

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Степановой Марии Владимировны «Механизмы энантиоселективного удерживания хиральных веществ на неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками эремомицином, ристоцетином А и тейкопланином», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия

Проблема получения чистых энантиомеров из рацемических смесей является одной из важнейших задач при фармацевтическом производстве гомохиральных лекарственных препаратов. Для ее решения необходимо понимание процессов взаимодействия разделяемых компонентов между подвижной и неподвижной фазами, которое может быть получено при анализе хроматографического удерживания и разделения.

Особенный научный и практический интерес вызывает разделение веществ, обладающих специфической биологической активностью, но относящихся к разным классам органических соединений, в частности, замещенные оксазолпирролохинолоны (ОПХ) и дипептиды, способные существовать в различных ионных формах при варьировании рН. Для разделения энантиомеров используются хиральные неподвижные фазы с привитыми гликопептидными макроциклическими антибиотиками, способные к различным типам взаимодействий с разделяемыми веществами и получившими достаточно широкое распространение в ВЭЖХ, в частности, при разделении аминокислот и некоторых пептидов. Однако систематических исследований, посвященных выявлению особенностей взаимодействий данных соединений с хиральными фазами на основе антибиотиков при варьировании состава подвижной фазы и ионных состояний аналитов практически не проводилось. Поэтому **актуальность** работы, направленной на решение данной задачи **не вызывает сомнений**.

Научная новизна работы заключается в установлении закономерностей удерживания и разделения оксазолпирролохинолонов и дипептидов на хиральных фазах, содержащих привитые гликопептидные макроциклические

антибиотики при различных составах подвижных фазы и рН. Выявлена роль компонентов подвижной фазы в процессах сольватации молекул адсорбтива и адсорбционных центров. Предложен ионообменно-адсорбционный механизм удерживания и энантиоразделения дипептидов.

Практическая значимость исследования заключается в определении оптимальных условий разделения энантиомеров дипептидов и ОПХ на антибиотиковых хиральных фазах, которые могут быть использованы для хроматографического контроля энантиомерных смесей и отдельных энантиомеров в фармацевтическом, биотехнологическом производстве, медицине, экологии.

Достоверность результатов обеспечивается применением современных инструментальных методов исследования, взаимной корреляцией результатов, согласованием ряда полученных данных с известными из литературы.

Автореферат диссертации полностью **отражает** основное содержание работы.

Диссертационная работа Степановой М.В. имеет классическую структуру, изложена на 152 стр., включая введение, 4 главы, выводы, список литературы (207 источников), содержит 23 таблицы и 31 рисунок. Диссертационная работа аккуратно оформлена, таблицы и графический материал информативны.

Во **введении**, изложенном на 4 страницах, автор лаконично описывает актуальность работы, научную новизну, практическую значимость, положения, выносимые на защиту, обосновывает достоверность представленных результатов, приводит публикации и результаты апробации работы, формулирует личный вклад, приводятся данные о структуре работы.

В **первой главе**, изложенной на 50 страницах, автор раскрывает современное состояние в области ВЭЖХ хиральных соединений. Излагаются и критически анализируются подходы к описанию хроматографического удерживания энантиомеров, термодинамические способы описания

хроматографических данных. Также автором подробно изложены свойства применяемых хиральных фаз с привитыми антибиотиками и особенности исследуемых дипептидов и ОПХ.

Во второй главе работы, изложенной на 8 страницах, автор дает характеристику основным объектам исследования, реактивам и хроматографическим колонкам, приводит методики получения характеристик удерживания и термодинамических параметров адсорбции.

Третья глава диссертационной работы, изложенная на 30 страницах, содержит экспериментальные и теоретические данные по исследованию процессов удерживания и разделения энантиомеров ОПХ. Автором получены и объяснены данные, доказывающие влияние состава подвижной фазы на удерживание замещенных оксазолопирролохинолинов на колонках с привитыми эремомициновой и ристоцетиновой фазами. Показано, что использование в качестве подвижной фазы смеси воды и ацетонитрила позволяет разделять 4 замещенных компонента ОПХ на эремомициновой фазе. При этом установлена малая энантиоселективность и слабое удерживание, что объясняется автором слабым адсорбционным взаимодействием с группами хирального селектора. Весьма интересным представляется выявление влияния pH на хроматографическое поведение ОПХ, для чего использовались подвижные фазы на основе ацетатного буфера. Было установлено, что увеличение pH способствует разделению энантиомеров, подкисление приводит к отсутствию разделения, что объясняется автором изменением конформации селектора.

При переходе к колонке Nautilus-R с ристоцетиновой фазой была установлена большая энантиоселективность и более высокое удерживание по отношению к исследуемым ОПХ. Весьма важным является установленное влияние заместителя у хирального центра на селективность разделения энантиомеров при варьировании состава и свойств подвижной фазы. Данный факт был подтвержден на примере соединений, имеющих трет-бутильный заместитель (лучшее разделение рацематов) по сравнению с соединениями,

содержащими фенильные радикалы. Автором представлено объяснение, заключающееся в способности проникновения исследуемых соединений в хиральную полость привитого селектора, которая напрямую связана с размерами заместителей.

Следует отметить выявление немонотонной зависимости фактора удерживания от содержания органического растворителя в подвижной фазе. Предложено объяснение данного нетривиально факта, заключающееся в конкуренции факторов сольватации и адсорбции. Для учета их совместного действия автором была расширена модель Тсуи с учетом возможной сольватации и адсорбции обоих компонентов подвижной фазы, что позволило выявить особенности конкурентной адсорбции воды и метанола и сольватации адсорбционного комплекса.

При использовании колонки Chiribiotic-T, содержащей в качестве неподвижной хиральной фазы тейкопланин, было установлено, что общие закономерности удерживания ОПХ при элюировании водно-метанольными смесями аналогичны фазе с ристоцетином А. Однако было установлено, что энантиоселективность разделения на данной фазе, с увеличением концентрации метанола падала, в то время как на ристоцетиновой фазе – возрастала, что объяснялось снижением вклада гидрофобных взаимодействий при высоких концентрациях метанола.

Важным аспектом работы является расчет и интерпретация термодинамических характеристик процессов адсорбции ОПХ. Был установлен незначительный тепловой эффект, подтверждающий факт адсорбционного взаимодействия в исследуемых системах. Значения энтропийного фактора были связаны с особенностями сольватации. Установлено, что природа заместителя у хирального центра и наличие заместителей не оказывают значимого влияния на термодинамические параметры адсорбции.

В четвертой главе, изложенной на 37 страницах, диссертант приводит результаты исследования удерживания и разделения стереоизомеров

дипептидов. В работе показано, что для большинства рассматриваемых дипептидов энантиоразделение лучше для фаз с ристоцетином А. Закономерности удерживания дипептидов для колонок Nautilus-E и Nautilus-R близки, что объясняется автором различием в прочности образующихся комплексов. Установлено, что удерживание в системе метанол : вода зависит от гидрофобности пептида - гидрофильные пептиды элюируются дольше при увеличении доли метанола в подвижной фазе, что объяснялось влиянием сольватации аналита. Было установлено, что энантиомеры с D-конфигурацией в С-концевом положении сильнее связаны с хиральным сектором.

Важным результатом является установление влияния рН на параметры хроматографического удерживания дипептидов. Автором впервые рассмотрена связь параметров удерживания и ионной формой пептида с учетом диссоциации функциональных групп антибиотиков при изменении рН. Так, было показано, что удерживание слабокислых пептидов увеличивается с ростом рН, а кислых уменьшается. Данный эффект был объяснен изменением соотношения количества биполярных ионов, катионов и анионов пептида, а также изменением степени протонирования функциональных группы эремомицина и ристомицина А при изменении рН.

Основываясь на анализе зависимостей удерживания заряженных частиц автором был предложен смешанный ионообменно-адсорбционный механизм удерживания, в котором вклад ионообменной составляющей напрямую связан с содержанием ионизированных частиц дипептидов и степенью протонирования хирального селектора.

Установлено влияние способа иммобилизации фаз на энантиоселективность на примере двух ристоциновых колонок. Показано, что энантиоселективность Nautilus-R в несколько раз превышает Chirobiotic-R за счет наличия в структуре его селектора двух аминогрупп, по сравнению с одной в случае последней. Было предложено объяснение данному факту,

закрывающееся в том, что отсутствие атома азота вблизи хирального «кармана» способствует быстрому, но, непрочному связыванию.

Проведенное описание термодинамических характеристик взаимодействия дипептидов с подвижной и неподвижной фазами показало, что величины энтальпии для сильно удерживаемых (ионизированных) пептидов достигают значительных величин, свидетельствующих о присутствии в исследуемых системах ион-дипольных взаимодействий (водородных связей), способствующих энантиоселективному разделению.

Таким образом, диссертантом выполнено объемное, интересное исследование, к которому, однако, имеются **замечания**:

1. В тексте диссертации (глава 3, стр. 78-79) говорится об адсорбционном механизме удерживания, однако, автор, подробно рассмотрев влияние состава подвижной фазы на особенности удерживания ОПХ, достаточно поверхностно говорит об особенностях взаимодействия разделяемых компонентов с неподвижной фазой. Следовало бы более подробно описать взаимодействие «сорбент-сорбат» с выделением основных сил и их оценочной характеристикой.
2. Автор не приводит температурных зависимостей термодинамических характеристик, что было бы крайне полезным при их интерпретации.
3. В главе 3.2 обсуждается компенсационный эффект, построенный на данных одного эксперимента. Было бы более корректным провести независимое определение энтальпии с последующим сопоставлением экспериментальных и расчетных данных.
4. В главе 4.1.3 говорится о возможном протекании ионообменного процесса на основании косвенных данных. Для подтверждения этого факта было бы более корректным провести сравнение величин рН разделяемых растворов до и после процесса хроматографирования. Изменение рН является прямым доказательством протекания ионообменной сорбции.

5. При анализе влияния концентрации ацетонитрила в подвижной фазе (табл. 3.1, стр. 67) автор делает вывод об оптимальной концентрации данного компонента в подвижной фазе в 30%, хотя прямой корреляции между его содержанием и величинами удерживания не наблюдается.
6. На стр. 68 рассматривается влияние рН на хроматографическое поведение ОПХ. Автор говорит об изменении ионного состояния и конформации селектора в зависимости рН, однако, доказательств данного эффекта не приводится.
7. В тексте диссертации встречаются неудачные выражения, например, «измерение изотерм адсорбции» (стр. 78), «изучена термодинамика» (стр. 87) и т.п.

Указанные замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования Степановой М.В.

Заключение.

Диссертационная работа Степановой Марии Владимировны является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи по установлению закономерностей взаимодействия хиральных фаз и молекул органических амфолитов, имеющей существенное значение для специальности 1.4.4. Физическая химия.

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.4.4. Физическая химия в пункте 3 «Определение термодинамических характеристик процессов на поверхности, установление закономерностей адсорбции на границе раздела фаз и формирования активных центров на таких поверхностях».

Диссертация Степановой М.В. "Механизмы энантиоселективного удерживания хиральных веществ на неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками эремомицином, ристоцетином А и тейкопланином" удовлетворяет требованиям, предъявляемым к

кандидатским диссертациям в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденном Правительством Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (пункты 9-14) в действующей редакции, а ее автор, Степанова Мария Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия.

Официальный оппонент

доктор химических наук (02.00.04 – физическая химия), профессор,
профессор кафедры аналитической химии химического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Воронежский государственный университет»

Хохлов Владимир Юрьевич

394018, Россия, г. Воронеж, Университетская пл.,1.
тел. +7 (473) 220-87-97, e-mail: vladkh70@mail.ru

Даю согласие на обработку персональных данных.

«30» августа 2023 г.



федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Воронежский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «ВГУ»)

подпись Хохлов В.Ю.
бу специализист
Ср-Сейнскал должность 30.08.2023
подпись, расшифровка подписи