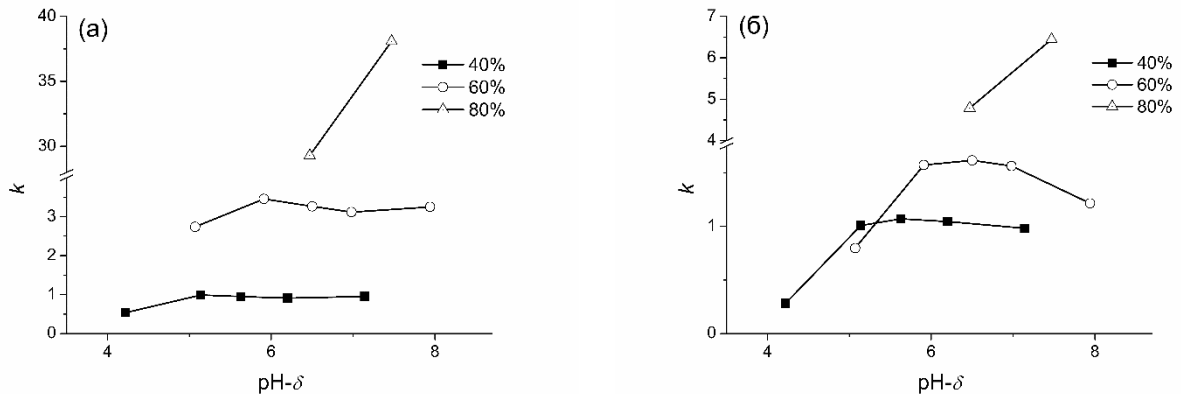


Рис. 4.2. Влияние pH и концентрации ацетонитрила в ПФ на удерживание D-Ala-D-Ala (а) и D-Leu-D-Leu (б) на колонке Nautilus-R. По шкале абсцисс отложено значение pH ПФ для данного водно-ацетонитрильного растворителя (см. раздел 2.3.1).

Единственный рассмотренный в данном исследовании дипептид с двумя кислотными группами, Gly-Asp, может существовать в растворах в виде 8 различных форм, имеющих заряд от -2 (полностью депротонированная частица) до $+1$ (протонированы амино- и обе карбоксильные группы). Депротонирование происходит в порядке от наиболее слабой кислотной формы к наиболее сильной: $\text{NH}_3^+ - \text{R}_1\text{COOH} - \text{R}_2\text{COOH} \rightarrow \text{NH}_3^+ - \text{R}_1\text{COO}^- - \text{R}_2\text{COOH} \rightarrow \text{NH}_3^+ - \text{R}_1\text{COO}^- - \text{R}_2\text{COO}^- \rightarrow \text{NH}_2 - \text{R}_1\text{COO}^- - \text{R}_2\text{COO}^-$. Существованием остальных ионных состояний пренебрегали из-за их низкой концентрации в исследуемом диапазоне pH. На рис. 4.3 показаны распределения различных ионных форм некоторых дипептидов в зависимости от pH среды, рассчитанные по уравнениям 1.36(а-в) для буферных растворов, содержащих 60% об. CH_3OH или CH_3CN . Аналогичные диаграммы для растворов, содержащих 40% об. органического компонента, не отличаются качественно от показанных на рис. 4.3, но положения кривых на них несколько сдвинуты, поскольку отличаются константы диссоциации ионогенных групп дипептидов. В расчётах использовали термодинамические величины pH (pH_s , см. раздел 2.3.1), но графики строили относительно кажущихся (измеренных) значений pH для удобства сравнения с кривыми k -pH. Концентрацию ионов водорода определяли из

значений pH_s с учётом коэффициента активности H^+ для данной буферной смеси, найденных по уравнению Дебая-Хюккеля в соответствии с рекомендациями [204]. Значения констант диссоциации в водно-органических растворителях, использованные в расчётах, приведены в табл. 4.5 и 4.6.

Фактор влияния состава ПФ на состояние адсорбционных центров (хиральных селекторов) объясняется тем, что МА имеют ионогенные группы. Для эремомицина это три аминных (одна вторичная и две первичных) и одна карбоксильная, для ристоцетина А – две аминных. Способ синтеза, использованный для получения ХНФ марки Nautilus [158], сохраняет аминокгруппы.

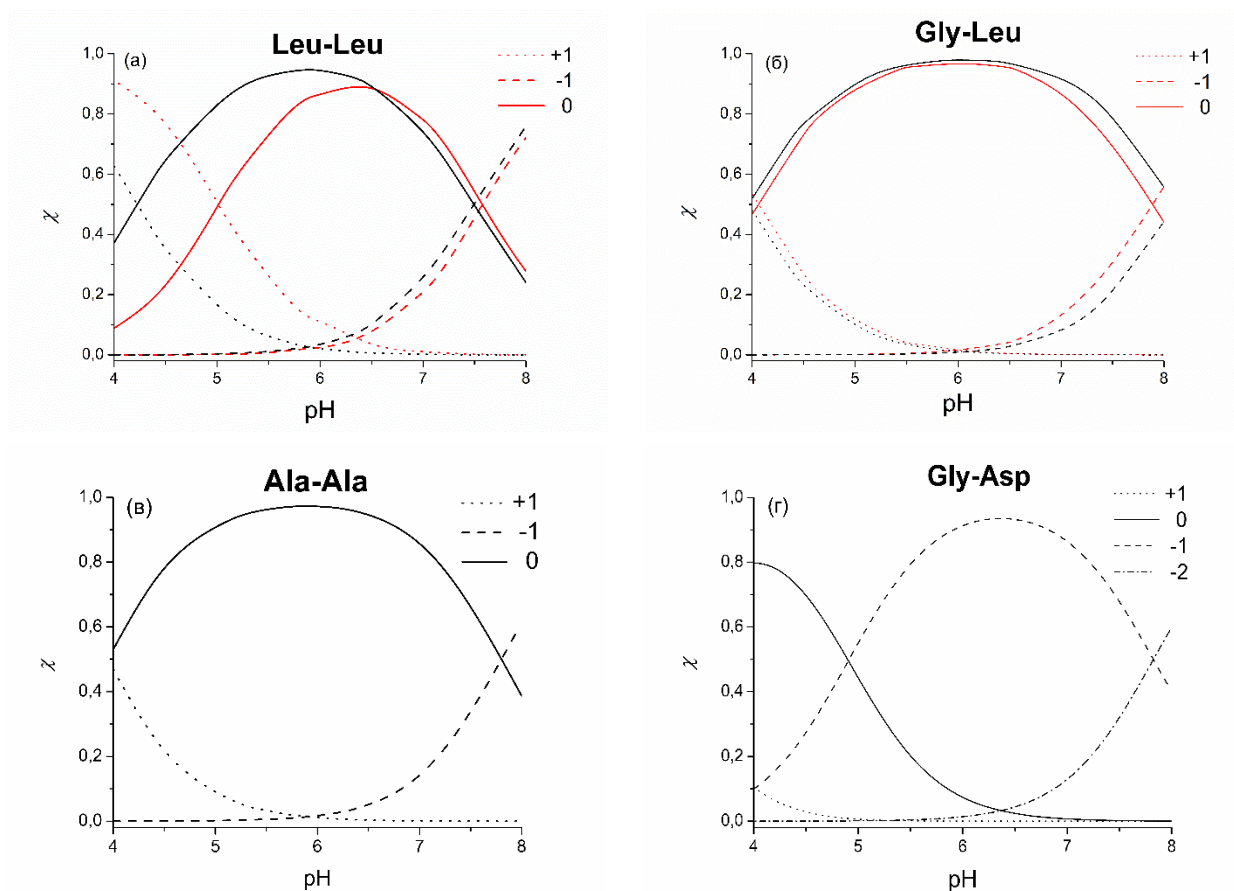


Рис. 4.3. Зависимость мольной доли (χ) различных ионных форм Leu-Leu (а), Gly-Leu (б), Ala-Ala (в) и Gly-Asp (г) от pH буферных растворов, содержащих 60% об. CH_3CN (красные линии) и 60% об. CH_3OH (черные линии). Сплошные линии соответствуют цвиттер-ионной форме, штриховая – анионной, пунктирная – катионной.

В исследованном диапазоне рН (4.2-7.5) карбоксильная группа эремомицина будет полностью диссоциирована ($pK = 2.9^1$); из аминных групп только наиболее слабая ($pK = 7.1$) частично будет депротонирована ближе к верхнему концу изученного диапазона рН. В случае ристоцетина А также можем ожидать изменения доли протонированной слабой аминокислотной группы ($pK = 7.0$) в нейтральной области. Таким образом, для обоих МА возможно слабое изменение ионного состояния при $pH > 6-7$.

Для удобства анализа экспериментальные данные, приведённые выше в табл. 4.1 и 4.4, представлены в графическом виде на рис. 4.5-4.8. Сравнение этих графиков и зависимостей $\chi(pH)$ показывает явную корреляцию между удерживанием и содержанием цвиттер-ионной формы. Это особенно хорошо видно, если сопоставить ход зависимостей $k(pH)$ и $\chi(pH)$ для нейтрального дипептида, например, Leu-Leu ($pI = 5.8$) и кислого дипептида Gly-Asp ($pI = 4.3$). Если у первого k возрастает при изменении рН от 4.4 до 5.3 параллельно с увеличением доли цвиттер-ионной формы и до рН 6.3, в диапазоне, где содержание цвиттер-ионов максимально, изменяется слабо, то у Gly-Asp наблюдается обратная зависимость: k в диапазоне рН от 4.4 до 5.3 находится на максимальном уровне, как и содержание цвиттер-ионов, и как только концентрация последних начинает заметно убывать, также падает по S-образной кривой (ПФ с 60% об. CH_3OH). Отметим также, что исследованный диапазон рН не превышал pI антибиотиков. То есть, привитые селекторы имели общий положительный или нулевой заряд. При этом удерживание дипептидов возрастало симбатно увеличению доли частиц анализата с зарядом ≤ 0 . Данное наблюдение не противоречит тому, что кулоновское притяжение разноимённо заряженных частиц способствует прочному связыванию, а цвиттер-ионы, будучи в целом нейтральными, не индуцируют отталкивания в поле положительного заряда.

Ситуация, в которой влияние рН ограничивается только контролем распределения ионных форм адсорбтива, описывается моделью ХММ (уравнение 1.33). Подгонка уравнения модели к экспериментальным данным (рис. 4.4) показывает, что она качественно соответствует наблюдаемым зависимостям, но не описывает полностью траекторию кривых $k(pH)$. Можно предположить, что так проявляется нарушение допущения модели ХММ о молекулярном характере адсорбции, поскольку связывание с участием ионогенных функциональных групп привитого селектора может протекать по механизму ионного обмена.

¹ Здесь и далее значения pK для антибиотиков указаны в водной среде. В исследованных водно-органических растворах значения pK кислотных групп будет несколько, на 0.3-0.6 ед., выше, а основных – несколько ниже. Принципиально это не изменит сделанные выводы.

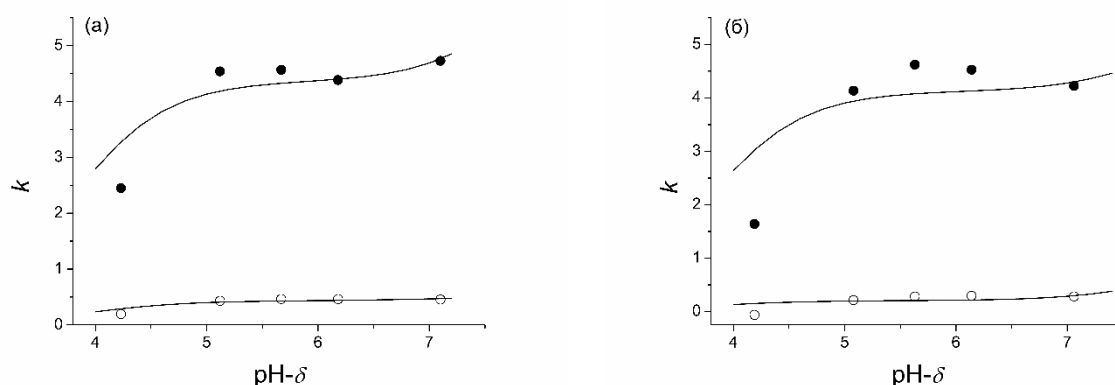


Рис. 4.4. Влияние pH на удерживание энантимеров Ala-Ala (а) и Leu-Leu (б) на колонке Nautilus-R (точки). Линии – наилучшее приближение модели ХММ. ПФ: ацетатный буферный раствор в 60% об. CH₃OH.

Таблица 4.5

Константы диссоциации дипептидов в растворителе вода-метанол*

Дипептид	pK ₁	pK ₂	pK ₃
	40% об. CH₃OH		
L-Leu-L-Leu	3.78	7.31	
Gly-L-Asp	2.40	4.53	7.90
L-Ala-L-Ala	3.50**	7.61**	
Gly-L-Leu	3.59	7.98	
L-Leu-Gly	3.55	7.82	
60% об. CH₃OH			
L-Leu-L-Leu	4.00	7.13	
Gly-L-Asp	2.65	4.74	7.65
L-Ala-L-Ala	3.72**	7.43**	
Gly-L-Leu	3.74	7.73	
L-Leu-Gly	3.70	7.54	
80% об. CH₃OH			
L-Leu-L-Leu	4.48	7.05	
Gly-L-Asp	2.90	5.06	7.43

* Значения получены методом потенциометрического титрования А.В. Васяниным (Пермский государственный национальный исследовательский университет) за исключением L-Ala-L-Ala**.

** Приблизительная оценка, полученная по значению pK в воде ($pK_{Ala-Ala}^{H_2O}$) и значениям pK для Leu-Leu, допуская справедливым приближённое равенство $pK_{Ala-Ala}^S - pK_{Ala-Ala}^{H_2O} \approx pK_{Leu-Leu}^S - pK_{Leu-Leu}^{H_2O}$, где верхний индекс S символизирует водно-метанольный растворитель.

Тогда фактор удерживания будет зависеть не только от кислотности среды, но и от концентрации противоиона, которая меняется с изменением рН. В то же время, указанная модель хорошо описывала графики $k - \text{pH}$ для дипептидов на колонке Chirobiotic R [98]. Это обстоятельство подтверждает наше предположение о поведении ионогенных групп селектора Nautilus-R как причины отклонения экспериментальных данных от модели ХММ. Действительно, отличная от Nautilus-R методика синтеза Chirobiotic R приводит к потере, как минимум, одной аминогруппы, поэтому на этой ХНФ будет, как минимум, на один потенциальный центр ионного обмена меньше, чем на Nautilus-R. Не исключено, что ристоцетин А в составе Chirobiotic R теряет все центры ионного обмена. Поэтому на этой ХНФ более вероятен чистый механизм молекулярной адсорбции. Подробное обсуждение отличий двух указанных ХНФ будет дано в разделе 4.1.4.

Таблица 4.6

Константы диссоциации дипептидов в водно-ацетонитрильных растворах*

Дипептид	pK_1	pK_2
	40% об. CH₃CN	
Leu-Leu	4.16	7.58
Gly-Leu	3.77	8.16
	60% об. CH₃CN	
Leu-Leu	4.97**	7.41**
Gly-Leu	4.45**	8.15**

* Значения получены методом потенциометрического титрования А.В. Васяниным (Пермский государственный национальный исследовательский университет).

** Рассчитаны по уравнению Ясуды-Шидловского [205] на основании данных, полученных методом потенциометрического титрования.

Графики удерживания как функции рН ПФ на ХНФ Nautilus-E с привитым антибиотиком эремомицином (рис. 4.5) напоминают таковые для ристоцетиновой неподвижной фазы (рис. 4.6), однако имеется отличие. На Nautilus-E фактор удерживания сильнее удерживаемых энантиомеров (с D-аминокислотой на C-конце) нейтральных дипептидов заметно увеличивается после рН 6.3, и это увеличение совпадает с увеличением доли дипептид-аниона. На Nautilus-R он либо слабо уменьшается, либо не изменяется. Для кислого дипептида Gly-Asp зависимости k от рН на этих двух ХНФ имеют одинаковую форму, но отличаются по абсолютной величине фактора удерживания. Можно предположить, что это отличие связано с различием числа аминогрупп у ристоцетина А и эремомицина, поскольку в диапазоне рН, где оно наблюдается, как раз начинается депротонирование слабых аминогрупп. А вот наличие карбоксильной группы у эремомицина (у ристоцетина А эта группа метилирована), по-видимому, не играет отдельной роли, поскольку в области значений рН, где должна активно

осуществляться адсорбция катионов, принципиальных различий между эремомициновой и ристоцетиновой ХНФ не обнаружено.

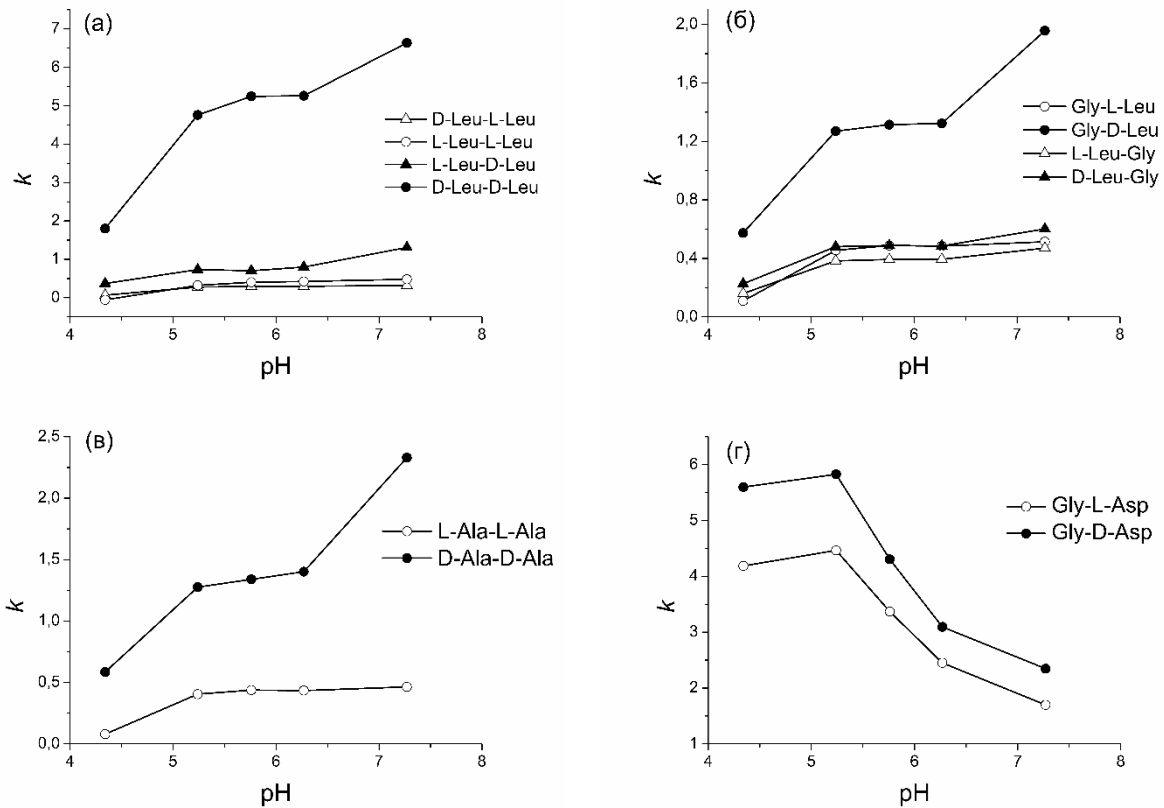


Рис. 4.5. Влияние pH на удерживание дипептидов на ХНФ Nautilus-E.

ПФ: ацетатный буферный раствор в 60% об. CH_3OH . $T = 25^\circ\text{C}$. (а) Leu-Leu, (б) Leu-Gly и Gly-Leu, (в) Ala-Ala, (г) Gly-Asp. Закрашенные символы соответствуют D-, LD- и DD-энантиомерам, пустые – L-, DL- и LL-конфигурациям.

Показательны результаты, полученные с позиционными изомерами Gly-Leu и Leu-Gly. Как уже отмечалось, энантиомеры Leu-Gly почти не разделяются на обоих рассмотренных колонках. Кроме того, они слабо удерживаются – это общее свойство для дипептидов без D-аминокислоты в C-концевом положении. При этом удерживание Gly-L-Leu почти не отличается от такового L/D-Leu-Gly (рис. 4.5б и 4.6б). Логично предположить, что Gly-L-Leu и оба энантиомера Leu-Gly образуют с селектором похожие (непрочные) структуры адсорбционных комплексов. Отсутствие энантиоселективности МА по отношению к Leu-Gly, по-видимому, объясняется удалённостью карбоксильной группы от хирального центра. Вильямс с соавт. подчёркивал важность алкильного остатка (в правильной стереоконфигурации) у хирального C-концевого α атома углерода для образования прочного комплекса. У D-аминокислот такой остаток направлен в сторону гидрофобной стенки хирального «кармана», стабилизируя конфигурацию связывания за счёт дисперсионных взаимодействий с атомами стенки [35].

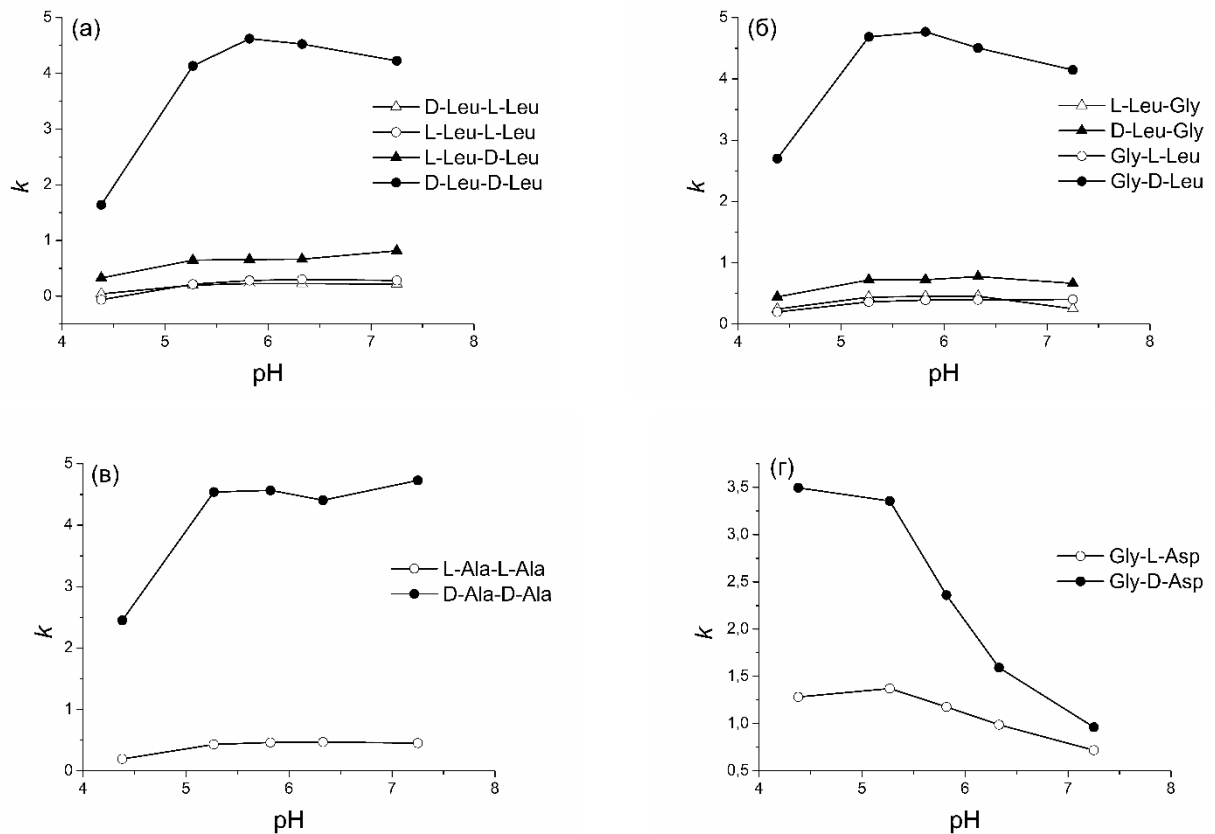


Рис. 4.6. Влияние pH на удерживание дипептидов на ХНФ Nautilus-R.

ПФ: ацетатный буферный раствор в 60% об. CH_3OH . $T = 25^\circ\text{C}$. (а) Leu-Leu, (б) Leu-Gly и Gly-Leu, (в) Ala-Ala, (г) Gly-Asp. Закрашенные символы соответствуют D-, LD- и DD-энантиомерам, пустые – L-, DL- и LL-конфигурациям.

Замена метанола на ацетонитрил для ПФ, содержащих 40 и 60% об. органического растворителя, уменьшает время выхода дипептидов, но не влияет на вид зависимостей $k(\text{pH})$. Как показано на рис. 4.7 и 4.8 на примере нескольких энантиомерных пар, соответствующие кривые изменяются симбатно. При дальнейшем увеличении содержания ацетонитрила, удерживание резко возросло и при значениях $\text{pH} > 6$ большинство дипептидов не элюировалось из колонки (Nautilus-R) за разумные промежутки времени. Как отмечалось в предыдущем разделе, это объясняется тем, что апротонный ацетонитрил плохо сольватирует цвиттер-ионы, и при недостатке в ПФ воды дипептиды «выталкиваются» на поверхность адсорбента. Рост вклада в удерживание ахирального фактора «высаливания» ведёт к существенной потере энантиоселективности. Например, величина α для пары D-Ala-D-Ala/L-Ala-L-Ala при замене метанола на ацетонитрил в ПФ, содержащей 80% об. органического растворителя, уменьшается приблизительно в 5 раз. По-видимому, дальнейшее увеличение концентрации ацетонитрила приведёт к трансформации режима хроматографии от адсорбционного к осадительному с полной потерей энантиоселективности.

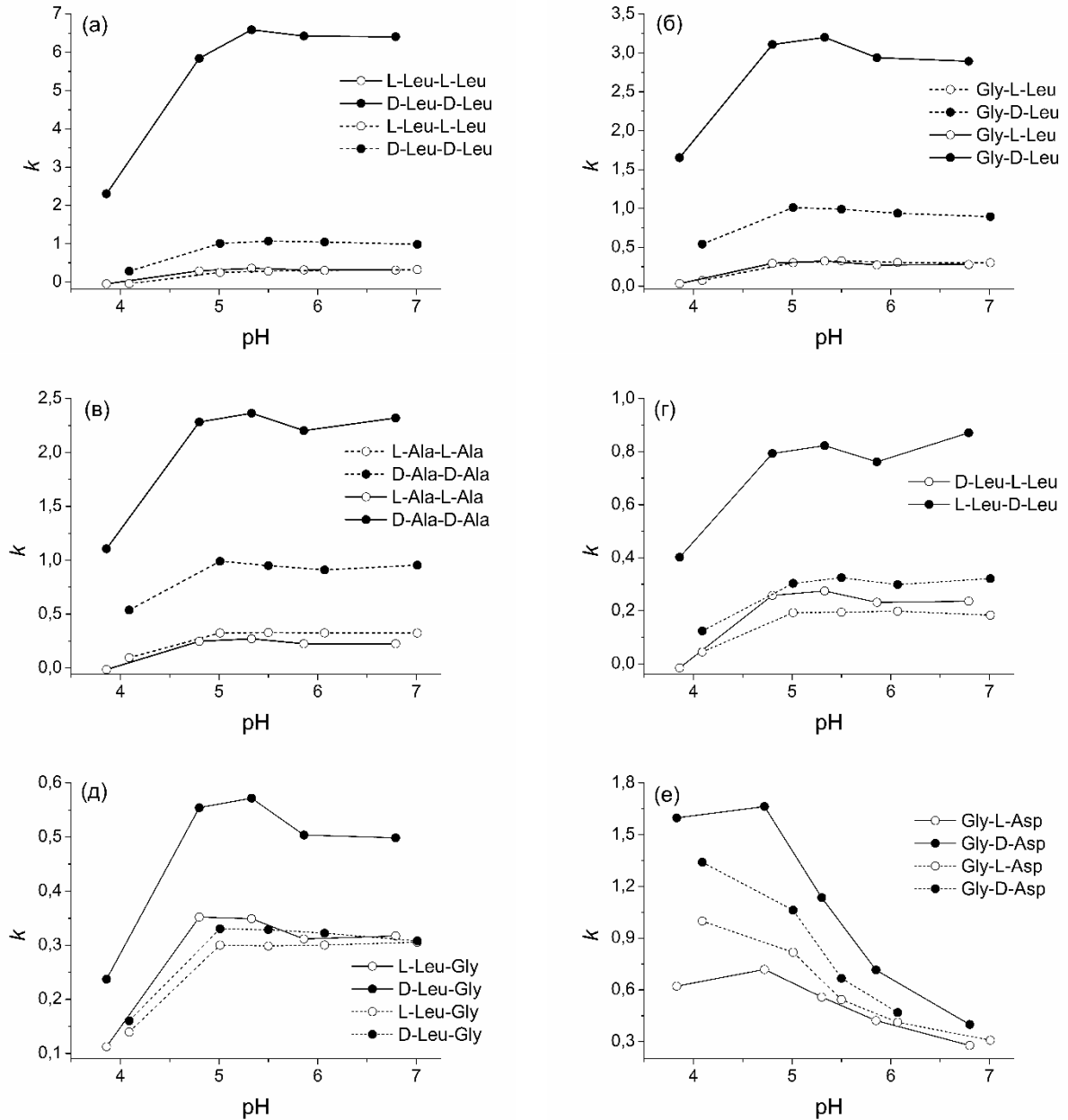


Рис. 4.7. Влияние pH на удерживание дипептидов на ХНФ Nautilus-R. ПФ: ацетатный буферный раствор в 40% об. CH_3OH (сплошные линии), ацетатный буферный раствор в 40% об. CH_3CN (прерывистые). $T = 25^\circ\text{C}$. (а) DD/LL-Leu-Leu; (б) Gly-Leu, (в) Ala-Ala, (г) LD/DL-Leu-Leu, (д) Leu-Gly, (е) Gly-Asp. Закрашенные символы принадлежат D-, LD- и DD-энантиомерам, пустые – L-, DL- и LL-конфигурациям.

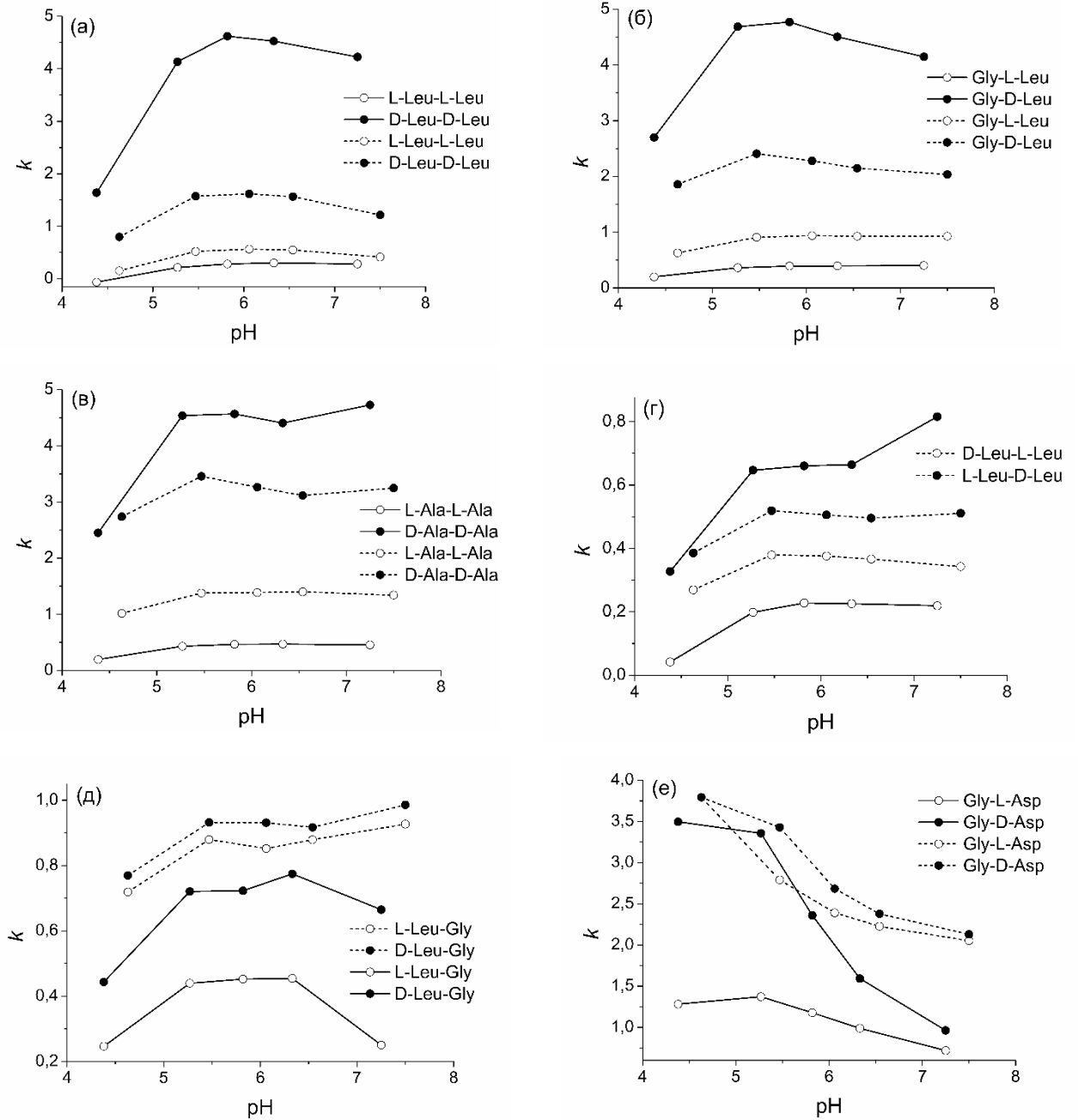


Рис. 4.8. Влияние рН на удерживание дипептидов на ХНФ Nautilus-R. ПФ: ацетатный буферный раствор в 60% об. CH_3OH (сплошные линии), ацетатный буферный раствор в 60% об. CH_3CN (прерывистые). $T = 25^\circ\text{C}$. (а) DD/LL-Leu-Leu; (б) Gly-Leu, (в) Ala-Ala, (г) LD/DL-Leu-Leu, (д) Leu-Gly, (е) Gly-Asp. Закрашенные символы принадлежат D-, LD- и DD-энантиомерам, пустые – L-, DL- и LL-конфигурациям.

4.1.3. Влияние индифферентного электролита

Выше отмечалась возможность реализации в колонке механизма ионного обмена. Удивительно, но эта очевидная гипотеза почти не обсуждалась применительно к антибиотиковым ХНФ. Заряды на ионогенных функциональных группах МА рассматривались как источники электростатических взаимодействий, но не предполагалось, что эти заряды связаны с противоионами, которые необходимо заместить для осуществления акта адсорбции [11; 45; 46; 147; 151]. Кавацинни и др., указывая на то, что привитый тейкоплинин является катионообменником и описывая адсорбцию катионов аммония – модификаторов ПФ – на таком адсорбенте в рамках доннановского равновесия, в то же самое время адсорбцию аналита представляли как молекулярную адсорбцию, подчиняющуюся простой схеме $Z_{(ж)} \rightleftharpoons Z_{(тв)}$ [51]. По-видимому, впервые возможность ионообменной адсорбции на антибиотиковых неподвижных фазах была упомянута в работе Кузнецова и др. [160] и позже обсуждалась в работе [114]. Для проверки этой гипотезы необходимо исследовать зависимость фактора удерживания от концентрации индифферентного электролита, т.е. электролита, не влияющего на рН ПФ. В качестве такого электролита был выбран хлорид натрия. Эксперименты выполнялись на колонке Nautilus-E. В качестве ПФ использовали два элюента, содержащие 60% об. CH_3OH , с крайними значениями исследуемого диапазона рН 4.5 и 7.2. При увеличении C_{NaCl} значение рН уменьшалось: в кислой ПФ от 4.5 (без NaCl) до 3.9 ($C_{\text{NaCl}} = 1 \text{ M}$), в нейтральной ПФ от 7.2 (без NaCl) до 6.9 ($C_{\text{NaCl}} = 1 \text{ M}$). Это объясняется солевым эффектом, связанным с зависимостью коэффициентов активности ионов от ионной силы раствора [206].

В случае ионообменного механизма адсорбции зависимости k от обратной концентрации противоиона должны быть линейны (см. раздел 1.2.5). Поскольку $C_{\text{NaCl}} = C_{\text{Na}^+} = C_{\text{Cl}^-}$, то независимо от того, является ли адсорбент в данных условиях анионо или катионообменником, в качестве независимой переменной можно использовать концентрацию хлорида натрия. Впрочем, исходя из вышеприведённого обсуждения, логично предположить, что противоионом должен выступать анион. Рис. 4.9 (а и б) показывают отсутствие линейной зависимости. Причём степень нелинейности слишком сильная, чтобы её можно было объяснить солевым эффектом. Очевидно, в исследованных системах не наблюдается чистого ионообменного механизма удерживания. В то же время, фактор удерживания заметно уменьшается (не всегда монотонно) с ростом концентрации NaCl (рис. 4.10), указывая на то, что какой-то из ионов играет роль десорбента. Таким образом, механизм удерживания дипептидов является смешанным: часть вещества адсорбируется по механизму молекулярной адсорбции, а часть – по механизму ионного обмена.

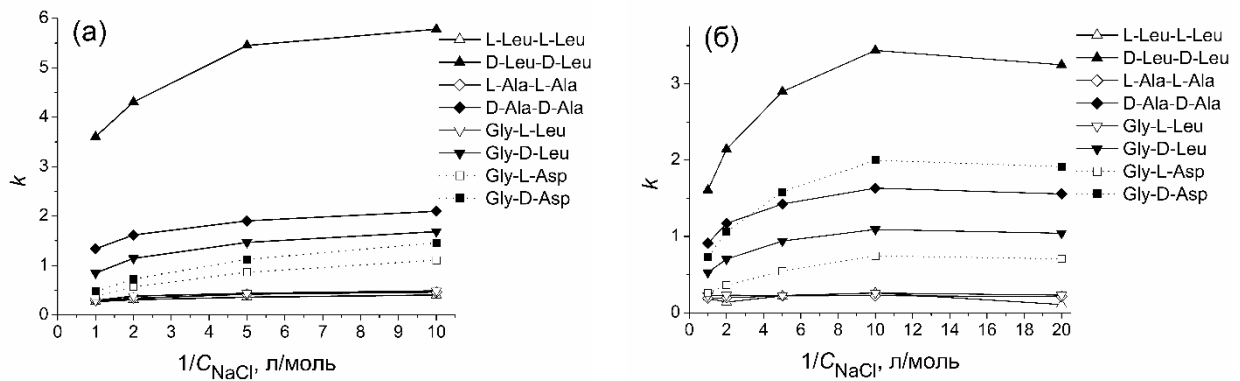


Рис. 4.9. Влияние индифферентного электролита на удерживание некоторых дипептидов на колонке Nautilus-E в ПФ с pH = 7.2 (а) и pH = 4.5 (б). По шкале абсцисс отложена обратная концентрация NaCl.

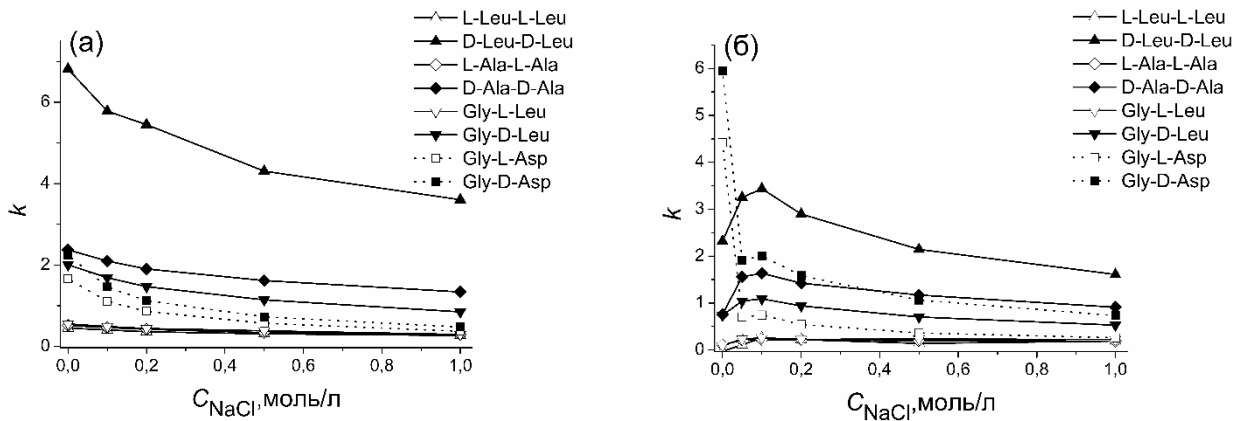


Рис. 4.10. Влияние индифферентного электролита на удерживание некоторых дипептидов на колонке Nautilus-E в ПФ с pH = 7.2 (а) и pH = 4.5 (б). По шкале абсцисс отложена концентрация NaCl.

На графиках, представленных в координатах $k - C_{NaCl}$ (рис. 4.10), видно, что в нейтральной среде уменьшение фактора удерживания происходит монотонно, тогда как в кислой среде – нет. В последнем случае увеличение концентрации NaCl до 0.1 М приводит к некоторому возрастанию k для нейтральных дипептидов. В случае кислого дипептида Gly-Asp первое добавление соли, до 0.05 М, приводит к резкому падению фактора удерживания, после чего происходит его медленное монотонное уменьшение. Причины такого поведения не понятны, но стоит обратить внимание на следующие соображения. В нейтральной ПФ нейтральные дипептиды в основном существуют в форме цвиттер-ионов и небольшого количества анионов, а Gly-Asp – в форме катион-дианиона и дианиона. При сдвиге pH в кислую

сторону нейтральные дипептиды представлены цвиттер-ионами и катионами, а Gly-Asp – цвиттер-ионами и небольшим количеством катионов. Возможно, изменение ионного состава дипептидов приводит к особенностям графиков, наблюдаемым на рис. 4.10б.

4.1.4. Сравнение хиральных неподвижных фаз Nautilus-R и Chirobiotic R

Метод иммобилизации хирального селектора на носителе (силикагеле) может влиять на конформацию и ионное состояние закрепленного селектора, что в свою очередь может сказываться на адсорбционных свойствах ХНФ. Тот факт, что группа Староверова использовала эпокси-метод иммобилизации антибиотика ристоцетина А для получения ХНФ Nautilus R [158], тогда как группа Армстронга использовала изоцианатный метод для получения ристоцетиновой ХНФ Chirobiotic R [153] (см. рис. 4.11), позволил изучить влияние способа прививки на свойства антибиотиковых ХНФ. По методу Староверова и др. молекула антибиотика реагирует с эпоксидированным силикагелем через одну из двух своих аминных групп. В результате этой реакции аминная группа из первичной становится вторичной, то есть сохраняет основные свойства. В изоцианатном методе антибиотик реагирует с изоцианатоалкилтриалкоксисиланом, а продукт этой реакции взаимодействует с силикагелем через силановый остаток. На первом этапе NH_2 -группа антибиотика реагирует с изоцианатной группой, образуя уреидную связь с органосилановым линкером и таким образом, теряет основные свойства аминной группы. Не исключено, что обе аминные группы ристоцетина А вступят в эту реакцию; такая привитая частица будет нейтральной. Возможно, в процессе синтеза образуется смесь моноосновной однозамещенной и нейтральной двухзамещенной частиц. В любом случае хиральный селектор Nautilus-R будет отличаться от селектора Chirobiotic R более высоким зарядом (в ионизирующих условиях) и строением линкерного фрагмента.

В табл. 4.7 представлены данные по удерживанию, энантиоразделению и эффективности, выраженной числом теоретических тарелок N^1 , для двух обсуждаемых ХНФ при элюировании смесями вода-метанол разного состава. Как обсуждалось выше (см. раздел 4.1.1.) удерживание дипептидов обратно коррелирует с их сольватируемостью подвижными фазами. Гидрофильные дипептиды быстрее элюируются с ПФ с высоким содержанием воды, а липофильные дипептиды – с ПФ с высоким содержанием метанола. Такое поведение наблюдалось на обеих колонках. Однако величины факторов удерживания заметно отличались. На колонке Nautilus-R удерживание в целом было выше, чем на Chirobiotic R. Особенно это заметно для сильнее

¹ $N = 5.545(t_R/w_{0.5})^2$, где t_R – время выхода пика, а $w_{0.5}$ – ширина пика на половине высоты пика.

удерживаемых DD-энантиомеров (например *k* для D-Ala-D-Ala в 90% об. MeOH составлял 10.7 для колонки Chirobiotic-R и 55.2 для Nautilus R). Энантиоселективность отечественной колонки также была выше для всех исследуемых составов ПФ, например в одинаковых условиях энантиомерная пара Leu-Leu разделялась с фактором разделения 1.55 на Chirobiotic R и 16.20 на Nautilus-R. В то же время эффективность отечественной колонки была ниже для второго элюируемого энантиомера для всех дипептидов, что видно по более низкому числу теоретических тарелок.

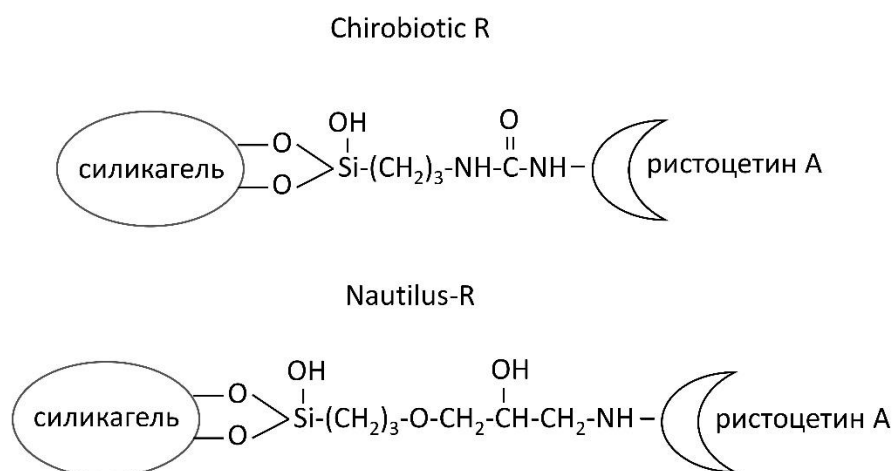


Рис. 4.11. Схема прививки ристоцетина А к силикагелю для ХНФ Chirobiotic R и Nautilus-R.

Таким образом, более сильное удерживание на ХНФ Nautilus-R сочетается с более медленной кинетикой образования адсорбционного комплекса. Это легко объяснимо и согласуется с представлениями Вильямса и др. [146], согласно которым образование прочного комплекса происходит в две стадии. На первой положительно заряженная аминогруппа ристоцетина А координирует вблизи хирального «кармана» молекулу дипептида за счёт кулоновского взаимодействия с его карбоксильной группой. На второй стадии происходит конформационное изменение в структуре хирального «кармана», которое позволяют молекуле дипептида занять в нём наиболее оптимальное для прочного связывания положение. Этот процесс, сочетающий структурные изменения и микромиграцию молекулы дипептида по селектору, является медленным. Если, как мы полагаем, в селекторе Chirobiotic R отсутствует положительно заряженный атом азота вблизи хирального «кармана», то такой процесс длительной стерической подгонки становится невозможен, адсорбция будет быстрой, но не прочной.

Таблица 4.7

Удерживание и разделение энантиомеров дипептидов на колонках Nautilus-R и Chirobiotic R из водно-метанольных смесей

MeOH, % об.	$k(LL)^*$	$k(DD)^{**}$	α	$N(LL)^*$	$N(DD)^{**}$	$k(LL)^*$	$k(DD)^*$	α	$N(LL)^{**}$	$N(DD)^{**}$
	Nautilus-R					Chirobiotic R				
Ala-Ala										
0	0.16	0.87	5.57	1802	1041	0.33	0.53	1.58	1542	5821
10	0.17	1.35	7.81	1952	1016	0.31	0.63	2.05	2353	5244
30	0.30	2.68	9.01	4685	950	0.36	0.81	2.24	6345	3721
40	0.38	3.76	9.91	4039	1329	0.38	1.07	2.79	5634	3039
60	0.67	8.04	12.08	2665	1007	0.63	1.86	2.93	3897	1859
80	1.61	25.23	15.66	1687	549	1.23	5.48	4.45	3598	1547
90	3.04	55.19	18.14	1153	611	1.74	10.74	6.16	3099	660
Gly-Leu										
0	0.44	1.45	3.27	2775	1583	1.05	1.33	1.27	2365	2322
10	0.33	2.02	6.19	4146	1441	0.51	0.84	1.65	5500	4285
30	0.37	3.32	8.94	3665	1057	0.39	0.93	2.37	6000	3118
40	0.41	4.36	10.70	3535	819	0.35	0.95	2.73	4893	2376
60	0.55	7.27	13.19	3031	-	0.42	1.31	3.10	5023	1845
80	1.06	17.41	16.42	1855	369	0.67	2.45	3.67	4184	999
90	1.86	-	-	1085	-	0.93	3.95	4.27	1684	451

MeOH, % об.	$k(LL)^*$	$k(DD)^{**}$	α	$N(LL)^*$	$N(DD)^{**}$	$k(LL)^*$	$k(DD)^*$	α	$N(LL)^{**}$	$N(DD)^{**}$
	Nautilus-R					Chirobiotic R				
Leu-Gly										
0	0.48	0.61	1.27	2626	2394	1.10	1.13	1.03	2723	2955
10	0.38	0.54	1.44	3928	3098	0.54	0.54	1.00	5653	5681
30	0.39	0.61	1.59	3296	2378	-	-	-	-	
40	0.49	0.77	1.59	3314	2423	0.42	0.41	0.98	5176	5139
60	0.64	1.04	1.62	2781	1875	0.46	0.42	0.92	4792	5025
80	1.20	1.94	1.61	2015	1204	0.67	0.62	0.92	4421	4571
90	2.07	3.29	1.59	1445	840	0.92	0.86	0.93	2085	1204
Leu-Leu										
0	1.14	11.53	10.10	639	321	5.20	5.91	1.14	516	557
10	0.61	11.28	18.46	2189	587	1.26	1.82	1.45	2316	1713
30	0.51	11.16	21.97	2875	418	0.64	1.11	1.75	3739	1966
40	0.51	11.25	22.11	2248	405	0.54	0.89	1.67	3969	2081
60	0.40	7.74	19.39	2817	381	0.34	0.60	1.79	4089	2566
80	0.40	6.70	16.61	2132	314	0.26	0.45	1.73	3332	3409
90	0.49	7.87	16.20	1764	262	0.30	0.46	1.55	2062	1911

* LL для Ala-Ala, Leu-Leu, L для Gly-Leu, Leu-Gly;

** DD для Ala-Ala, Leu-Leu, D для Gly-Leu, Leu-Gly.

4.2. Термодинамика адсорбции дипептидов на неподвижных фазах Nautilus-E и Nautilus-R

4.2.1. Колонка Nautilus-E

В табл. 4.8 представлены термодинамические характеристики адсорбции дипептидов на колонке с привитым эремомицином для разных значений pH ПФ и содержания метанола в ПФ 60 и 80% об. В целом значения стандартных энтальпий и энтропий адсорбции невелики. Энтальпийный вклад в энергию адсорбции сравним с энтропийным для большинства дипептидов. Однако в случае энантиомеров Gly-Asp удерживание было явно энтальпийно контролируемым для всех составов ПФ, причём сильнее это проявлялось в ПФ с большим содержанием метанола. Величина теплового эффекта адсорбции глициласпарагиновой кислоты сравнима с таковым других дипептидов; существенное превалирование энтальпийного вклада объясняется относительно низкими значениями энтропии.

Увеличение pH ведёт к уменьшению теплового эффекта адсорбции для нейтральных дипептидов в ПФ с 60% об. CH_3OH и увеличению для кислого Gly-Asp (в обеих рассмотренных ПФ). Такие противоположно направленные тренды в очередной раз подтверждают важность распределения ионных форм, которые отличаются для нейтральных и кислых дипептидов. Обращает на себя внимание, что доля анионной формы для нейтральных дипептидов падает с заметных 20-30% при $\text{pH} = 4.4$ до почти нуля при $\text{pH} = 7.3$, тогда как для Gly-Asp доля анионов возрастает от 20 до 90% (см. рис. 4.2). При этом доля цвиттер-ионов для нейтральных дипептидов по краям указанного интервала pH примерно одинакова. Можно предположить, что анионная форма вносит значимый вклад в экзотермичность адсорбции дипептидов при данном соотношении воды и метанола.

Ситуация меняется, когда содержание метанола в ПФ увеличивается до 80% об. Тогда тепловой эффект для сильно удерживаемых нейтральных дипептидов, D-Ala-D-Ala, D-Leu-D-Leu и Gly-D-Leu, увеличивается с ростом pH, как и для Gly-Asp. Наиболее вероятным объяснением влияния концентрации метанола является изменение сольватирующей способности элюента. Как показано в работе [50], переход от 60 к 80% об. сопровождается заметными изменениями в сольватирующей способности водно-метанольных смесей, следовательно можно ожидать заметных изменений во влиянии этого параметра на термодинамику адсорбции. То, что этот эффект оказывается pH-чувствительным, не удивительно, поскольку pH влияет на распределение ионных форм дипептидов, а разные ионные формы могут сольватироваться по-разному. Другими факторами может быть влияние состава растворителя на диссоциацию ионогенных групп как дипептидов, так и хиральных селекторов, а также на десорбирующую силу элюента. Однако это будут факторы второго

порядка. Действительно, как следует из табл. 4.5, различие в значениях pK дипептидов между 60 и 80% об. CH_3OH не превышает 0.5 ед. Такой сдвиг pK не приведёт к кардинальному изменению в распределении ионных форм. Что касается десорбирующей способности, как было показано выше, существенные изменения начинают проявляться при $\varphi > 90\%$ об.

Не для всех дипептидов эффект, вызванный изменением содержания метанола в ПФ, одинаков. Например, для L-Leu-D-Leu $\Delta\bar{H}^0$ уменьшается с ростом pH и для 60 и для 80% об. метанола. Такое поведение тоже не должно вызывать удивления. Влияние состава ПФ является, как отмечалось в предыдущем абзаце, многофакторным явлением. И хотя тип зависимости должен определяться наиболее сильным фактором, при определённом их сочетании могут наблюдаться отклонения от общего тренда.

В табл. 4.9 приведены разностные характеристики адсорбции, определяющие в соответствии с уравнениями (1.50) и (1.51) энантиоселективность ХНФ. Мы видим, что в отличие от удерживания, разделение энантиомеров в большинстве случаев определяется энтропийным фактором, то есть, структурными эффектами. Как будет отмечено далее, такое поведение кардинально отличается от ситуации, наблюдаемой на колонке Nautilus-R. Единственной энантиомерной парой, для которой разделение осуществляется под энтальпийным контролем при любых условиях, то есть определяется различием в энергиях взаимодействия адсорбат-адсорбент, является пара DD/LL-Leu-Leu. Именно для этой пары на эремомициновой колонке наблюдается самый высокий фактор разделения.

4.2.2. Колонка Nautilus-R

Термодинамические данные для указанной колонки и ПФ на основе бинарного растворителя вода-метанол приведены в табл. 4.8, где их можно сравнить с аналогичными результатами, полученными на колонке Nautilus-E. Как видно, адсорбция была экзотермической для большинства дипептидов. При этом тепловой эффект адсорбции был выше такового для эремомициновой колонки. Если в последнем случае величина $|\Delta\bar{H}^0|$ редко превышала 15 кДж/моль, то для Nautilus-R эта величина за небольшим числом исключений находилась в диапазоне 10-30 кДж/моль. Отметим, что необычно высокие значения энтальпии и энтропии адсорбции для D-Leu-L-Leu в 60% об. CH_3OH , скорее всего, объясняются погрешностями регрессионного анализа. Этот стереоизомер почти не удерживался на колонке ($k = 0.01 - 0.06$), соответственно температурная зависимость k была очень слабой, а оценка её параметров подвержена влиянию случайных погрешностей.

Таблица 4.8

Термодинамические характеристики адсорбции дипептидов на колонке Nautilus-E и Nautilus-R в зависимости от pH при разных концентрациях метанола

pH	Nautilus-E						Nautilus-R					
	$\Delta\bar{H}^0$, kJ/mol		$T\Delta\bar{S}^{0*}$, kJ/mol		$\Delta\bar{G}^0$, kJ/mol		$\Delta\bar{H}^0$, kJ/mol		$T\Delta\bar{S}^{0*}$, kJ/mol		$\Delta\bar{G}^0$, kJ/mol	
MeOH, % об.	60% / 80%		60% / 80%		60% / 80%		60% / 80%		60% / 80%		60% / 80%	
D-Leu-L-Leu												
4.36/4.94	-19.41	-7.20	-25.24	-10.22	5.83	3.02	-56.27	-4.72	-63.40	-8.22	7.14	3.49
5.80/6.34	-8.94	-5.42	-11.02	-6.57	2.08	1.14	-17.03	-8.50	-19.75	-10.24	2.72	1.74
7.28/7.73	-7.33	-12.71	-9.19	-14.09	1.86	1.37	-11.46	-15.59	-14.85	-17.61	3.38	2.02
L-Leu-L-Leu												
4.36/4.94	-	-	-	-	-	-	-	-4.08	-	-11.00	-	6.92
5.80/6.34	-7.58	-4.22	-8.85	-4.92	1.27	0.70	-12.86	-8.67	-14.99	-10.41	2.14	1.74
7.28/7.73	-7.80	-10.19	-8.73	-11.21	0.93	1.02	-21.44	-24.55	-24.16	-27.01	2.72	2.46
L-Leu-D-Leu												
4.36/4.94	-11.98	-2.53	-13.42	-3.01	1.45	0.48	-29.93	-14.91	-31.55	-15.31	1.62	0.39
5.80/6.34	-7.99	-1.93	-7.63	-1.10	-0.36	-0.83	-18.41	-12.74	-18.56	-12.29	0.15	-0.44
7.28/7.73	0.68	-1.28	2.42	0.92	-1.74	-2.20	-17.84	-14.51	-17.40	-13.60	-0.44	-0.90
D-Leu-D-Leu												
4.36/4.94	-12.53	-5.79	-9.92	-2.67	-2.60	-3.13	-31.34	-24.53	-29.52	-22.40	-1.82	-2.12
5.80/6.34	-14.03	-10.37	-8.93	-5.17	-5.10	-5.20	-30.39	-26.15	-26.24	-22.24	-4.14	-3.91
7.28/7.73	-12.39	-17.26	-6.64	-12.20	-5.76	-5.07	-36.32	-33.05	-32.28	-30.03	-4.04	-3.02
L-Ala-L-Ala												
4.36/4.94	-7.14	-3.17	-12.34	-4.38	5.20	1.21	-10.62	-10.72	-15.13	-11.09	4.51	0.37
5.80/6.34	-5.72	-5.15	-6.69	-4.17	0.97	-0.99	-17.87	-11.38	-17.74	-10.12	-0.13	-1.27
7.28/7.73	-5.73	-11.26	-6.61	-10.59	0.88	-0.68	-15.37	-18.00	-16.40	-17.40	1.03	-0.61
D-Ala-D-Ala												
4.36/4.94	-5.71	-2.99	-5.95	-0.60	0.24	-2.40	-25.01	-22.33	-21.93	-16.27	-3.08	-6.06
5.80/6.34	-6.26	-4.58	-4.47	-0.70	-1.79	-3.89	-31.71	-23.57	-27.21	-16.61	-4.50	-6.97
7.28/7.73	-2.88	-10.90	0.21	-5.93	-3.09	-4.97	-23.13	-24.78	-18.45	-18.00	-4.68	-6.78

pH	Nautilus-E						Nautilus-R					
	$\Delta\bar{H}^0$, kJ/mol		$T\Delta\bar{S}^0$, kJ/mol		$\Delta\bar{G}^0$, kJ/mol		$\Delta\bar{H}^0$, kJ/mol		$T\Delta\bar{S}^0$, kJ/mol		$\Delta\bar{G}^0$, kJ/mol	
MeOH, % об.	60% / 80%		60% / 80%		60% / 80%		60% / 80%		60% / 80%		60% / 80%	
Gly-L-Leu												
4.36/4.94	-12.04	-3.61	-16.19	-4.80	4.15	1.19	0.43	-9.24	-2.94	-10.72	3.37	1.48
5.80/6.34	-7.05	-5.68	-7.81	-4.84	0.76	-0.84	-11.01	-8.90	-12.13	-8.56	1.12	-0.34
7.28/7.73	-6.95	-10.82	-7.64	-10.25	0.70	-0.57	-12.40	-16.03	-13.73	-16.04	1.33	0.02
Gly-D-Leu												
4.36/4.94	-10.70	-4.31	-11.05	-2.42	0.35	-1.89	-29.21	-24.65	-25.77	-18.91	-3.44	-5.74
5.80/6.34	-8.44	-5.23	-6.73	-1.96	-1.71	-3.28	-29.13	-25.97	-24.27	-19.52	-4.86	-6.45
7.28/7.73	-3.92	-8.34	-1.28	-4.26	-2.64	-4.08	-30.89	-32.59	-26.48	-27.12	-4.41	-5.48
L-Leu-Gly												
4.36/4.94	-8.36	-2.46	-11.83	-3.31	3.47	0.85	-23.09	-10.41	-25.74	-10.60	2.66	0.19
5.80/6.34	-5.74	-4.75	-7.31	-4.61	1.26	-0.15	-12.32	-10.06	-13.06	-9.50	0.74	-0.55
7.28/7.73	-3.86	-8.76	-4.35	-8.55	0.90	-0.21	-15.85	-17.87	-17.20	-17.89	1.35	0.02
D-Leu-Gly												
4.36/4.94	-8.39	-4.01	-11.00	-4.12	2.61	0.11	-21.74	-16.78	-22.91	-15.82	1.78	-0.96
5.80/6.34	-6.59	-5.10	-7.31	-4.35	0.73	-0.75	-18.89	-16.01	-18.61	-14.53	-0.28	-1.48
7.28/7.73	-4.04	-9.45	-4.35	-8.63	0.31	-0.81	-22.27	-22.36	-22.62	-21.64	0.36	-0.73
Gly-L-Asp												
4.36/4.94	-7.22	-7.13	-2.68	0.10	-4.54	-7.23	-11.51	-12.53	-9.78	-8.05	-1.72	-4.48
5.80/6.34	-8.46	-8.66	-4.50	-1.90	-3.95	-6.76	-13.01	-13.99	-11.59	-9.06	-1.42	-4.94
7.28/7.73	-10.44	-15.20	-8.43	-9.87	-2.01	-5.33	-17.32	-19.60	-17.10	-15.36	-0.22	-4.24
Gly-D-Asp												
4.36/4.94	-8.26	-7.16	-3.01	0.74	-5.25	-7.90	-22.82	-21.71	-18.74	-14.67	-4.08	-7.04
5.80/6.34	-9.11	-8.25	-4.54	-0.95	-4.57	-7.31	-22.20	-20.86	-19.12	-14.46	-3.07	-6.40
7.28/7.73	-10.00	-14.28	-7.18	-8.29	-2.82	-5.99	-22.39	-24.08	-21.44	-19.19	-0.95	-4.89

* $T = 301.6$ К, среднегармоническая температура исследованного температурного интервала

Разностные термодинамические характеристики адсорбции дипептидов (кДж/моль) на колонке Nautilus-E для различных составов водно-метанольной ПФ

Дипептид	60% об. метанол				80% об. метанол			
	α	$\Delta\Delta\bar{H}^0$	$T\Delta\Delta\bar{S}^{0*}$	$\Delta\Delta\bar{G}^0$	α	$\Delta\Delta\bar{H}^0$	$T\Delta\Delta\bar{S}^{0*}$	$\Delta\Delta\bar{G}^0$
	pH = 7.3				pH = 7.7			
Gly-Asp	1.4	0.43	1.25	-0.81	1.4	0.92	1.58	-0.66
LD/DL Leu-Leu	4.1	8.02	11.61	-3.60	4.0	11.43	15.00	-3.57
DD/LL Leu-Leu	13.9	-4.60	2.10	-6.69	11.9	-7.07	-0.99	-6.08
Ala-Ala	5.0	2.85	6.82	-3.97	5.9	0.36	4.66	-4.30
Gly-Leu	3.8	3.03	6.37	-3.34	4.2	2.48	5.98	-3.51
Leu-Gly	1.3	-0.18	0.42	-0.59	1.3	-0.69	-0.08	-0.60
pH = 5.8				pH = 6.3				
Gly-Asp	1.3	-0.65	-0.03	-0.62	1.3	0.40	0.95	-0.55
LD/DL Leu-Leu	2.4	0.96	3.39	-2.44	2.1	3.49	5.46	-1.97
DD/LL Leu-Leu	13.0	-6.46	-0.08	-6.37	11.0	-6.15	-0.25	-5.90
Ala-Ala	3.1	-0.54	2.22	-2.76	3.3	0.57	3.47	-2.90
Gly-Leu	2.7	-1.39	1.08	-2.47	2.7	0.45	2.89	-2.44
Leu-Gly	1.2	-0.84	-0.31	-0.53	1.3	-0.35	0.25	-0.60
pH = 4.4				pH = 4.9				
Gly-Asp	1.3	-1.04	-0.33	-0.71	1.3	-0.03	0.64	-0.67
LD/DL Leu-Leu	5.6	7.44	11.82	-4.38	1.2	4.68	7.21	-2.54
DD/LL Leu-Leu	-	-	-	-	-	-	-	-
Ala-Ala	7.4	1.43	6.40	-4.97	4.2	0.17	3.78	-3.61
Gly-Leu	5.3	1.34	5.14	-3.79	3.4	-0.70	2.38	-3.08
Leu-Gly	1.4	-0.03	0.83	-0.86	1.5	-1.55	-0.81	-0.74

* $T = 301.6$ К, среднегармоническая температура исследованного температурного интервала.

Несмотря на значительный экзотермический эффект, удерживание для стереоизомеров типа L (глицилсодержащие), DL, LL и даже LD было слабым ($k < 1$), благодаря равновеликому, а иногда превышающему энтропийному фактору. Только для трудно элюируемых D- и DD-стереоизомеров удерживание осуществлялось под явным энтальпийным контролем. Энтропии адсорбции сильно удерживаемых энантиомеров были выше энтропий адсорбции слабее удерживаемых энантиомеров, указывая на меньшую подвижность молекулы адсорбата внутри адсорбционного комплекса.

Влияние pH было сложным и разным для разных дипептидов и разных концентраций метанола в ПФ. В качестве примера приведём несколько результатов, полученных в ПФ с 60% об. CH_3OH . Так, энтальпия адсорбции сильнее удерживаемого D-энантиомера Gly-Asp не зависит от pH, а для слабее удерживаемого L-энантиомера увеличивается по абсолютной величине с ростом pH. Похожая картина наблюдается для энантиомеров Gly-Leu, хотя он имеет другую кислотную природу, чем Gly-Asp. В то же время величина $|\Delta\bar{H}^0|$ для энантиомеров Ala-Ala изменяется по треугольной траектории, а для D-Leu-D-Leu при pH 4.4 и 5.8 остаётся приблизительно постоянной, а при дальнейшем увеличении pH заместно возрастает. Энтропийный фактор часто следовал за энтальпийным, однако эта симбатность не означала высокой степени корреляции – попытки обнаружить энтальпийно-энтропийную компенсацию не увенчались успехом. Анализ разностей термодинамических характеристик адсорбции (табл. 4.10) показывает, что энантиоразделение осуществляется под энтальпийным контролем во всех случаях, кроме Leu-Gly в ПФ с pH = 4.4 и 60% об. CH_3OH .

По-видимому, хиральная полость ристоцетина А лучше приспособлена для образования прочных комплексов с D-терминальными дипептидами, чем хиральная полость эремомицина. Видно, что на ХНФ с первым антибиотиком достигаются более высокие коэффициенты разделения, чем на ХНФ со вторым.

На колонке Nautilus-R также были выполнены измерения энтальпии и энтропии адсорбции с ПФ на основе растворителя вода-ацетонитрил. Результаты приведены в табл. 4.11 и 4.12. По данным прослеживается отличие между кислым и нейтральными дипептидами. Для первого теплота адсорбции ($-\Delta\bar{H}^0$) в кислой ПФ (pH = 4.65) выше, чем в нейтральной (pH = 7.4), для вторых – наоборот, за исключением D-Ala-D-Ala, для которого теплота адсорбции почти не меняется с ростом pH. Интересно, что это отличие нивелируется на уровне свободных энергий. В разделе 4.1.1. просто фиксировался этот факт на основании наблюдений за фактором удерживания. Термодинамический анализ выявил, что это происходит, благодаря компенсаторному эффекту энтропийного фактора.

Разностные термодинамические характеристики адсорбции дипептидов (кДж/моль) на колонке Nautilus-R для различных составов водно-метанольной подвижной фазы

Дипептид	60% об. метанол				80% об. метанол			
	α	$\Delta\Delta\bar{H}^0$	$T\Delta\Delta\bar{S}^{0*}$	$\Delta\Delta\bar{G}^0$	α	$\Delta\Delta\bar{H}^0$	$T\Delta\Delta\bar{S}^{0*}$	$\Delta\Delta\bar{G}^0$
	pH = 7.3				pH = 7.7			
Gly-Asp	1.3	-5.07	-4.34	-0.74	1.3	-4.48	-3.83	-0.65
LD/DL Leu-Leu	3.7	-6.38	-2.56	-3.82	3.3	1.08	4.01	-2.93
DD/LL Leu-Leu	15.0	-14.88	-8.12	-6.76	9.8	-8.50	-3.02	-5.48
Ala-Ala	10.4	-7.76	-2.05	-5.71	12.3	-6.78	-0.60	-6.18
Gly-Leu	10.3	-18.49	-12.75	-5.74	9.5	-16.57	-11.08	-5.49
Leu-Gly	2.7	-6.42	-5.42	-0.99	1.4	-4.49	-3.75	-0.75
	pH = 5.8				pH = 6.3			
Gly-Asp	2.0	-9.19	-7.54	-1.66	1.9	-6.87	-5.40	-1.47
LD/DL Leu-Leu	2.9	-1.38	1.20	-2.57	2.4	-4.24	-2.05	-2.18
DD/LL Leu-Leu	16.4	-17.53	-11.25	-6.28	10.4	-17.48	-11.83	-5.65
Ala-Ala	9.9	-13.84	-9.47	-4.37	10.8	-12.19	-6.49	-5.70
Gly-Leu	12.2	-18.12	-12.14	-5.98	12.7	-17.07	-10.95	-6.11
Leu-Gly	1.6	-6.57	-5.55	-1.03	1.5	-5.95	-5.03	-0.93
	pH = 4.4				pH = 4.9			
Gly-Asp	2.7	-11.31	-8.96	-2.36	2.9	-9.18	-6.63	-2.56
LD/DL Leu-Leu	-	26.33	31.85	-5.52	4.2	-10.18	-7.09	-3.10
DD/LL Leu-Leu	-	-	-	-	-	-	-	-
Ala-Ala	12.6	-14.39	-6.80	-7.58	14.9	-11.61	-5.19	-6.42
Gly-Leu	13.6	-29.64	-22.83	-6.81	22.6	-15.41	-8.19	-7.22
Leu-Gly	1.8	1.35	2.83	-1.48	1.7	-6.37	-5.22	-1.15

* $T = 301.6$ К, среднегармоническая температура исследованного температурного интервала.

Процесс адсорбции во всех случаях является экзотермическим, но теплоты и энтропии адсорбции меньше, чем в ПФ с метанолом той же концентрации. Из всех стадий жидко-твёрдофазной адсорбции, включающих растворитель (см. раздел 1.2.8) десольватация адсорбтива считается более энергоёмкой и определяющей суммарный энтальпийный вклад процессов с участием растворителя [87]. Поскольку известно, что сольватация дипептидов в водно-ацетонитрильных смесях может быть более экзотермической, чем в водно-спиртовых и разность может составлять порядка 10 кДж/моль [207], логично отнести наблюдаемое уменьшение теплоты адсорбции при замене воды ацетонитрилом к различию в тепловых эффектах сольватации в этих смесях.

Анализ разностных термодинамических характеристик (табл. 4.12) показывает, что энантиоразделение всех исследованных дипептидов при рН 4.7 и 6.0 и всех кроме Ala-Ala при рН 7.5 осуществляется под энтальпийным контролем; энтропийный терм, будучи отрицательным, негативно влияет на энантиоразделение, уменьшая величину $\Delta\Delta\bar{G}^0$ и соответственно энантиоселективность. При рН = 7.5 вклад энтропийного термина в разделение энантиомеров Ala-Ala становится положительным ($\Delta\Delta\bar{S}^0 > 0$) и даже превышает вклад энтальпийного. Это следствие тренда, при котором значения энтальпийного и энтропийного термов для всех дипептидов становились менее отрицательными с увеличением рН, но только для аланилаланила это уменьшение привело к изменению знака энтропийного термина. Поскольку изменения $\Delta\Delta\bar{H}^0$ и $\Delta\Delta\bar{S}^0$ как функции рН происходили по сближающимся траекториям, это привело в результате к небольшому уменьшению энантиоселективности.

Таблица 4.11

Термодинамические характеристики адсорбции (кДж/моль) дипептидов на колонке Nautilus-R из водно-ацетонитрильной ПФ

рН	$\Delta\bar{H}^0$	$T\Delta\bar{S}^{0*}$	$\Delta\bar{G}^0$
D-Leu-L-Leu			
4.65	-3.72	-5.83	2.11
6.04	-5.58	-6.19	0.61
7.47	-9.27	-10.10	0.83
L-Leu-L-Leu			
4.65	-2.22	-5.83	3.62
6.04	-8.01	-8.36	0.35
7.47	-21.64	-23.02	1.38

pH	$\Delta\bar{H}^0$	$T\Delta\bar{S}^0$ *	$\Delta\bar{G}^0$
	L-Leu-D-Leu		
4.65	-6.01	-7.46	1.45
6.04	-5.78	-6.39	0.62
7.47	-10.20	-10.96	0.76
	D-Leu-D-Leu		
4.65	-14.95	-14.61	-0.34
6.04	-17.40	-15.36	-2.04
7.47	-28.14	-27.10	-1.04
	L-Leu-Gly		
4.65	-5.91	-5.61	-0.29
6.04	-6.11	-5.36	-0.75
7.47	-13.27	-13.01	-0.27
	D-Leu-Gly		
4.65	-6.68	-6.25	-0.43
6.04	-6.68	-5.81	-0.87
7.47	-13.74	-13.36	-0.38
	L-Ala-L-Ala		
4.65	-5.60	-4.52	-1.09
6.04	-5.89	-4.00	-1.89
7.47	-11.42	-9.88	-1.54
	D-Ala-D-Ala		
4.65	-13.02	-9.56	-3.46
6.04	-10.99	-7.13	-3.86
7.47	-12.06	-8.32	-3.75
	Gly-L-Asp		
4.65	-6.93	-2.64	-4.28
6.04	-4.00	-0.79	-3.21
7.47	-5.56	-2.72	-2.84
	Gly-D-Asp		
4.65	-10.26	-5.33	-4.92
6.04	-5.43	-1.96	-3.46
7.47	-5.56	-2.72	-2.84

* $T = 301.6$ К, среднегармоническая температура исследованного температурного интервала.

Таблица 4.12

Разностные термодинамические характеристики адсорбции дипептидов (кДж/моль) на колонке Nautilus-R для водно-ацетонитрильной ПФ (60% об. CH₃CN) при различных значениях pH

	α	$\Delta\Delta\bar{H}^0$	$T\Delta\Delta\bar{S}^{0*}$	$\Delta\Delta\bar{G}^0$
	pH 7.5			
Gly-Asp	-	-	-	-
LD/DL Leu-Leu	1.5	-0.93	-0.86	-0.07
DD/LL Leu-Leu	2.9	-6.50	-4.07	-2.42
Ala-Ala	2.4	-0.64	1.57	-2.20
Gly-Leu	2.2	-6.47	-4.64	-2.20
Leu-Gly	1.1	-0.46	-0.35	-0.11
pH 6.0				
Gly-Asp	1.1	-1.42	-1.17	-0.25
LD/DL Leu-Leu	1.3	-0.20	-0.20	0.01
DD/LL Leu-Leu	2.9	-9.39	-7.00	-2.39
Ala-Ala	2.4	-5.11	-3.13	-1.98
Gly-Leu	2.4	-7.94	-5.91	-2.04
Leu-Gly	1.1	-0.57	-0.46	-0.11
pH 4.7				
Gly-Asp	1.0	-3.33	-2.69	-0.64
LD/DL Leu-Leu	1.4	-2.29	-1.63	-0.66
DD/LL Leu-Leu	5.2	-12.73	-8.78	-3.95
Ala-Ala	2.7	-7.41	-5.04	-2.37
Gly-Leu	3.0	-29.64	-22.83	-6.81
Leu-Gly	1.1	-0.77	-0.63	-0.14

* $T = 301.6$ К, среднегармоническая температура исследованного температурного интервала.

*

*

*

Анализ представленных термодинамических данных позволил лучше понять природу зависимостей удерживания и разделения дипептидов от состава ПФ. Он предоставил дополнительные доказательства в пользу гипотезы о влиянии pH на фактор удерживания через контроль распределения ионных форм дипептидов. Была продемонстрирована важность структурных эффектов, а не только энергии связи аналита с адсорбционным центром, для удерживания. Выявлены различия в адсорбционном поведении эремомициновой и ристоцетиновой ХНФ, не фиксируемые простыми измерениями фактора удерживания как функции состава ПФ.

ВЫВОДЫ

1. Установлены закономерности влияния состава и рН ПФ, а также природы органического растворителя на хроматографическое удерживание и разделение энантиомеров дипептидов и оксазолопирролохинолонов на ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками ристоцетином А, эремомидином и тейкопланином при элюировании водно-органическими ПФ. Впервые продемонстрирована возможность разделения оптических изомеров оксазолопирролохинолонов на антибиотиковых ХНФ. Предложена математическая модель для описания зависимости фактора удерживания от состава бинарной ПФ.

2. Определены термодинамические характеристики адсорбции дипептидов и оксазолопирролохинолонов на указанных ХНФ из водно-органических растворителей. Рассмотрено влияние состава ПФ на термодинамику адсорбции. Показано, что это влияние реализуется через зависимость сольватирующей способности ПФ от её состава, причём сольватация молекул адсорбатов в ПФ играет важную роль в удерживании, а ресольватация образующихся адсорбционных комплексов может играть модулирующую роль в энантиоразделении.

3. Установлено, что в случае использования буферных ПФ механизм удерживания носит смешанный характер, частично определяется механизмом ионного обмена, а частично – механизмом молекулярной адсорбции. Ионизация дипептидов, контролируемая значением рН ПФ, в значительной мере влияет на их удерживание и разделение, причём различные ионные формы дипептидов характеризуются различной энантиоселективностью.

4. Рассмотрено влияние физико-химических свойств дипептидов на их удерживание на ХНФ с привитыми антибиотиками. Показано, что критическое значение имеют изоэлектрическая точка, зависящая от числа и констант диссоциации ионогенных групп дипептидов, и липофильность, определяющая сольватацию дипептидов в ПФ.

5. Изучено влияние строения молекул оксазолопирролохинолонов на их удерживание и энантиоразделение на исследованных ХНФ. Выдвинуто предположение, что адсорбционный комплекс с привитым антибиотиком образуется путем вхождения оксазольного фрагмента молекулы адсорбата внутрь хиральной полости антибиотикового селектора, при этом остальные фрагменты молекулы адсорбата играют модулирующую роль, взаимодействуя с периферийными участками селектора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пастер Л. Избранные труды. [ред.] Имшенецкий А.А. М.: Академии наук СССР, 1960. Т. 1. 1011 с.
2. Gal J. Chiral drugs from a historical point of view. [eds.] Francotte E., Lindner W. Chirality in drug research. Weinheim: Wiley–VCH, 2006. P. 3–25.
3. Cushny A.R. Biological relations of optically isomeric substances. Baltimor: The Williams & Wilkins comp., 1926. 80 p.
4. Orzylowski M., Fujiwara E., Mousseau D.D., Baker G.B. An overview of the involvement of D-serine in cognitive impairment in normal aging and dementia // *Front. Psychiatry*, 2021. Vol. 12. N 754032.
5. Genchi G. An overview on D-amino acids // *Amino Acids*, 2017. Vol. 49. P. 1521–1533.
6. Спасов А.А., Иежица И.Н. Стереофармакологические особенности карнитина // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, 2005. Т. 91. № 12. С. 1469–1480.
7. Francotte E.R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers // *J. Chromatogr. A*, 2001. Vol. 906. P. 379–397.
8. Berkecz R., Tanács D., Péter A., Ilisz I. Enantioselective liquid chromatographic separations using macrocyclic glycopeptide-based chiral selectors // *Molecules*, 2021. Vol. 26. N 3380.
9. Ilisz I., Pataj Z., Aranyi A., Péter A. Macrocyclic antibiotic selectors in direct HPLC enantioseparations // *Sep. Purif. Rev*, 2012. Vol. 41. P. 207–249.
10. Berthod A., Qiu H. X., Staroverov S. M., Kuznestov M. A., Armstrong D.W. Chiral recognition with macrocyclic glycopeptides: mechanisms and applications. [eds.] Berthod A. Chiral recognition in separation methods. Berlin: Springer-Verlag, 2010. P. 203–222.
11. D’Acquarica I., Gasparrini F., Misiti D., Pierini M., Villani C. HPLC chiral stationary phases containing macrocyclic antibiotics: practical aspects and recognition mechanism. [eds.] Grushka E., Grinberg N. *Advances in Chromatography*. Boca-Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008. Vol. 46. P. 109–173.
12. Catani M., Ismail O.H., Gasparrini F., Antonelli M., Pasti L., Marchetti N., Felletti S., Cavazzini A. Recent advancements and future directions of superficially porous chiral stationary phases for ultrafast high-performance enantioseparations // *Analyst*, 2017. Vol. 142. P. 555–566.

13. Reshetova E., Asnin L.D. Retention mechanisms of rasagiline and its analogues on superficially porous particle vancomycin- and teicoplanin-based chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 2023. Vol. 1704. N 464120.
14. Easson L.H., Stedman E. CLXX. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. V. Molecular dissymmetry and physiological activity // *Biochem. J.*, 1933. Vol. 27. P. 1257–1266.
15. Ogston A.G. Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements // *Nature*, 1948. Vol. 963. P. 963.
16. Salem L., Chapuisat X., Segal G., Hiberty C.P., Minot C., Leforestier C., Sautet P. Chirality Forces // *J. Am. Chem. Soc.*, 1987. Vol. 109. P. 2887–2894.
17. Topiol S., Sabio M. Interactions between eight centers are required for chiral recognition // *J. Am. Chem. Soc.*, 1989. Vol. 111. P. 4109–4110.
18. Bentley R. Diastereoisomerism, contact points, and chiral selectivity: a four-site saga // *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003. Vol. 414. P. 1–12.
19. Dalgliesh C.E. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms // *J. Chem. Soc.*, 1952. P. 3940–3942.
20. Pirkle W.H., Pochapsky T.C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers // *Chem. Rev.*, 1989. Vol. 89. P. 347–362.
21. Davankov V.A. The nature of chiral recognition: is it a three-point interaction? // *Chirality*, 1997. Vol. 9. P. 99–102.
22. Sundaresan V., Abrol R. Towards a general model for protein–substrate stereoselectivity // *Protein Sci.*, 2002. Vol. 11. P. 1330–1339.
23. Sundaresan V., Abrol R. Biological chiral recognition: the substrate’s perspective // *Chirality*, 2005. Vol. 17. P. S30–S39.
24. Jozwiak K., Moaddel R., Ravichandran S., Plazinska A., Kozak J., Patel S., Yamaguchi R., Wainer I.W. Exploring enantiospecific ligand–protein interactions using cellular membrane affinity chromatography: Chiral recognition as a dynamic process // *J. Chromatogr. B*, 2008. Vol. 875. P. 200–207.
25. Pirkle W.H., Hyun M.H., Bank B. A rational approach to the design of highly-effective chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 1984. Vol. 316. P. 585–604.

26. Lammerhofer M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 2010. Vol. 1217. P. 814–856.
27. Chankvetadze B., Burjanadze N., Pintore G., Bergenthal D., Bergander K., Mühlenbrock C., Breitzkreuz J., Blaschke G. Separation of brompheniramine enantiomers by capillary electrophoresis and study of chiral recognition mechanisms of cyclodextrins using NMR-spectroscopy, UV spectrometry, electrospray ionization mass spectrometry and X-ray crystallography // *J. Chromatogr. A*, 2000. Vol. 875. P. 471–484.
28. Bicker W., Chiorescu I., Arion V., Lammerhofer M., Lindner W. Contributions to chromatographic chiral recognition of permethrinic acid stereoisomers by a quinine carbamate chiral selector: evidence from X-ray diffraction, DFT computations, ¹H NMR, and thermodynamic studies // *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008. Vol. 19. P. 97–110.
29. Maier N.M., Nicoletti L., Lämmerhofer M., Lindner W. Enantioselective anion exchangers based on cinchona alkaloid-derived carbamates: Influence of C8/C9 stereochemistry on chiral recognition // *Chirality*, 1999. Vol. 11. P. 522–528.
30. Turiel M.G., Garrido-Gonzalez J.J., Simon L., Sanz F., Lithgow A.M., Morán J.R., Fuentes de Arriba Á.L., Alcázar V. Highly enantioselective extraction of phenylglycine by a chiral macrocyclic receptor based on supramolecular interactions // *Org. Lett.*, 2020. Vol. 22. P. 867–872.
31. Nair U.B., Chang S.S.C., Armstrong D.W., Rawjee Y.Y., Egglestone D.S., McArdle J.V. Elucidation of vancomycin's enantioselective binding site using its copper complex // *Chirality*, 1996. Vol. 8. P. 590–595.
32. Yashima E., Yamamoto C., Okamoto, Y. NMR studies of chiral discrimination relevant to the liquid chromatographic enantioseparation by a cellulose phenylcarbamate derivative // *J. Am. Chem. Soc.*, 1996. Vol. 118. P. 4036–4048.
33. Pearce C.M., Gerhard U. Williams D.H. Ligands which bind weakly to vancomycin: studies by ¹³C NMR spectroscopy // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1995. Vol. 2. P. 159–162.
34. Kalman J.R., Williams D.H. An NMR study of the interaction between the antibiotic ristocetin A and a cell wall peptide analog. Negative nuclear Overhauser effects in the investigation of drug binding sites // *J. Am. Chem. Soc.*, 1980. Vol. 102. P. 906–912.
35. Williams D.H., Williamson M.P., Butcher D.W., Hammond S.J. Detailed binding sites of the antibiotics vancomycin and ristocetin A: determination of intermolecular distances in antibiotic/substrate complexes by use of the time-dependent NOE // *J. Am. Chem. Soc.*, 1983. Vol. 105. P. 1332–1339.

36. Williams D.H., Bardsley B. The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria // *Angew. Chem.*, 1999. Vol. 38. P. 1172–1193.
37. Izaguirre J.A., Reich S., Skeel R. Longer time steps for molecular dynamics // *J. Chem. Phys.*, 1999. Vol. 110. P. 9853–9864.
38. Gauquier P.D., Vanommeslaeghe K., Heyden Y.V., Mangelings D. Modelling approaches for chiral chromatography on polysaccharide-based and macrocyclic antibiotic chiral selectors: A review // *Analytica Chimica Acta*, 2022. Vol. 1198. N 338861.
39. Sardella R., Ianni F., Cossignani L., Aldini G., Carotti A. Binding modes identification through molecular dynamic simulations: A case study with carnosine enantiomers and the Teicoplanin A₂₋₂-based chiral stationary phase // *J. Sep. Sci.*, 2020. Vol. 43. P. 1728–1736.
40. Fumagalli L., Pucciarini L., Regazzoni L., Gilardoni E. Direct HPLC separation of carnosine enantiomers with two chiral stationary phases based on penicillamine and teicoplanin derivatives // *J. Sep. Sci.*, 2018. Vol. 41. P. 1240–1246.
41. Varfaj I., Pershina M., Stepanova M., Sardella R., Asnin L.D., Carotti A. Elucidation of retention mechanism of dipeptides on a ristocetin A-based chiral stationary phase using a combination of chromatographic and molecular simulation techniques // *J. Chromatogr. A*, 2022. Vol. 1675. N 463158.
42. Peluso P., Dessi A., Dallochio R., Mamane V. Cossu S. Recent studies of docking and molecular dynamics simulation for liquid-phase enantioseparations // *Electrophoresis*, 2019. Vol. 40. P. 1881–1896.
43. Goodsell, D.S., Sanner M.F., Olson A.J., Forli S. The AutoDock suite at 30 // *Protein Sci.*, 2021. Vol. 30. P. 31–43.
44. Киселев А.В. Межмолекулярные взаимодействия в адсорбции и хроматографии. Учеб. Пособие для хим., биолог. и химико-технолог. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1986. 360 с.
45. Berthod A., Liu Y., Bagwill C., Armstrong D.W. Facile liquid chromatographic enantioresolution of native amino acids and peptides using a teicoplanin chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 1996. Vol. 731. P. 123–137.
46. Armstrong D.W., Liu Y., Ekborg-Ott K.H. A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparations // *Chirality*, 1995. Vol. 7. P. 474–497.
47. Berthod A., Chen X., Kullman J.P., Armstrong D.W., Gasparrini F., D'Acquarica I., Villani C. Role of the carbohydrate moieties in chiral recognition on teicoplanin-based stationary phases // *Anal. Chem.*, 2000. Vol. 72. P. 1767–1780.

48. Peter A., Vekes E., Armstrong D.W. Effects of temperature on retention of chiral compounds on a ristocetin A chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2002. Vol. 958. P. 89–107.
49. Pataj Z., Ilisz, I., Aranyi A., Forró E., Fülöp F., Armstrong D.W., Péter A. LC separation of γ -amino acid enantiomers // *Chromatographia*, 2010. Vol. 71. P. 13–19.
50. Asnin L.D., Kopchenova M.V., Vozisov S.E., Klochkova M.A., Klimova Y.A. Enantioselective retention mechanisms of dipeptides on antibiotic-based chiral stationary phases. II. Effect of the methanol content in the mobile phase // *J. Chromatogr. A*, 2020. Vol. 1626. N 461371.
51. Cavazzini A., Nadalini G., Dondi F., Gasparrini F., Ciogli A., Villani C. Study of mechanisms of chiral discrimination of amino acids and their derivatives on a teicoplanin-based chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2004. Vol. 1031. P. 143–158.
52. Tanács D., Berkecz R., Armstrong D.W., Péter A., Ilisz I. Enantioseparation of α -substituted proline analogs with macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases immobilized on superficially porous particles of silica applying liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection // *J. Chromatogr. A*, 2023. Vol. 1697. N 463997.
53. Del Rio A. Exploring enantioselective molecular recognition mechanisms with chemoinformatic techniques // *J. Sep. Sci.*, 2009. Vol. 32. P. 1566–1584.
54. Sagandykova G., Buszewski B. Perspectives and recent advances in quantitative structure-retention relationships for high performance liquid chromatography. How far are we? // *TrAC*, 2021. Vol. 141. N 116294.
55. Карасева И.Н., Холин А.Ю., Курбатова С.В. Особенности сорбции гетероциклов в условиях ОФ ВЭЖХ // *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов XIV Всероссийск. конф. молодых ученых с международ. участием. Саратов: Саратовский источник, 2020. С. 21–25.*
56. Sarvin N., Puzankov R., Vasiyarov G., Nesterenko P.N., Staroverov S.M. Silica immobilised chloro- and amido-derivatives of eremomycine as chiral stationary phases for the enantioseparation of amino acids by reversed-phase liquid chromatography // *Molecules*, 2023. Vol. 28. N 85.
57. Stanley B.J., Guiochon G. Calculation of adsorption energy distributions of silica samples using nonlinear chromatography // *Langmuir*, 1995. Vol. 11. P. 1735–1743.
58. Asnin L. Adsorption models in chiral chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2012. Vol. 1269. P. 3–25.
59. Gotmar, G., Fornstedt, T., Guiochon, G. Apparent and true enantioselectivity in enantioseparations // *Chirality*, 2000. Vol. 12. P. 558–564.

60. Snyder L.R. Principles of adsorption chromatography. New York: Marcel Dekker, 1968. P. 185–239.
61. Soczewinski E. Solvent composition effects in thin-layer chromatography systems of the type silica gel-electron donor solvent // *Anal. Chem.*, 1969. Vol. 41. P. 179–182.
62. Snyder L.R., Poppe H. Mechanism of solute retention in liquid–solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation: Competition versus “sorption” // *J. Chromatogr. A*, 1980. Vol. 184. P. 363–413.
63. Gyimesi-Forrás K., Maier N.M., Kokosi J., Gergely A., Lindner W. Enantiomer separation of imidazo–quinazoline–dione derivatives on quinine carbamate-based chiral stationary phase in normal phase mode // *Chirality*, 2009. Vol. 21. P. 199–207.
64. Ланин С.Н., Никитин Ю.С. Прогнозирование удерживания в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Межмолекулярные взаимодействия в подвижной фазе // *Журн. аналит. химии*, 1991. Т. 46. №. 10. С. 1971–1980.
65. Scott R.P.W., Kucera P. Solute interactions with the mobile and stationary phases in liquid–solid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1975. Vol. 112. P. 425–442.
66. Tsui H.W., Kuo C.H., Huang Y.C. Elucidation of retention behaviors in reversed–phase liquid chromatography as a function of mobile phase composition // *J. Chromatogr. A*, 2019. Vol. 1595. P. 127–135.
67. Lochmuller C.H., Wilder D.R. The sorption behavior of alkyl bonded phases in reverse–phase, high performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. Sci.*, 1979. Vol. 17. P. 574–579.
68. Martire D.E., Boehm R.E. Unified theory of retention and selectivity in liquid chromatography. 2. Reversed-phase liquid chromatography with chemically bonded phases // *J. Phys. Chem.*, 1983. Vol. 87. P. 1045–1062.
69. Vailaya A. Fundamentals of reversed phase chromatography: Thermodynamic and exothermodynamic treatment // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2005. Vol. 28. P. 965–1054.
70. Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R. Systematic approach to optimizing resolution in reversed-phase liquid chromatography, with emphasis on the role of temperature // *J. Chromatogr. A*, 1979. Vol. 185. P. 153–177.
71. Nikitas P., Pappa–Louisi A. Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2009. Vol. 1216. P. 1737–1755.
72. Sinanoglu O. Solvent effects on molecular associations. [eds.] Pullman B. Molecular associations in biology. New York: Elsevier, 1968. 571 p.

73. Horvath C., Melander W., Molnar I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 1976. Vol. 125. P. 129–156.
74. Alpert A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds // *J. Chromatogr. A*, 1990. Vol. 499. P. 177–196.
75. Hemstrom P., Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography // *J. Sep. Sci.*, 2006. Vol. 29. P. 1784–1821.
76. Jandera P., Hájek T. Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction–reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review // *J. Sep. Sci.*, 2018. Vol. 41. P. 145–162.
77. Jin G., Guo F., Zhang F., Xue X., Liang X. Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography // *Talanta*, 2008. Vol. 76. P. 522–527.
78. Matarashvili I., Ghughunishvili D., Chankvetadze L., Takaishvili N., Khatiashvili T., Tsintsadze M., Farkas T., Chankvetadze B. Separation of enantiomers of chiral weak acids with polysaccharide-based chiral columns and aqueous-organic mobile phases in high-performance liquid chromatography: Typical reversed-phase behavior? // *J. Chromatogr. A*, 2017. Vol. 1483. P. 86–92.
79. Armstrong D.W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill C., Chen J.R. Macrocyclic antibiotic as a new class of chiral selectors for liquid chromatography // *Anal. Chem.*, 1994. Vol. 66. P. 1473–1484.
80. Снайдер Л.Р., Киркланд Д.Д., Долан Д.У. Введение в современную жидкостную хроматографию. [ред.] Бару М.Б., Важенина И.В., Староверов С.М. М.: Техносфера, 2020. стр. 382–383.
81. Долгоносков А.М., Сенявин М.М., Волощик И.Н. Ионный обмен и ионная хроматография. М.: Наука, 1993. 222 с.
82. Самсонов Г.В., Меленовский А.Т. Сорбционные и хроматографические методы физико-химической биотехнологии. Ленинград: Наука, 1956. 229 с.
83. Lajkó G., Grecsó N., Megyesi R., Forró E., Fülöp F., Wolrab D., Lindner W., Péter A., Ilisz I. Enantioseparation of β -carboline derivatives on polysaccharide- and strong cation exchanger-based chiral stationary phases. A comparative study // *J. Chromatogr. A*, 2016. Vol. 1467. P. 188–198.
84. Hoffmann C.V., Laemmerhofer M., Lindner W. Novel strong cation-exchange type chiral stationary phase for the enantiomer separation of chiral amines by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2007. Vol. 1161. P. 242–251.
85. Orosz T., Grecsó N., Lajko G., Szakonyi Z., Fulop F., Armstrong D.W., Ilisz I., Peter A. Liquid chromatographic enantioseparation of carbocyclic β -amino acids possessing limonene skeleton on

macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases // *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 2017. Vol. 145. P. 119–126.

86. Grecsó N., Forró E., Fülöp F., Péter A., Ilisz I., Lindner W. Combinatorial effects of the configuration of the cationic and the anionic chiral subunits of four zwitterionic chiral stationary phases leading to reversal of elution order of cyclic β -amino acid enantiomers as ampholytic model compounds // *J. Chromatogr. A*, 2016. Vol. 1467. P. 178–187.

87. Asnin L.D., Cavazzini A., Marchetti N. Solute-stationary phase interaction in chiral chromatography. [eds.] Grinberg N. Grushka E. *Advances in chromatography*. Boca-Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2017. Vol. 53. P. 1-67.

88. Fornstedt T., Sajonz P., Guiochon G. A Closer study of chiral retention mechanisms // *Chirality*, 1998. Vol. 10. P. 375–381.

89. Jacobson S., Golshan-Shirazi S., Guiochon G. Chromatographic band profiles and band separation of enantiomers at high concentration // *J. Am. Chem. Soc.*, 1990. Vol. 112. P. 6492–6498.

90. Levkin P., Maier N. M., Lindner W., Schurig V. A practical method for the quantitative assessment of non-enantioselective versus enantioselective interactions encountered in liquid chromatography on brush-type chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2012. Vol. 1269. P. 270–278.

91. Kostova A., Bart H.J. Preparative chromatographic separation of amino acid racemic mixtures: I. Adsorption isotherms // *Sep. Purif. Tech.*, 2007. Vol. 54. P. 340–348.

92. Asnin L., Kaczmarski K., Guiochon G. The adsorption of naproxen enantiomers on the chiral stationary phase Whelk-O1 under reversed-phase conditions: The effect of buffer composition // *J. Chromatogr. A*, 2010. Vol. 1217. P. 7055–7064.

93. Blümel C., Hugo P., Seidel-Morgenstern A. Quantification of single solute and competitive adsorption isotherms using a closed-loop perturbation method // *J. Chromatogr. A*, 1999. Vol. 865. P. 51–71.

94. Golshan-Shirazi S., Guiochon G. Analytical solution for the ideal model of chromatography in the case of a pulse of a binary mixture with competitive Langmuir isotherm // *J. Phys. Chem.*, 1989. Vol. 93. P. 4143–4157.

95. Chervenak M.C., Toone E.J. A direct measure of the contribution of solvent reorganization to the enthalpy of ligand binding // *J. Am. Chem. Soc.*, 1994. Vol. 116. P. 10533–10539.

96. Тюнина Е.Ю., Баранников В.П., Дунаева В.В., Краснов А.В. Энтальпия сублимации и сольватации дипептидов анилинового ряда // *Журн. физ. химии*, 2022. Т. 96. № 4. С. 479–487.

97. Gasparrini F., Misiti D., Still W.C. Villani C., Wennemers H. Enantioselective and Diastereoselective Binding Study of Silica Bound Macrobicyclic Receptors by HPLC // *J. Org. Chem.*, 1997. Vol. 62. P. 8221-8224.
98. Reshetova E.N., Kopchenova M.V., Vozisov S.E., Vasyanin A.N., Asnin L.D. Enantioselective retention mechanisms of dipeptides on antibiotic-based chiral stationary phases: Leucyl-leucine, glycyl-leucine, and leucyl-glycine as case studies // *J. Chromatogr. A*, 2019. Vol. 1602. P. 368–377.
99. Horvath C., Melander W., Molnar I. Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases // *Anal. Chem.*, 1977. Vol. 49. P. 142–154.
100. Bosch E., Espinosa S., Roses M. Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography III. Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile-water mobile phases // *J. Chromatogr. A*, 1998. Vol. 824. P. 137–146.
101. Gagliardi L.G., Castells C.B., Ràfols C., Rosés M., Bosch E. Modeling retention and selectivity as a function of pH and column temperature in liquid chromatography // *Anal. Chem.*, 2006. Vol. 78. P. 5858–5867.
102. Kazakevich Y.V. High-performance liquid chromatography retention mechanisms and their mathematical descriptions // *J. Chromatogr. A*, 2006. Vol. 1126. P. 232–243.
103. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Влияние ионного состава подвижной фазы на хроматографическое удерживание энантиомеров профенов на хиральном адсорбенте с привитым антибиотиком эремомицином // *Журн. физ. химии*, 2011 г. Т. 85. № 8. С. 1552–1557.
104. Everett D.H. Thermodynamics of adsorption from solutions. Part 2. - Imperfect systems // *Trans. Faraday Soc.*, 1965. Vol. 61. P. 2478–2495.
105. Лопаткин А.А. Теоретические основы физической адсорбции. М.: МГУ, 1983. 344 с.
106. Asnin L.D., Stepanova M.V. Van't Hoff analysis in chiral chromatography // *J. Sep. Sci.*, 2018. Vol. 41. P. 1319–1337.
107. Гольберт К.А., Вигдергауз М.С. Курс газовой хроматографии. М.: Химия, 1967. 400 с.
108. Gotmar G., Asnin L.D., Guiochon G. Adsorption of the enantiomers of 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)-ethanol on silica-bonded chiral quinidine-carbamate // *J. Chromatogr. A*, 2004. Vol. 1059. P. 43–52.
109. Аснин Л.Д., Васянин А.Н., Степанова М.В. Особенности энантиоселективной адсорбции дипептидов на хиральных неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками на примере глициласпарагиновой кислоты // *Известия АН. Сер. хим.*, 2019. № 12. С. 2232–2239.

110. Beebe R.A., Emmett P.H. A comparison of the measurement of heats of adsorption by calorimetric and chromatographic methods on the system nitrogen–bone mineral // *J. Physical Chem.*, 1961. Vol. 65. P. 184–185.
111. Chamberlain C.S., Drago R.S. Comparison of enthalpies of hydrogen bonding determined by a gas-liquid chromatography method with those obtained by calorimetric or frequency shift methods // *J. Am. Chem. Soc.*, 1976. Vol. 98. P. 6142–6144.
112. Meyer E.F., Baiocchi F.A. A comparison of gas–liquid chromatographic enthalpies of solution with calorimetric values for four alkane systems // *J. Chem. Thermodynamics*, 1978. Vol. 10. P. 823–828.
113. Díaz E., Ordóñez S., Aurou A. Comparative study on the gas-phase adsorption of hexane over zeolites by calorimetry and inverse gas chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2005. Vol. 1095. P. 131–137.
114. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Адсорбция энантиомеров ибупрофена на хиральной неподвижной фазе с привитым антибиотиком эремомицином // *Журн. физ. химии*, 2015. Т. 89. № 2. С. 298–305.
115. Ben–Naim A. Solvation thermodynamics. New York: Springer Science+ Business Media, 1987. P. 201–203.
116. Sircar S. Gibbsian thermodynamics and column dynamics for adsorption of liquid mixtures // *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1993. Vol. 32. P. 2436–2437.
117. Яшкина Е.А., Светлов Д.А., Яшкин С.Н. Влияние комплексообразования сорбат– β -циклодекстрин на удерживание производных аланина на графитоподобном адсорбенте в условиях ВЭЖХ // *Журн. физ. химии*, 2015. Т. 89. № 10. С. 1651–1660.
118. Яшкин С.Н., Яшкина Е.А., Светлов Д.А., Соловова Н.В. Термодинамические характеристики адсорбции производных бензола из водно-органических элюентов на пористом графитоподобном адсорбенте в условиях равновесной ВЭЖХ // *Известия АН. Сер. хим.*, 2020. Т. 5. С. 909–919.
119. Chester T.L., Coym J.W. Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase–ratio–independent estimation of transfer enthalpy // *J. Chromatogr. A*, 2003. Vol. 1003. P. 101–111.
120. Abraham M.H., Ibrahim A., Zissimos A.M. Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements // *J. Chromatogr. A*, 2004. Vol. 1037. P. 29–47.

121. Lokajova J., Tesarova E., Armstrong D.W. Comparative study of three teicoplanin-based chiral stationary phases using the linear free energy relationship model // *J. Chromatogr. A*, 2005. Vol. 1088. P. 57–66.
122. Kalikova K., Lokajova J., Tesarova E. Linear free energy relationship as a tool for characterization of three teicoplanin-based chiral stationary phases under various mobile phase compositions // *J. Sep. Sci.*, 2006. Vol. 29. P. 1476–1485.
123. Vailaya A., Horváth C. Enthalpy–entropy compensation in hydrophobic interaction chromatography // *J. Phys. Chem.*, 1996. Vol. 100. P. 2447–2455.
124. Krug R.R., Hunter W.G., Grieger R.A. Enthalpy-entropy compensation. 2. Separation of the chemical from the statistical effect // *J. Phys. Chem.*, 1976. Vol. 80. P. 2341–2351.
125. Liu L., Guo Q.X. Isokinetic relationship, isoequilibrium relationship, and enthalpy–entropy compensation // *Chem. Rev.*, 2001. Vol. 101. P. 673–696.
126. Inoue Y., Hakushi T. Enthalpy-entropy compensation in complexation of cations with crown ethers and related ligands // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1985. P. 935–946.
127. Haroun M., Ravelet A., Grosset C., Villet A., Peyrin E. Thermodynamic origin of the chiral recognition of tryptophan on teicoplanin and teicoplanin aglycone stationary phases // *J. Sep. Sci.*, 2005. Vol. 28. P. 409–420.
128. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Хроматографическое поведение и термодинамика адсорбции энантиомеров профенов на силикагеле с привитым антибиотиком эремомицином // *Журн. физ. химии*, 2009. Т. 83. № 4. С. 643–648.
129. Блинов А.С., Решетова Е.Н. Влияние концентрации органического модификатора водно–этанольной подвижной фазы на хроматографическое удерживание и термодинамические характеристики адсорбции энантиомеров α -фенилкарбоновых кислот на силикагеле с привитым антибиотиком эремомицином // *Журн. физ. химии*, 2014. Т. 88. № 10. С. 1593–1599.
130. Henderson G.M., Rule H.G. A new method of resolving a racemic compound // *Nature*, 1938. Vol. 141. P. 917–918.
131. Hesse G., Hagel R. A complete separation of a racemic mixture by elution chromatography on cellulose triacetate // *Chromatographia*, 1973. Vol. 6. P. 277–280.
132. Moldoveanu S.C., David V. Stationary phases and columns for chiral chromatography. Selection of the HPLC method in chemical analysis. Amsterdam: Elsevier, 2017. P. 363–376.
133. Haginaka J. Protein–based chiral stationary phases for high–performance liquid chromatography enantioseparations // *J. Chromatogr. A*, 2001. Vol. 906. P. 253–273.

134. Okamoto Y., Kawashima M., Hatada K. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: Phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel // *J. Am. Chem. Soc.*, 1984. Vol. 106. P. 5357–5359.
135. Machida Y., Nishi H., Nakamura K. Enantiomer separation of hydrophobic amino compounds by high-performance liquid chromatography using crown ether dynamically coated chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 1999. Vol. 830. P. 311–320.
136. Рогожин С.В., Даванков В.А. Хроматографическое расщепление рацематов на диссимметрических сорбентах // *Успехи химии*, 1968. Т. 37. № 7. С. 1327–1347.
137. Armstrong D.W., DeMond W. Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometrical, and structural isomers // *J. Chromatogr. Sci.*, 1984. Vol. 22. P. 411–415.
138. Xiao Y., Ng S.C., Thatt Yang Tan T., Wang Y. Recent development of cyclodextrin chiral stationary phases and their applications in chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2012. Vol. 1269. P. 52–68.
139. Sun P., Wang C., Breitbach Z.S., Zhang Y., Armstrong D.W. Development of new HPLC chiral stationary phases based on native and derivatized cyclofructans // *Anal. Chem.*, 2009. Vol. 81. P. 10215–10226.
140. Hyun M.H. Development and application of crown ether-based HPLC chiral stationary phases // *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2005. Vol. 26. P. 1153–1163.
141. Fernandes C., Tiritan M.E., Pinto M. Small molecules as chromatographic tools for HPLC enantiomeric resolution: Pirkle-type chiral stationary phases evolution // *Chromatographia*, 2013. Vol. 76. P. 871–897.
142. Lammerhofer M., Lindner W. Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchona carbamates and their application as chiral anion exchangers // *J. Chromatogr. A*, 1996. Vol. 741. P. 33–48.
143. Hoffmann C.V., Pell R., Lammerhofer M., Lindner W. Synergistic effects on enantioselectivity of zwitterionic chiral stationary phases for separations of chiral acids, bases, and amino acids by HPLC // *Anal. Chem.*, 2008. Vol. 80. P. 8780–8789.
144. Yamagishi A. Clay column chromatography for optical resolution: Resolution of aromatic compounds on a Λ -ru(1,10-phenanthroline)₃²⁺-montmorillonite column // *J. Chromatogr. A*, 1985. Vol. 319. P. 299–310.

145. Ikai T., Nagata N., Awata S., Wada Y., Maeda K., Mizuno M., Swager T.M. Optically active distorted cyclic triptycenes: chiral stationary phases for HPLC // *RSC Adv.*, 2018. Vol. 8. P. 20483–20487.
146. Williamson M.P., Williams D.H., Hammond S.J. Interactions of vancomycin and ristocetin with peptides as a model for protein binding // *Tetrahedron*, 1984. Vol. 40. P. 569–577.
147. Ekborg-Ott K.H., Liu Y., Armstrong D. W. Highly enantioselective HPLC separations using the covalently bonded macrocyclic antibiotic, ristocetin A, chiral stationary phase // *Chirality*, 1998. P. 434–483.
148. Teixeira J., Tiritan M.E., Pinto M.M.M., Fernandes C. Chiral stationary phases for liquid chromatography: recent developments // *Molecules*, 2019. Vol. 24. N 865.
149. Gasper M.P., Berthod A., Nair U.B., Armstrong D.W. Comparison and modeling study of vancomycin, ristocetin A, and teicoplanin for CE enantioseparations // *Anal. Chem.*, 1996. Vol. 68. P. 2501-2514.
150. Ilisz, I., Berkecz, R., Péter, A. HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: A review // *J. Sep. Sci.*, 2006. Vol. 29. P. 1305–1321.
151. Ilisz I., Berkecz R., Péter A. Retention mechanism of high–performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 2009. Vol. 1216. P. 1845–1860.
152. Berthod A. Chiral recognition mechanisms with macrocyclic glycopeptide selectors // *Chirality*, 2009. Vol. 21. P. 167–175.
153. Xiao T.X., Armstrong D. W. Enantiomeric separation by HPLC using macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases. [eds] Gübitz G., Schmid M.G. *Chiral Separations. Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press, 2004. Vol. 243. P. 113-171.
154. Gasparini F., D’Acquarica I., Misiti D., Pierini M., Villani C. Natural and totally synthetic receptors in the innovative design of HPLC chiral stationary phases // *Pure Applied Chem.*, 2003. Vol. 75. P. 407–412.
155. Cardoso P.A., César I.C. Chiral method development strategies for HPLC using macrocyclic glycopeptide-based stationary phases // *Chromatographia*, 2018. Vol. 81. P. 841– 850.
156. Rundlett K.L., Gasper M.P., Zhou E.Y., Armstrong D.W. Capillary electrophoretic enantiomeric separations using the glycopeptide antibiotic, teicoplanin // *Chirality*, 1996. Vol. 8. P. 88–107.

157. Gauze G.F., Brazhnikova M.G., Laiko A.V., Sveshnikova M.A., Preobrazhenskaia T.P. Eremomycin-a new antibiotic from the cyclic glycopeptide group // *Antibiotics and Medical Biotechnology*, 1987. Vol. 8. P. 571–576.
158. 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. Vol. 1108. P. 263–267.
159. Kuznetsov M. A., Nesterenko P. N., Vasiyarov G. G., Staroverov S. M. Sorbents with immobilized glycopeptide antibiotics for separating optical isomers by high-performance liquid chromatography // *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2006. Vol. 42. P. 536–544.
160. Кузнецов М.А., Нестеренко П.Н., Васияров Г.Г., Староверов С.М. Высокоэффективная жидкостная хроматография альфа-аминокислот на силикагеле с иммобилизованным эремомицином // *Журн. аналит. химии*, 2008. Т. 63. С. 64–72.
161. Petrussevska K., Kuznetsov M.A., Gedicke K., Meshko V., Staroverov S., Seidel–Morgenstern A. Chromatographic enantioseparation of amino acids using a new chiral stationary phase based on a macrocyclic glycopeptide antibiotic // *J. Sep. Sci.*, 2006. Vol. 29. P. 1447–1457.
162. Nikitina Y.K., Ali I., Asnin L.D. Adsorption of aqueous organic mixtures on a chiral stationary phase with bound antibiotic eremomycin // *J. Chromatogr. A*, 2014. Vol. 1363. P. 71–78.
163. Peter A., Torok G., Armstrong D.W., Toth G., Tourwe D. High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of synthetic amino acids on a ristocetin A chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2000. Vol. 904. P. 1–15.
164. Peter A., Vekes E., Gera L., Stewart J.M., Armstrong D.W. A comparison of the direct and indirect LC methods for separating enantiomers of unusual glycine and alanine amino acid analogues // *Chromatographia*, 2002. Vol. 56. P. 79–89.
165. Phyto Y.Z., Cravo S., Palmeira A., Tiritan M.E., Kijjoa A., Pinto M.M.M., Fernandes C. Enantiomeric resolution and docking studies of chiral xanthonic derivatives on Chirobiotic columns // *Molecules*, 2018. Vol. 23. N 142.
166. Gogolishvili O.Sh., Reshetova E.N. Chromatographic enantioseparation and adsorption thermodynamics of hydroxy acids and their derivatives on antibiotic based chiral stationary phases as affected by eluent pH // *Chromatographia*, 2021. Vol. 84. P. 53–73.
167. Ward T., Farris A.B. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: A review // *J. Chromatogr. A*, 2001. Vol. 906. P. 73–89.

168. Peter A., Torok G., Armstrong D.W. High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers // *J. Chromatogr. A*, 1998. Vol. 793. P. 283–296.
169. Xiao T.L., Rozhkov R.V., Larock R.V., Armstrong D.W. Separation of the enantiomers of substituted dihydrofurocoumarins by HPLC using macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003. Vol. 377. P. 639–654.
170. Peyrin E., Ravel A., Grosset C., Villet A., Ravelet C., Nicolle E., Alary J. Interactions between D,L dansyl amino acids and immobilized teicoplanin: Study of the dual effect of sodium citrate on chiral recognition // *Chromatographia*, 2001. Vol. 53. P. 645–650.
171. Berthod A., Yu T., Kullman J.P., Armstrong D.W., Gasparri F., D'Acquarica I., Misiti D., Carotti A. Evaluation of the macrocyclic glycopeptide A-40,926 as a high-performance liquid chromatographic chiral selector and comparison with teicoplanin chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2000. Vol. 897. P. 113–129.
172. Peyrin E., Ravelet C., Nicolle E. Dansyl amino acid enantiomer separation on a teicoplanin chiral stationary phase: Effect of eluent pH // *J. Chromatogr. A*, 2001. Vol. 927. P. 37–43.
173. Cavazzini A., Pasti L., Dondi F., Finessi M., Costa V., Gasparri F., Ciogli A., Bedani F. Binding of dipeptides and amino acids to teicoplanin chiral stationary phase: Apparent homogeneity of some heterogeneous systems // *Anal. Chem.*, 2009. Vol. 81. P. 6735–6743.
174. Яковлев С.В. Место фторхинолонов в лечении бактериальных инфекций // *Рос. Мед. Журн.*, 2003. Т. 8. N 434.
175. Фефилова И.В., Разумова М.Ю., Селиверстов Г.С., Ботева А.А., Солодников С.Ю., Красных О.П. Синтез соединений, содержащих 4-хинолоновый фрагмент, и их влияние на уровень глюкозы в крови крыс // *Вестник ПНИПУ, Хим. технол. биотехнол.*, 2014. № 4. С. 37–51.
176. Matsuoka M., Banno K., Sato T. Analytical chiral separation of a new quinolone compound in biological fluids by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Applic.*, 1996. Vol. 676. P. 117–124.
177. Zheng W., Xu X., Wang E. Direct chiral separation of caderofloxacin enantiomers by HPLC using a glycoprotein column // *J. Anal. Chem.*, 2006. Vol. 61. P. 1090–1092.
178. Hyun M., Han S., Jin J., Lee W. Separation of the stereoisomers of racemic fluoroquinolone antibacterial agents on a crown-ether based chiral HPLC stationary phase // *Chromatographia*, 2000. Vol. 52. P. 473–476.

179. Machida Y., Nishi H., Nakamura K. Crystallographic studies for the chiral recognition of the novel chiral stationary phase derived from (+)-(R)-18-crown-6 tetracarboxylic acid // *Chirality*, 1999. Vol. 11. P. 173–178.
180. Ali I., Gaitonde V., Aboul-Enein H., Hussain A. Chiral separation of β -adrenergic blockers on CelluCoat column by HPLC // *Talanta*, 2009. Vol. 78. P. 458–463.
181. Aboul-Enein H. Y., Ali I. Studies on the effect of alcohols on the chiral discrimination mechanisms of amylose stationary phase on the enantioseparation of nebivolol by HPLC // *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 2001. Vol. 48. P. 175–188.
182. Rebizi M.N., Sekkoum K., Belboukhari N., Cheriti A., Aboul-Enein H.Y. Liquid chromatographic enantioseparation of some fluoroquinolone drugs using several polysaccharide-based chiral stationary phases // *J. Chromatogr. Sci.*, 2018. Vol. 56. P. 835–845.
183. Stern E., Goossens L., Vaccher C., Bonte J., Depreux P., Henichart J., Goossens J.F. Chiral resolution of the enantiomers of new selective CB₂ receptor agonists by liquid chromatography on amylose stationary phases // *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 2008. Vol. 46. P. 848–853.
184. AlOthman Z., Alanazi A.G., Suhail M., Ali I. HPLC enantio-separation and chiral recognition mechanism of quinolones on vancomycin CSP // *J. Chromatogr. B*, 2020. Vol. 1157. N 122335.
185. Ali I., Suhail M., Asnin L. Chiral separation and modeling of quinolones on teicoplanin macrocyclic glycopeptide antibiotics CSP // *Chirality*, 2018. Vol. 30. P. 1304–1311.
186. Czerwenka C., Lindner W. Stereoselective peptide analysis // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005. Vol. 382. P. 599–638.
187. Conrad U., Chankvetadze B., Scriba G.K.E. High performance liquid chromatographic separation of dipeptide and tripeptide enantiomers using a chiral crown ether stationary phase // *J. Sep. Sci.*, 2005. Vol. 28. P. 2275–2281.
188. Florance J., Galdes A., Konteatis Z., Kosarych Z., Langer K., Marrucci C. High-performance liquid chromatographic separation of peptide and amino acid stereoisomers // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Applic.*, 1987. Vol. 414. P. 313–322.
189. Chen S., Pawlowska M., Armstrong D.W. HPLC enantioseparation of di- and tripeptides on cyclodextrin bonded stationary phases after derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) // *J. Liq. Chromatogr.*, 1994. Vol. 17. P. 483–497.
190. Czerwenka C., Lammerhofer M., Maier N.M., Rissanen K., Lindner W. Direct high-performance liquid chromatographic separation of peptide enantiomers: study on chiral recognition by systematic

evaluation of the influence of structural features of the chiral selectors on enantioselectivity // *Anal. Chem.*, 2002. Vol. 74. P. 5658–5666.

191. Schmid M.G., Holbling M., Schnedlitz N., Gubitz G. Enantioseparation of dipeptides and tripeptides by micro-HPLC comparing teicoplanin and teicoplanin aglycone as chiral selectors // *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2004. Vol. 61. P. 1–10.

192. Loukili B., Dufresne C., Jourdan E., Grosset C., Ravel A., Villet A., Peyrin E. Study of tryptophan enantiomer binding to a teicoplanin-based stationary phase using the perturbation technique: Investigation of the role of sodium perchlorate in solute retention and enantioselectivity // *J. Chromatogr. A*, 2003. Vol. 986. P. 45–53.

193. Ботева А.А., Красных О.П., Солодников С.Ю. 2381229 // Б.И. №4 РФ, 2010 г.

194. Subirats X., Rosés M., Bosch E. On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pK_a of analytes – A review // *Sep. Purific. Review.*, 2007. Vol. 36. P. 231–255.

195. Lanin S.N., Ledenkova M.U., Nikitin Y.S. Calculation of sorption isotherms from the retention parameters in high-performance liquid chromatography // *Mendeleev Comm.*, 2000. Vol. 10. P. 37–38.

196. Albert A., Serjeant E.P. The determination of ionization constants. A laboratory manual. New York: Chapman and Hall, 1984. 218 p.

197. Maier N.M., Schefzick S., Lombardo G., Feliz M., Rissanen K., Lindner W., Lipkowitz K.B. Elucidation of the chiral recognition mechanism of cinchona alkaloid carbamate-type receptors for 3,5-dinitrobenzoyl amino acids // *J. Am. Chem. Soc.*, 2002. Vol. 124. P. 8611–8629.

198. Czerwenka C., Zhang M.M., Kählig H., Maier N.M., Lipkowitz K.B., Lindner W. Chiral recognition of peptide enantiomers by cinchona alkaloid derived chiral selectors: Mechanistic investigations by liquid chromatography, NMR spectroscopy, and molecular modeling // *J. Org. Chem.*, 2003. Vol. 68. P. 8315–8327.

199. Abraham M.H., Whiting G.S., Doherty R.M., Shuely W.J. Hydrogen bonding. Part 13. A new method for the characterisation of GLC stationary phases – the laffort data set // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1990. P. 1451–1460.

200. Peter A., Arki A., Tourwe D., Forró E., Fülöp F., Armstrong D.W. Comparison of the separation efficiencies of Chirobiotic T and TAG columns in the separation of unusual amino acids // *J. Chromatogr. A*, 2004. Vol. 1031. P. 159–170.

201. Poplewska I., Kramarz R., Piatkowski W., Seidel-Morgenstern A., Antos D. Influence of preferential adsorption of mobile phase on retention behavior of amino acids on the teicoplanin chiral selector // *J. Chromatogr. A*, 2007. Vol. 1173. P. 58–70.
202. Климова Я.А., Аснин Л.Д. Адсорбция бинарных растворителей на хиральной неподвижной фазе с привитым макроциклическим антибиотиками // *Журн. физ. химии*, 2021. Т. 95. С. 1739–1745.
203. Степанова М.В., Аснин Л.Д., Ботева А.А., Фефилова И.В. Закономерности энантиоселективного удерживания хиральных оксазолопирролохинолонов на неподвижной фазе с привитым антибиотиком ристоцетином А // *Журн. физ. химии*, 2021. Т. 95. № 1, С. 131–139.
204. Canals I., Portal J.A., Bosch E., Roses M. Retention of ionizable compounds on HPLC. 4. Mobile-phase pH measurement in methanol/water // *Anal. Chem.*, 2000. Vol. 72. P. 1802–1809.
205. Avdeef A., Vox K.J., Comer J.E.A., Gilges M., Hadley M., Hibbert C., Patterson W., Tam K.Y. pH-metric $\log P$ 11. pKa determination of water-insoluble drugs in organic solvent-water mixtures // *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999. Vol. 20. P. 631–641.
206. Бейтс Р. Определение pH. Теория и практика. Л.: Химия, 1972. 400 с.
207. Баделин В.Г., Тюнина Е.Ю., Смирнов В.И., Межевой И.Н. Термодинамические характеристики аминокислот и пептидов в водно-органических растворах и буферных системах. [ред.] Цивадзе А.Ю. Химия растворов биологически активных веществ. Иваново: Ивановский издательский дом, 2016. С. 94–151.