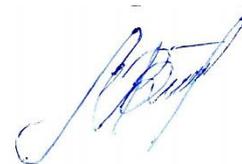


На правах рукописи



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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Саратов 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Пермский национальный исследовательский политехнический университет» на кафедре химии и биотехнологии

Научный руководитель:

Аснин Леонид Давыдович

кандидат химических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Яшкин Сергей Николаевич

доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный технический университет», профессор кафедры аналитической и физической химии

Хохлов Владимир Юрьевич

доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», профессор кафедры аналитической химии

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», г. Самара

Защита состоится 21 сентября 2023 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.392.03, созданного на базе ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского», по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корп. I, Институт химии СГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» (410012, г. Саратов, ул. Университетская, д. 42) и на сайте <https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-03/kandidatskaya-dissertaciya-stepanovoy-marii>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук, доцент

Русанова Т.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Хиральная хроматография является широко используемым методом получения энантимерно чистых веществ, необходимых для производства гомохиральных лекарственных препаратов. Создание эффективной хроматографической методики получения чистых энантимеров из синтетической рацемической смеси требует знания механизмов хирального разделения энантимеров, 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 энантимеров 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 энантимеров 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 родственным методам «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.

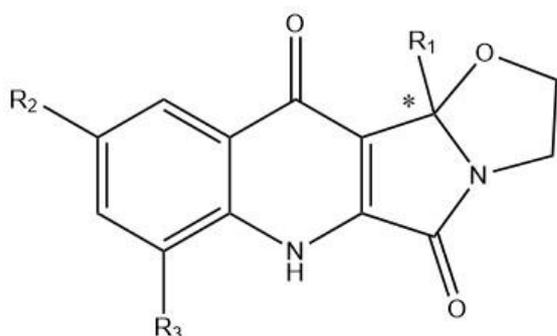
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы основные цели и задачи, рассматривается научная новизна и основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава обобщает литературные данные по хиральной жидкостной хроматографии на неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками. Первая часть обзора посвящена обсуждению особенностей теории хирального разделения, освещены основные методы изучения механизмов энантиораспознавания. Вторая часть описывает особенности строения и физико-химические свойства ХНФ на основе макроциклических антибиотиков тейкопланина, ристоцетина А, эремомицина и ванкомицина. Далее приведен обзор применения метода ВЭЖХ к изучению механизмов энантиоразделения хинолонов и дипептидов.

Вторая глава содержит сведения об объектах и методах исследования, реактивах и оборудовании, использованных при выполнении работы.

В работе экспериментально изучены 7 представителей рацемических ОПХ с различными заместителями у хирального центра молекулы (обозначен звездочкой на рис. 1) и на отдалении от него. Принадлежность пиков ОПХ энантиомерам определённой конфигурации определяли по знаку оптического вращения собранных после прохождения через колонку фракций. Вторую группу исследованных веществ представляют 8 дипептидов в виде индивидуальных энантиомеров: Leu-Leu, Leu-Gly, Gly-Leu, Gly-Asp, Ala-Ala, Gly-Ala, Ala-Gly и Leu-Tyr.



- I:** $R_1 = p\text{-BrC}_6\text{H}_4$, $R_2 = \text{F}$, $R_3 = \text{H}$;
- II:** $R_1 = m\text{-BrC}_6\text{H}_4$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$;
- III:** $R_1 = m\text{-(CF}_3\text{)C}_6\text{H}_4$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$;
- IV:** $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Et}$;
- V:** $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$;
- VI:** $R_1 = 2\text{-тиенил}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$;
- VII:** $R_1 = \text{C(CH}_3\text{)}_3$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{H}$

Рисунок 1 – Структура исследованных оксазолопирролохинолонов.

В качестве неподвижных фаз использовали адсорбенты на основе силикагеля с привитыми макроциклическими антибиотиками: Nautilus-R с ристоцетином А и Nautilus-E с эремомицином производства ЗАО «БиоХимМак СТ» (Россия), Chirobiotic-R с ристоцетином А и Chirobiotic-T с тейкопланином производства Supelco (США). Адсорбенты с размером частиц 6 мкм (БиоХимМак СТ) или 5 мкм (Supelco) были упакованы производителями в металлические колонки (250 × 4.6 мм). Работа выполнялась на хроматографе LC-20 ADXR (Shimadzu, Япония), оснащенный прецизионным насосом, диодно-матричным детектором, автодозатором и термостатом колонок. В качестве ПФ использовали буферные и безбуферные смеси воды и ацетонитрила в диапазоне концентраций органического компонента от 30 до 100% (здесь и далее указываются объемные проценты).

Для вычисления термодинамических характеристик адсорбции проводили измерения факторов удерживания (k) при 20, 25, 30 и 40°C. Стандартные молярные изменения энтальпии ($\Delta\bar{H}^0$) и энтропии ($\Delta\bar{S}^0$) адсорбата при переходе из элюента в равновесное адсорбированное состояние (далее энтальпия и энтропия адсорбции) вычисляли по уравнению Вант-Гоффа:

$$\ln k = -\frac{\Delta\bar{H}^0}{RT} + \frac{\Delta\bar{S}^0}{R} + \ln \phi \quad (1)$$

где T – абсолютная температура колонки, R – универсальная газовая постоянная, а ϕ – отношение объемов твердой и жидкой фаз. Эту величину рассчитывали через геометрический (V_{col}) и мертвый объемы колонки как $\phi = (V_{col} - V_0)/V_0$. Мертвый объем колонки определяли по 1,3,5-три-*трет*-бутилбензолу. Линейная зависимость в координатах $\ln k - 1/T$ с коэффициентом корреляции не меньше 0.998 наблюдалась для всех исследованных систем.

Расчет геометрии молекул осуществляли методом MM2 для условий газовой фазы, используя модуль ChemBio 3D из программного пакета ChemOffice 2008 (Perkin Elmer Informatics Inc.). Коэффициент распределения ОПХ в системе *n*-октанол/вода (K_{ow}), служивший для оценки их гидрофобности, находили методом инкрементов, встроенном в модуль ChemBioDraw программного пакета ChemOffice 2008.

Третья глава описывает результаты изучения хроматографического поведения и термодинамики адсорбции хиральных ОПХ на колонках Nautilus-E, Nautilus-R и Chirobiotic-T. Закономерности удерживания рацематов ОПХ на эремомициновой фазе изучали, используя смеси воды или 0.1 М ацетатного буфера с CH_3OH или CH_3CN , варьируя содержание органического компонента. Показана возможность хроматографического разделения ОПХ **IV**, **V**, **VI**, **VII** на ХНФ Nautilus-E (рис. 2). Адсорбент демонстрирует невысокую энантио-селективность ($\alpha = 1.1-1.2$) и слабое удерживание исследуемых соединений, что позволяет предположить адсорбционное взаимодействие с периферийными группами хирального селектора без образования прочных комплексов включения.

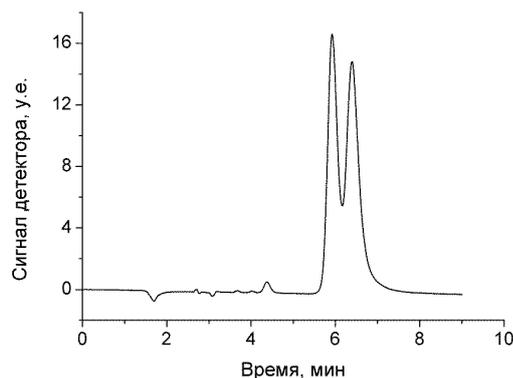


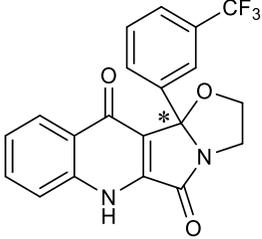
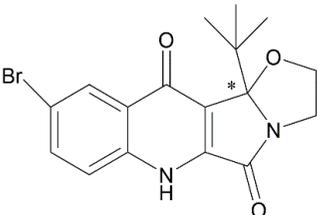
Рисунок 2 – Хроматограмма рацемата соединения **IV** на колонке Nautilus-E. Элюент: вода-ацетонитрил (70:30), температура 25°C, скорость подвижной фазы 1 мл/мин.

На характеристики удерживания сильно влияет соотношение водного и органического компонентов ПФ, тогда как эффект буферных добавок и pH растворителя невелик. Оптимальной концентрацией органического растворителя для разделения энантиомеров было 50% для CH₃OH и 30% для CH₃CN.

Хотя качественно хроматографическое поведение ОПХ не отличалось в исследованных системах (H₂O-MeOH и H₂O-MeCN), термодинамический анализ выявил значимые различия в энергетике адсорбции в этих растворителях, что обусловлено различием в процессах сольватации в разных элюентах.

На колонке Nautilus-R было изучено хроматографическое поведение и термодинамика адсорбции семи рацемических ОПХ при элюировании водно-метанольными и водно-ацетонитрильными смесями. В табл. 1 в качестве примера приводятся данные для двух веществ. Данная колонка характеризовалась в целом более высокими коэффициентами удерживания и энантиоразделения исследуемых веществ, чем Nautilus-E, в сопоставимых условиях. Молекулярный скелет ристоцетина А представлен макроциклами, формирующими объемную структуру, именуемую «карманом», с С-образным отверстием с минимальным диаметром 5.2 Å. Было выдвинуто предположение, что адсорбционный комплекс образуется путем вхождения оксазольного фрагмента молекулы адсорбата внутрь хиральной полости привитого селектора, при этом остальные фрагменты молекулы адсорбата играют второстепенную роль, взаимодействуя с периферийными участками селектора (рис. 3). Соединение **VII** с небольшим, но разветвлённым *трет*-бутильным заместителем у хирального центра характеризуется наилучшим энантиоразделением. Очевидно, размер этого заместителя способствует более выгодному расположению молекулы сильнее удерживаемого энантиомера **VII** внутри хиральной полости селектора.

Таблица 1 – Факторы удерживания и энантиоселективность энантиомеров некоторых оксазолопирролохинолонов на колонках Nautilus-R и Chirobiotic-T для различных составов подвижных фаз

Соединение (lgK _{ow})	Nautilus-R						Chirobiotic-T			
	CH ₃ CN			CH ₃ OH			CH ₃ OH			
	φ, %	k ₁	k ₂	α	k ₁	k ₂	α	k ₁	k ₂	α
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	
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	

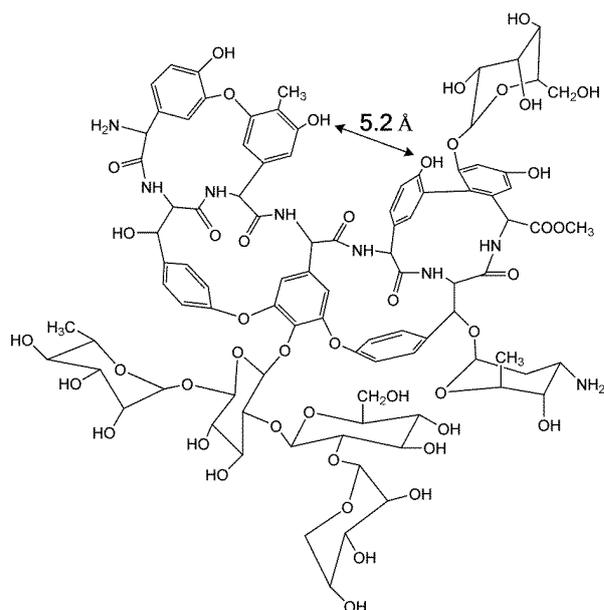
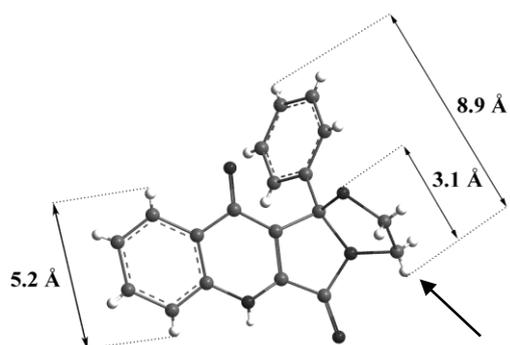


Рисунок 3 – Структуры соединения **V** (вверху) и хирального селектора ристоцетина **A** (внизу).

Стрелка указывает на оксазольный фрагмент молекулы **V**.

доля десорбента в составе ПФ) на графиках наблюдались отклонения от линейной зависимости. Сделан вывод, что на убывающей ветви контролирующим фактором в удерживании ОПХ является элюирующая способность ПФ, определяемая содержанием ацетонитрила, а на возрастающей ветви важным фактором становится десорбирующая активность воды, конкурирующей за взаимодействие с протонодонорными/акцепторными группами привитого селектора с молекулами адсорбента. (Этот фактор заметен только при низком содержании воды, поскольку при более высокой её концентрации все центры прочной брэнстедовской адсорбции экранированы.) Тот факт, что и в этом диапазоне модель Снайдера-Сочевинского не выполняется, объясняется, по-видимому, десорбирующей активностью ацетонитрила – согласно указанной модели только один компонент ПФ должен играть роль десорбента.

Зависимость k от концентрации CH_3CN в ПФ имеет U-образную форму, что свидетельствует о действии факторов противоположной природы (рис. 4). Замена ацетонитрила на метанол ведет к исчезновению возрастающей ветви в области составов ПФ с высоким содержанием органического компонента ($> 90\%$), указывая на то, что образование водородных связей играет важную роль в десорбирующей активности элюента.

Графики зависимости фактора удерживания от доли ацетонитрила, построенные в координатах распределительной модели ($\lg k - \varphi$), имели высокие значения коэффициента линейной корреляции на убывающей ветви зависимости ($\varphi < 50\%$). Линейность исчезала на возрастающей ветви ($\varphi > 80\%$) (рис. 5). В координатах адсорбционной модели Снайдера-Сочевинского ($\lg k - \lg x_D$; x_D – мольная

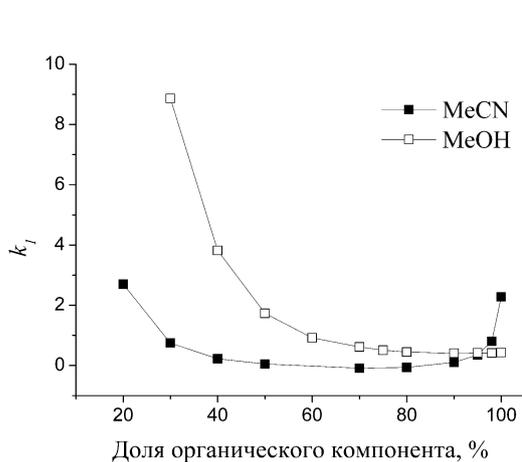


Рисунок 4 – Коэффициент удерживания первого элюируемого энантиомера соединения IV на колонке Nautilus-R в зависимости от доли органического компонента.

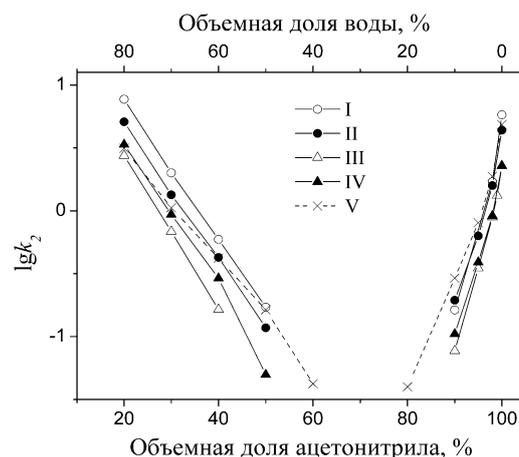


Рисунок 5 – Зависимость логарифма фактора удерживания второго элюируемого энантиомера от состава подвижной фазы на колонке Nautilus-R. На нижней шкале показана концентрация ацетонитрила, на верхней – воды.

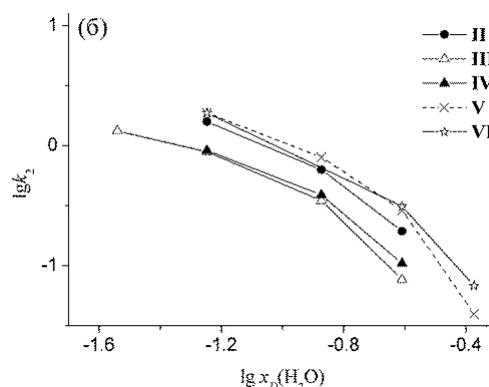
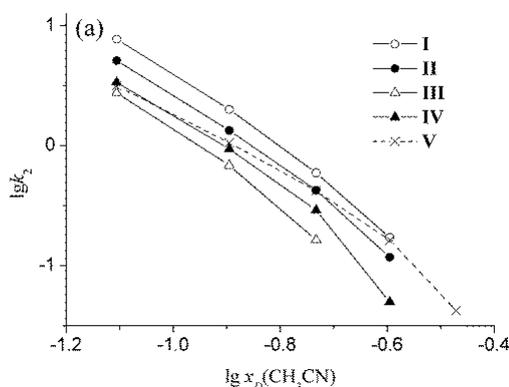
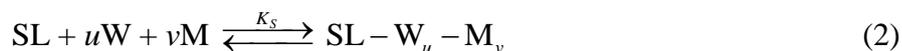


Рисунок 6 – Зависимость фактора удерживания второго элюируемого энантиомера от состава ПФ для убывающей ветви зависимости $k(\varphi)$ как функция мольной доли ацетонитрила (а) и для возрастающей ветви зависимости $k(\varphi)$ как функция мольной доли воды (б) в координатах модели Снайдера-Сочевинского для колонки Nautilus-R.

Для учёта совместного действия факторов сольватации и вытеснительной адсорбции была модифицирована (расширена) модель Тсуи и др¹. В оригинальной модели допускается, что только один компонент бинарной ПФ выступает в качестве и сольватирующего агента и десорбента. Мы предположили, что оба компонента ПФ, и вода (W) и органический растворитель (M), участвуют в сольватации молекул адсорбата (SL) в

¹ Tsui H.W., Kuo C.H., Huang Y.C. // J. Chromatogr. A, 2019. V. 1595. P. 127

жидкой фазе (уравнение (2)) и конкурируют с ними за взаимодействие с адсорбционным центром (А) (уравнение (3)):



где x и y – число молекул воды и органического растворителя, вытесняемых с адсорбционного центра молекулами адсорбата, u и v – число молекул воды и органического растворителя, составляющих сольватную оболочку адсорбата. K_S и K_A – константы равновесия соответствующих реакций. Можно показать, что в этом случае зависимость фактора удерживания от состава ПФ будет выглядеть следующим образом:

$$k = \frac{K_A q^* \phi}{C_W^x C_M^y \cdot (1 + K_S C_W^u C_M^v)} \quad (4)$$

где C_W и C_M – молярная концентрация воды и органического компонента в ПФ соответственно, q^* – концентрация адсорбционных центров. Множитель $(K_A q^* \phi)$ является постоянной величиной и в регрессионной процедуре использовался как подгоночный параметр.

Модель не могла быть использована для описания удерживания из смесей вода-ацетонитрил, поскольку в этих системах имеется широкий участок, от 50-60 до 80% CH_3CN , полной потери удерживания. Уравнение (4) не может описать этот участок, поскольку для $k = 0$ C_W или C_M должна стремиться к бесконечности. В то же время, расширенная модель Тсуи и др. хорошо описывала данные для ПФ вода-метанол (см. пример на рис. 7).

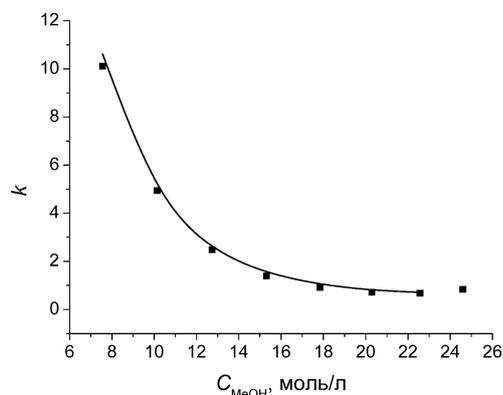


Рисунок 7 – Зависимость фактора удерживания первого элюируемого энантиомера соединения **V** от концентрации метанола на колонке Nautilus-R. Точками обозначены экспериментальные данные, линией – результат аппроксимации уравнением (4).

Аппроксимацию осуществляли в диапазоне концентраций последнего от 30 до 95-98%. Удерживание в чистом метаноле не учитывалось, поскольку при $C_M = 0$ уравнение теряет физический смысл. Модель позволила оценить соотношение молекул воды и метанола, вытесняемых с поверхности адсорбционного центра. Оно для всех исследованных веществ находится в пределах (0.1-0.3):(1.4-1.8). Низкие значения для воды, по-видимому, означают, что при адсорбции ОПХ молекулы воды не вытесняются, а остаются связанными с хиральным селектором. Результаты аппроксимации также показывают, что вода слабо участвует в сольватации ОПХ (коэффициент $u < 0.2$), таким образом её роль сводится, главным образом, к экранированию центров прочного связывания.

Лучшее разделение энантимеров ОПХ на Nautilus-R достигалось в водно-метанольных средах. Это может быть связано с особенностями взаимодействия ПФ с хиральным селектором или особенностями сольватации растворителем адсорбционного комплекса. Это не может объясняться сольватацией адсорбата в ПФ, поскольку последний – ахиральный процесс, и он не влияет на величину α .

Термодинамические характеристики адсорбции в ПФ H_2O-CH_3CN приведены в табл. 2. Значения энтальпии адсорбции в ПФ с высоким содержанием воды в 1.7-2.2 раза выше, чем в маловодной ПФ, что объясняется влиянием процесса сольватации. Энтальпия сольватации входит в величину $\Delta\bar{H}^0$ с обратным знаком, так как для адсорбции необходимо разрушение сольватной оболочки адсорбата.

Таблица 2 – Термодинамические характеристики адсорбции ОПХ на хиральной неподвижной фазе Nautilus-R

Вещество	$\Delta\bar{H}^0_1$, Дж/моль	$T\Delta\bar{S}^0_{1*}$, Дж/моль	$\Delta\bar{G}^0_1$, Дж/моль	$\Delta\bar{H}^0_2$, Дж/моль	$T\Delta\bar{S}^0_{2*}$, Дж/моль	$\Delta\bar{G}^0_2$, Дж/моль
ПФ: 30% CH_3CN						
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_3CN						
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).

В ПФ с 98% CH_3CN энтальпия сольватации имела более высокое (и отрицательное) значение и понижала теплоту адсорбции. Это происходило благодаря лучшему (по сравнению с водой) сродству ацетонитрила к гидрофобным молекулам ОПХ. Расчет разности термодинамических показателей адсорбции, $\Delta\bar{X}^0 = \Delta\bar{X}_2^0 - \Delta\bar{X}_1^0$, где $X = H, S$ или G , а индексы указывают на первый и второй элюируемые энантиомеры, показал, что энантиоразделение, так же, как и удерживание, контролируется энтальпийным фактором, то есть различием в прочности образующихся комплексов между энантиомерами и хиральным селектором. Энтропийный терм, характеризующий структурные изменения в системе, оказывает негативное влияние на энантиоселективность ($T\Delta\bar{S}^0 < 0$).

Энтальпия и энтропия адсорбции в водно-метанольных системах были выше по абсолютной величине, чем в растворах с ацетонитрилом. Метанол сольватирует гидрофобные молекулы ОПХ хуже, чем ацетонитрил, что (а) повышает степень беспорядка в системе и ведет к увеличению энтропийного термина и (б) обуславливает меньшую энтальпию сольватации и, следовательно, больший тепловой эффект адсорбции по сравнению с ацетонитрильными элюентами.

Исследование хроматографического поведения ОПХ на ХНФ Chirobiotic-T показало, что для получения воспроизводимых результатов в качестве ПФ должны использоваться смеси, модифицированные добавкой электролита. Тейкопланин обладает более сильными кислотными свойствами, чем эремомицин и ристоцетин А. Видимо, это являлось причиной отсутствия воспроизводимости в безбуферных ПФ. Удерживание ОПХ на Chirobiotic-T в целом было ниже, чем на Nautilus-R, однако общие закономерности удерживания при элюировании водно-метанольными смесями сохранялись. Основное различие двух селекторов проявлялось во влиянии концентрации метанола в ПФ на энантиоселективность. Селективность возрастала с увеличением доли метанола для колонки с ристоцетином А, тогда как на колонке с привитым тейкопланином фактор разделения убывал. Кроме того, рацематы, хорошо делившиеся на Chirobiotic-T, плохо делились или не делились на Nautilus-R и наоборот. Такая взаимная дополнительность разделяющей способности хиральных селекторов известна как соотношение комплементарности.

Четвертая глава описывает исследования энантиоселективной адсорбции дипептидов на ХНФ Nautilus-E, Nautilus-R и Chirobiotic-R. Наличие карбоксильной и аминных групп в составе данных селекторов позволяет изучить их способность вовлекаться в ион-ионные взаимодействия с дипептидами. Эремомицин имеет способную к диссоциации карбоксильную группу, в отличие от ристоцетина А, у которого она

метилована. Ристоцетиновые ХНФ разных производителей отличаются способом прививки к силикагелю.

Дипептиды могут существовать в растворе в виде нескольких ионных форм, наиболее вероятные из которых: анионная, катионная и цвиттер-ионная. Нейтральная незаряженная форма в водно-органических растворах маловероятна и её присутствием в нижеприведённых расчётах пренебрегали. Каждая форма может характеризоваться своим сродством к хиральному селектору, и общее удерживание будет усредненной характеристикой по парциальным удерживаниям всех форм. На рис. 8 приведены графики распределения разных форм дипептидов Leu-Leu и Gly-Asp как функции рН водно-метанольного раствора.

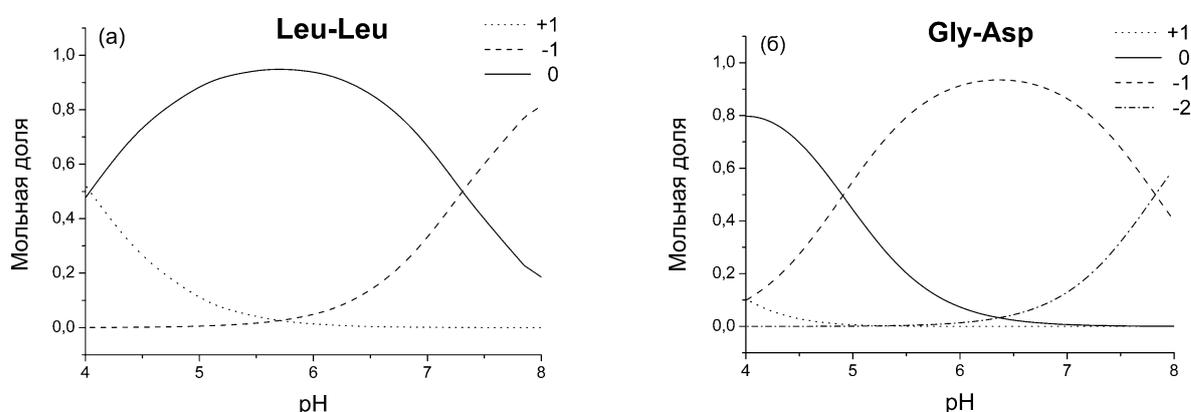


Рисунок 8 – Влияние рН на ионизацию а) Leu-Leu, б) Gly-Asp в 60% метаноле. Сплошной линией обозначено изменение доли цвиттер-ионной формы, пунктиром – катионной, штриховой линией – анионной, штриховой с точкой – катион-дианионной формы

Хроматографическое удерживание дипептидов было изучено в водно-метанольных буферных ПФ с долей метанола 40, 60, 80 и 90% в диапазоне рН 3.8-7.8. При измерении рН водно-органических подвижных фаз рН-метром со стеклянным электродом, откалиброванным по водным буферным растворам, учитывали, что измеренное (кажущееся) значение pH_a сдвинуто относительно истинного значения в данном растворителе на величину поправки δ , зависящей от состава растворителя.

На ХНФ Nautilus-E и Nautilus-R с ростом концентрации метанола в ПФ (при постоянном рН) растет удерживание относительно гидрофильных дипептидов Gly-Asp, Ala-Ala, Gly-Leu, а удерживание липофильного Leu-Leu уменьшается. Оптимальное разделение на указанных ХНФ было достигнуто при 60% метанола (см. табл. 3). При содержании метанола 40% гидрофильные дипептиды элюировались раньше мертвого времени. Энантимеры с D-конфигурацией в C-концевом положении сильнее связывались с хиральным селектором, кроме слабоудерживаемого Leu-Tyr (табл. 3).

Таблица 3 – Факторы удерживания и коэффициенты разделения энантиомеров дипептидов на колонках Nautilus-E и Nautilus-R как функция pH подвижной фазы*

pH	Nautilus-R					Nautilus-E					
	3.86	4.80	5.33	5.86	6.79	3.86	4.80	5.33	5.86	6.79	
Leu-Leu	k_{DL}	-0.06	0.20	0.23	0.23	0.22	0.07	0.28	0.30	0.30	0.32
	k_{LL}	-0.06	0.22	0.28	0.30	0.28	-0.06	0.32	0.40	0.42	0.48
	k_{LD}	0.33	0.65	0.66	0.66	0.82	0.37	0.73	0.70	0.80	1.31
	k_{DD}	1.64	4.13	4.62	4.53	4.23	1.80	4.76	5.24	5.26	6.64
	$\alpha_{DD/LL}$	-	19.24	16.39	15.00	14.96	-	14.74	13.02	12.42	13.87
	$\alpha_{LD/DL}$	-	3.26	2.90	2.95	3.72	5.56	2.64	2.37	2.68	4.10
Ala-Ala	k_{LL}	0.19	0.43	0.46	0.46	0.45	0.08	0.41	0.44	0.43	0.46
	k_{DD}	2.45	4.54	4.57	4.38	4.73	0.59	1.28	1.34	1.40	2.33
	$\alpha_{DD/LL}$	12.63	10.54	9.85	9.48	10.42	7.35	3.15	3.06	3.23	5.02
Leu-Gly	k_L	0.25	0.44	0.45	0.45	0.25	0.16	0.38	0.39	0.39	0.47
	k_D	0.44	0.72	0.72	0.78	0.67	0.23	0.48	0.49	0.49	0.60
	$\alpha_{D/L}$	1.80	1.64	1.60	1.71	2.65	1.41	1.26	1.24	1.23	1.28
Gly-Leu	k_L	0.20	0.36	0.39	0.40	0.40	0.11	0.46	0.49	0.48	0.51
	k_D	2.70	4.69	4.77	4.50	4.15	0.57	1.27	1.32	1.32	1.96
	$\alpha_{D/L}$	13.61	12.96	12.15	11.39	10.28	5.26	2.79	2.70	2.73	3.81
Leu-Tyr	k_L	0.07	-	-	-	0.38	0.14	0.49	0.53	0.54	0.62
	k_D	0.17	-	-	-	0.33	0.23	0.40	0.40	0.39	0.41
	$\alpha_{D/L}$	2.56	-	-	-	0.85**	1.64	0.83**	0.76**	0.73**	0.66**
Ala-Gly	k_L	0.56	0.89	0.88	0.84	0.80	0.23	0.48	0.49	0.48	0.54
Gly-Ala	k_L	0.19	0.47	0.49	0.49	0.50	0.19	0.49	0.50	0.50	0.53
Gly-Asp	k_L	1.28	1.37	1.18	0.99	0.72	4.19	4.47	3.37	2.45	1.70
	k_D	3.50	3.36	2.36	1.59	0.96	5.60	5.83	4.31	3.09	2.35
	$\alpha_{D/L}$	2.73	2.45	2.01	1.61	1.34	1.34	1.31	1.28	1.26	1.38

*Подвижная фаза: 0.1 М натриево-ацетатный буфер в 60% метаноле;

** Значения $\alpha < 1$ означают обращение порядка выхода энантиомеров относительно указанного.

На обеих ХНФ были полностью или частично разделены все четыре изомера Leu-Leu. Порядок выхода со всеми исследованными элюентами был одинаковый: DL < LL < LD < DD.

Влияние pH на удерживание определяется кислотностью исследуемых веществ. Удерживание слабокислых дипептидов с $pI > 5$ увеличивается с ростом pH, тогда как удерживание относительно кислого дипептида Gly-Asp ($pI = 3$) уменьшается с ростом pH (рис. 9).

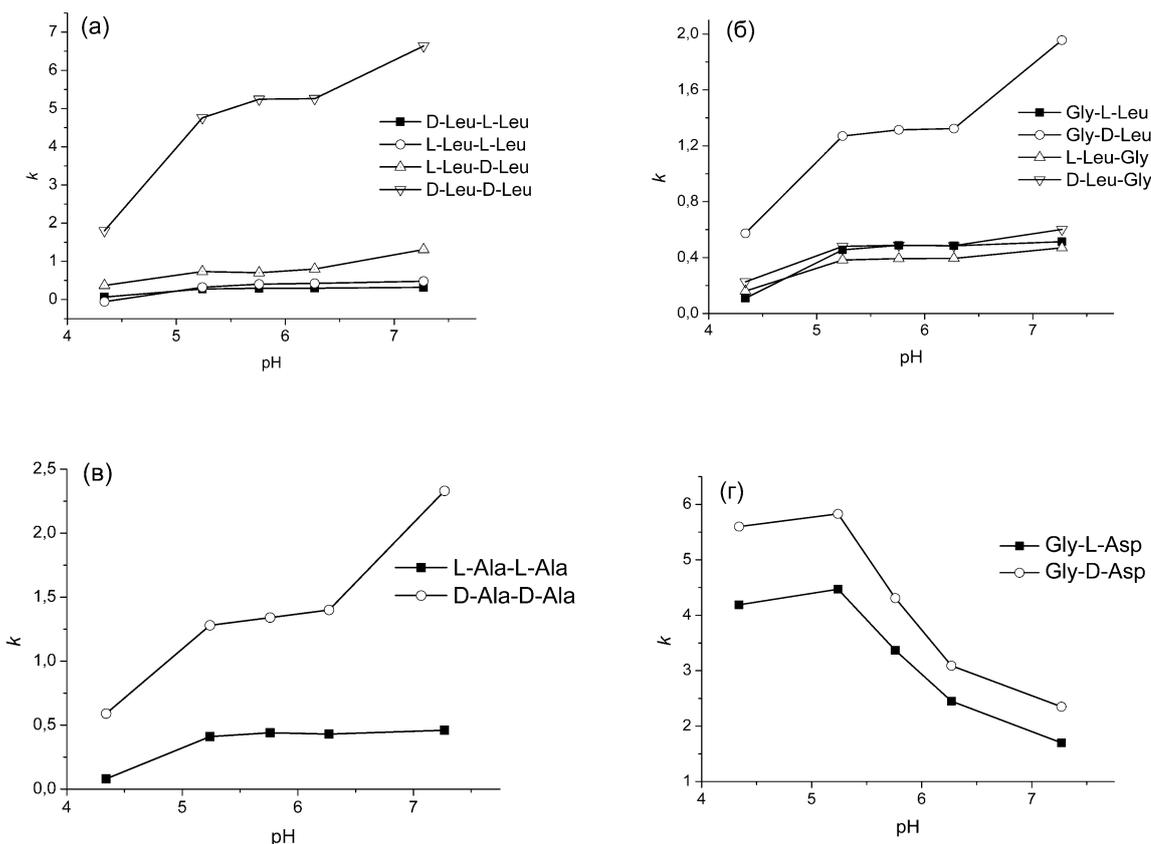


Рисунок 9 – Влияние pH на удерживание дипептидов на ХНФ Nautilus-E. Элюент: 60% MeOH. $T = 25^\circ\text{C}$. а) Leu-Leu; б) Leu-Gly и Gly-Leu; в) Ala-Ala; г) Gly-Asp.

Зависимости $k(\text{pH})$ в области резкого подъема ($\text{pH} = 4.3\text{--}5.2$) для слабокислых дипептидов и падения k для Gly-Asp при $\text{pH} > 5.2$ коррелируют с содержанием цвиттер-иона в элюенте. Второй резкий подъем на графиках на рис. 9 (а, б, в) (Nautilus-E) совпадает с ростом концентрации дипептид-аниона и объясняется участием карбоксильной группы дипептида в качестве акцептора водородной связи при взаимодействии с амидными NH-группами пептидного скелета макроцикла. Интересно, что на ристоцетиновой ХНФ второй подъем k отсутствует, что, по-видимому, объясняется различием в строении двух ХНФ, обуславливающим доступность их аминок групп.

Для кислого дипептида Gly-Asp, имеющего в своем составе две карбоксильные группы, уменьшение фактора удерживания по S-образной траектории в диапазоне pH 5.2–7.3 (рис. 9 г) также коррелирует со снижением доли цвиттер-ионной формы ($\frac{1}{3}\text{HN} - \text{R} - (\text{COO}^-) - \text{COOH}$), при этом концентрация катион-дианиона ($\frac{1}{3}\text{HN} - \text{R} - (\text{COO}^-) - \text{COO}^-$) в ПФ растет. Очевидно, большим сродством к привитому эремомицину обладают частицы с протонированной терминальной карбоксильной группой: катион и цвиттер-ион. Катион-дианион, хотя и связывается с селектором слабее, тем не менее, обеспечивает удерживание на уровне $k \approx 1$ в нейтральной среде. Более того, было показано, что эта форма характеризуется большей энантиоселективностью. Примечательно, что зависимость $k(\text{pH})$ для Gly-Asp на ХНФ Nautilus-R с привитым ристоцетином А (у которого карбоксильная группа метилирована), имеет такую же S-образную убывающую форму, как на Nautilus-E. Это подтверждает гипотезу о преимущественном взаимодействии глициласпарагиновой кислоты с привитым эремомицином без образования ион-ионной связи между аминогруппой дипептида и карбоксильной группой селектора.

Простейшей теорией, описывающей удерживание ионизируемых веществ, является теория Хорвата-Меландера-Молнара (ХММ), согласно которой каждая ионная форма адсорбата A_j взаимодействует с поверхностным лигандом L по уравнению $A_j + L = A_jL$. Общее удерживание определяется суммой парциальных удерживаний всех форм с учётом их долей в жидкой фазе f_j : $k(\text{pH}) = \sum k_j f_j(\text{pH})$. Приведенное уравнение не описывало экспериментальных данных, что заставляло предположить более сложный механизм удерживания, чем допускался теорией ХММ. Например, полное или частичное участие ионного обмена. Для проверки этой гипотезы были проведены эксперименты по влиянию индифферентного электролита (NaCl) на фактор удерживания на колонке Nautilus-E. В случае чисто ионообменного механизма должна была наблюдаться линейная зависимость k от $1/C_{\text{NaCl}}$. Как показано на рис. 11, такая зависимость не наблюдалась, хотя добавление NaCl вело к уменьшению фактора удерживания: монотонному в нейтральной среде и немонотонному в слабокислой среде.

Логично предположить смешанный ионообменно-адсорбционный механизм удерживания. Отличие хроматографического поведения исследованных веществ при разных значениях pH можно объяснить, во-первых, разным соотношением между ионными формами адсорбата в разных средах и, во-вторых, отличием в ионном состоянии хирального селектора – в кислой среде все аминогруппы селектора будут протонированы, в нейтральной среде примерно половина аминогрупп будет депротонирована.

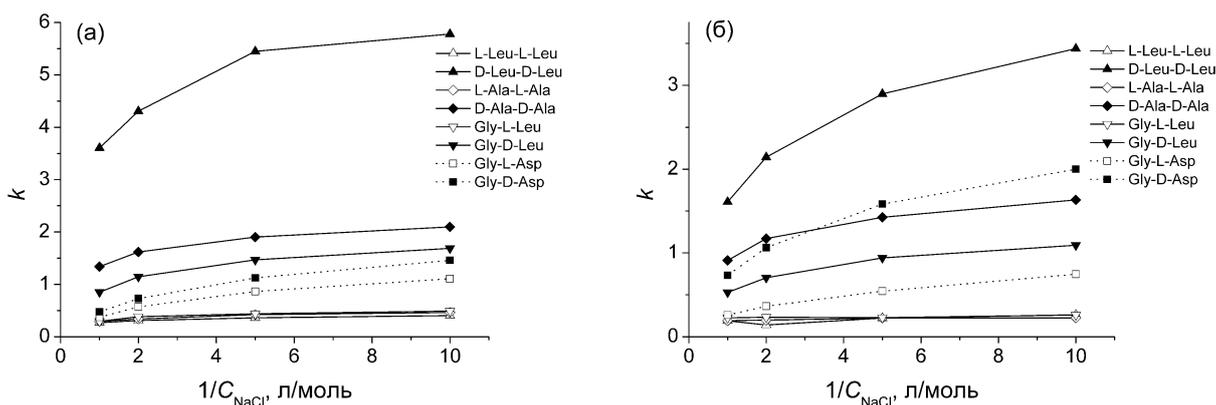


Рисунок 11 – Влияние нейтрального электролита на удерживание некоторых дипептидов на колонке Nautilus-E. а) ПФ с pH=7.2; б) ПФ с pH=4.5.

Сравнение двух ристоцетиновых колонок, Chirobiotic-R (антибиотик привит к силикагелю через уреидный мостик) и Nautilus-R (через эпоксидный мостик), продемонстрировало сильный эффект способа иммобилизации на свойства ХНФ. Энантиоселективность Nautilus-R превышала таковую Chirobiotic-R в несколько раз. В результате различия иммобилизующих реакций селектор Nautilus-R обладает двумя аминогруппами, а Chirobiotic-R одной или менее в зависимости от глубины протекания реакции. Сделано предположение, что у части селекторов Chirobiotic-R деактивируется та аминогруппа, которая участвует в энантиоселективном связывании дипептидов.

Термодинамические характеристики адсорбции также зависят от состава ПФ; их изучение позволяет лучше понять механизмы удерживания. Его характер отличается для ХНФ с ристоцетином А и эремомицином (сравнение выполнено для водно-метанольных ПФ). Теплоты адсорбции на ристоцетиновой колонке больше в 1.5-10 раз и для сильно удерживаемых энантиомеров достигают значений 30-35 кДж/моль. Показательно сравнение разностных характеристик. Величины $\Delta\Delta\bar{H}^0$ для энантиомерных пар на Nautilus-R достигают значений 15-20 кДж/моль, что сопоставимо с энергией водородной связи, тогда как на Nautilus-E эта величина в большинстве случаев варьировала в диапазоне от -5 до 5 кДж/моль и не превышала по абсолютному значению 8 кДж/моль. Это свидетельствует о высокой комплементарности хирального «кармана» молекулы ристоцетина А и сильнее удерживаемого энантиомера (всегда это энантиомер с D-аминокислотой в C-терминальном положении). В случае эремомицина топология хирального «кармана» не обеспечивает такой хорошей комплементарности. Об этом свидетельствуют и меньшие значения энтропии адсорбции на Nautilus-E.

$\Delta\bar{S}^0$, будучи отрицательной величиной, уменьшала абсолютное значение свободной энергии адсорбции. На обоих ХНФ за несколькими исключениями,

наблюдавшимися на Nautilus-E, энтропийный терм составлял меньшую долю энтальпийного для сильнее удерживаемого энантиомера. Таким образом, энантиоразделение в основном осуществляется благодаря различию в энергии образуемых адсорбционных комплексов, а структурные перестройки, включая эффекты сольватации, играют при этом хотя и заметную, но вторичную роль.

Замена метанола на ацетонитрил в составе ПФ привела к уменьшению (по абсолютной величине) как энтальпии, так и энтропии адсорбции на 10–80%. Поскольку снижение наблюдается и в разностных характеристиках, которые не зависят от эффектов сольватации в жидкой фазе, очевидно, что влияние органического компонента не ограничилось изменением теплоты и энтропии сольватации, но затронуло процессы, протекающие на поверхности адсорбента, в том числе влияющие на энантиоселективность, которая меньше в водно-ацетонитрильных элюентах.

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, эремомицином 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.

Основное содержание диссертации опубликовано в работах:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК:

1. Asnin L.D., **Stepanova M.V.** Van't Hoff analysis in chiral chromatography // Journal of Separation Science. – 2017. – V. 41. – № 6. – P. 1319–1337.
2. 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 академии наук. Серия химическая. – 2019. – № 12. – С. 2232–2240.
3. **Степанова М.В.**, Аснин Л.Д., Ботева А.А., Красных О.П., Фефилова И.В. Закономерности энантиоселективного удерживания хиральных оксазолопирролохинолонов на неподвижной фазе с привитым антибиотиком ристоцетином А // Журнал физической химии. – 2021. – Т. 95. – № 1. – С. 293–300.
4. Kopchenova M.V., **Stepanova M.V.**, Asnin L.D. Unusual difference in enantioselectivity of two chiral stationary phases with grafted antibiotic ristocetin A // Chromatographia. – 2021. – № 84. – P. 307–311.
5. **Степанова М.В.**, Аснин Л.Д., Ботева А.А. Закономерности энантиоселективного удерживания хиральных оксазолопирролохинолонов на неподвижной фазе с привитым антибиотиком ристоцетином А из водно-метанольных растворов // Журнал физической химии. – 2023. – Т. 97. – № 2. – P. 131–139.

Другие публикации:

1. **Степанова М.В.**, Аснин Л.Д., Ботева А.А., Кудинов А.В. Хроматографическое поведение и термодинамика адсорбции хиральных пирролохинолонов на силикагеле с

привитым антибиотиком эремомицином // Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология. – 2018. – № 4. – С. 20–34.

2. **Степанова М.В.**, Аснин Л.Д., Ботева А.А., Красных О.П. Энантиоселективная хроматография хиральных пирролохинолонов на неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками // X междунар. конф. молодых ученых по химии "Менделеев 2017". – Электрон. дан. – СПб: СПбГУ, 2017. – С. 513.

3. **Степанова М.В.**, Аснин Л.Д., Ботева А.А., Красных О.П., Али И. Хроматографическое разделение энантиомеров биологически активных 4-оксохинолинов // Всерос. научно-практ. конф. «Химия. Экология. Урбанистика», тезисы докладов. – Пермь: Изд-во ПНИПУ, 2017. – Т.1. – С. 432–436.

4. **Степанова М.В.**, Аснин Л.Д., Ботева А.А., Красных О.П. Энантиоселективная адсорбция хиральных хинолонов на силикагеле с привитым антибиотиком эремомицином // Физико-химические проблемы адсорбции в нанопористых материалах: материалы Всерос. симпоз. с междунар. участием 21 – 25 мая 2018 года, Москва–Клязьма, Россия. – М.: ИФХЭ РАН, 2018. – 310 с. ISBN 978–5–4465–1841–5.

5. **Степанова М.В.**, Аснин Л.Д. Удерживание и разделение дипептидов на хиральной неподвижной фазе модифицированной антибиотиком ристоцетином А // Химия. Экология. Урбанистика: материалы всерос. научно-практ. конф. с междунар. уч. г. Пермь, 18-19 апреля 2019 г. – Пермь: Изд-во ПНИПУ, 2019. Т. 1. – С.335–339.

6. **Stepanova M.V.**, Asnin L.D. Retention and enantioseparation of dipeptides on chiral stationary phase with bonded antibiotic Ristocetin // 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. – University of Milano-Bicocca, Milan, 16-20 June 2019. – Section "Fundamentals. Chiral separations". – P. 115.

7. **Степанова М.В.** Исследование энантиоселективного удерживания пирролохинолонов в условиях ВЭЖХ // Химия. Экология. Урбанистика: материалы всерос. научно-практ. конф с междунар. уч. г. Пермь, 23–24 апреля 2020 г. – Пермь: Изд-во ПНИПУ, 2020. Т. 2. – С.187–190.

8. **Степанова М.В.**, Аснин Л.Д., Ботева А.А. Энантиоселективная хроматография оксазолопирролохинолонов на неподвижной фазе с привитым антибиотиком ристоцетином // Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез: материалы IV Всерос. конф. с междунар. уч. г. Краснодар, 27 сентября–3 октября 2020 г.