

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА**

**Химический факультет**

*На правах рукописи*



**Федорова Ирина Александровна**

**ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ И СМЕШАННЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ  
ЭРЕМОМИЦИНА ДЛЯ ХИРАЛЬНОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель  
к.х.н., доц. Шаповалова Е.Н.

Москва – 2017

## Содержание

Список используемых сокращений .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
Глава 1. Эремомицин как хиральный селектор для разделения оптических изомеров веществ .....	13
1.1. Эремомицин как хиральный селектор для энантиораспознавания веществ методом ВЭЖХ .....	15
1.1.1. Разделение энантиомеров недериватизированных аминокислот .....	16
1.1.2. Разделение энантиомеров дансил-производных аминокислот .....	20
1.1.3. Разделение энантиомеров $\alpha$ -фенилкарбонновых кислот .....	21
1.1.4. Разделение энантиомеров профенов .....	23
1.1.5. Сорбент с эремомицином для препаративной ВЭЖХ .....	31
1.2. Эремомицин как хиральный селектор для энантиораспознавания веществ методом капиллярного электрофореза .....	35
1.2.1. Разделение энантиомеров ароматических кислот (профены, производные $\alpha$ -фенилуксусной кислоты) .....	35
1.2.2. Разделение энантиомеров N-производных аминокислот .....	41
Глава 2. Бычий сывороточный альбумин как хиральный селектор для разделения оптических изомеров веществ .....	43
2.1. Протеиновые хиральные неподвижные фазы .....	43
2.2. Бычий сывороточный альбумин в качестве хирального селектора в ВЭЖХ .....	45
2.3. Бычий сывороточный альбумин в качестве хирального селектора в капиллярном электрофорезе .....	58
Глава 3. Смешанные хиральные неподвижные фазы .....	65
3.1. Смешанные хиральные неподвижные фазы в газовой хроматографии .....	65
3.2. Смешанные хиральные неподвижные фазы в жидкостной хроматографии .....	70
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	79

Глава 4. Исходные вещества, аппаратура, методики эксперимента, техника эксперимента .....	79
4.1. Исходные вещества .....	79
4.2. Аппаратура .....	81
4.3. Методики эксперимента.....	82
4.4. Техника эксперимента.....	88
4.5. Изучение физико-химических свойств синтезированных сорбентов .....	89
Глава 5. Расширение энантиоселективных возможностей хирального сорбента с эремомицином .....	99
5.1. Разделение оптических изомеров производных аминокислот.....	99
5.2. Разделение энантиомеров $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот .....	105
5.3. Определение энантиомерной чистоты гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутамината (экспериментального препарата X-15).....	107
5.4. Определение энантиомерной чистоты препарата Пеметрексед .....	114
5.5. Определение энантиомерной чистоты препарата Левалбутерол .....	120
5.6. Изучение возможности энантиоразделения пиридотиодиазина на сорбенте с эремомицином .....	128
Глава 6. Хиральные сорбенты с несколькими селекторами, в том числе с эремомицином .....	132
6.1. Смешанный хиральный сорбент – силикагель/эремомицин-ванкомицин. 132	
6.1.1. Разделение энантиомеров $\beta$ -блокаторов на смешанном сорбенте — силикагель/эремомицин-ванкомицин .....	133
6.1.2. Разделение энантиомеров аминокислот на смешанном сорбенте — силикагель/эремомицин-ванкомицин .....	138
6.2. Смешанный хиральный сорбент — силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин.....	143
6.2.1. Разделение энантиомеров профенов на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин.....	143
6.2.2. Разделение энантиомеров бензоина на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин.....	148

6.2.3. Разделение энантиомеров производных аминокислот на смешанном сорбенте — силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин.....	150
6.2.4. Разделение энантиомеров профенов на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин в присутствии белка в анализируемом растворе.....	152
6.3. Синтез и исследование свойств сорбента силикагель/БСА .....	158
Глава 7. Альтернативный способ закрепления эремомицина на силикагеле через наночастицы золота .....	162
ВЫВОДЫ .....	165
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	167

## Список используемых сокращений

ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ХВЭЖХ	Хиральная высокоэффективная жидкостная хроматография
БСА	Бычий сывороточный альбумин
ОФ ВЭЖХ	Обращенно-фазовая ВЭЖХ
ПО ВЭЖХ	Полярно-органическая ВЭЖХ
ГХ	Газовая хроматография
КЭ	Капиллярный электрофорез
ХНФ	Хиральная неподвижная фаза
АК	Аминокислота
ДО	Диффузное отражение
РФА ПВО	Рентгенофлуоресцентный анализ с полным внешним отражением
СЭМ	Сканирующая электронная микроскопия
ЧСА	Сывороточный альбумин человека
АГП	$\alpha_1$ -Кислый гликопротеин
БОК	Трет-бутоксикарбонил-
КБЗ	Бензилоксикарбонил-
ФМОС	9-Фторметоксикарбонил-
ДНФ	2,4-Динитрофенил-
ДОФА	3,4-(Дигидрокси)-фенилаланин
ЦД	Циклодекстрин
ПМ-ЦД	Перметилированный циклодекстрин
НЧЗ	Наночастицы золота
ПФ	Подвижная фаза
ТЕА	Триэтиламин
ФБ	Фосфатный буферный раствор
ББ	Боратный буферный раствор
ТВА	Трибутиламин
ДЕА	Диэтиламин
ТЭАА	Триэтиламиноацетат
УК	Уксусная кислота
БДДГЭ	1,4-Бутандиол диглицидиловый эфир
ТРИС	Трис(гидроксиметил)-аминометан
МПК	Меркаптопропионовая кислота
МПТЭС	3-Меркаптопропилтриэтоксисилан

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Хиральная высокоэффективная жидкостная хроматография (ХВЭЖХ) – один из наиболее распространенных методов разделения энантиомеров хиральных соединений. Синтез новых фармацевтических субстанций, представляющих собой один из изомеров вещества, получение на их основе новых лекарственных препаратов, а также необходимость контроля наличия в таких лекарственных препаратах второго изомера, все эти факторы, предъявляют новые требования к современному хроматографическому разделению изомеров. Для решения этой задачи необходимо более подробное изучение уже известных хиральных неподвижных фаз, а также синтез новых недорогих хиральных сорбентов для решения определенных задач. Поэтому, разработка новых хиральных неподвижных фаз, а также расширение области применения уже известных сорбентов очень *актуальны*.

Один из распространенных типов хиральных неподвижных фаз – силикагель, модифицированный хиральным селектором, в роли которого могут выступать вещества различных классов соединений, в том числе антибиотики, белки, полисахариды и др. Макроциклические антибиотики, наряду с циклодекстринами и полисахаридами, являются одними из наиболее часто используемых хиральных селекторов в ХВЭЖХ. Важно выбрать такой селектор, который позволит разделить энантиомеры заданного класса соединений или одного конкретного соединения, и его закрепление на матрице сорбента не требует сложного и дорогого многостадийного синтеза, а полученный сорбент будет стабилен в широком диапазоне варьируемых условий элюирования.

В газовой хроматографии показано, что улучшить разделение энантиомеров позволяет использование смешанных хиральных неподвижных фаз. Особенностью таких сорбентов является наличие нескольких селекторов, закрепленных на матрице, а их достоинством — более широкая область применения сорбентов благодаря наличию сразу нескольких селекторов, каждый из которых может разделять энантиомеры веществ определенного класса. Вдобавок, селекторы могут быть закреплены на поверхности матрицы разными способами, в зависимости от особенностей структуры самого селектора. Смешанные хиральные неподвижные фазы применимы для решения большего количества задач, по сравнению с

сорбентами с одним селектором, что особенно *актуально*, поскольку существующие на данный момент коммерчески доступные хиральные сорбенты дороги и применимы для разделения энантиомеров веществ небольшого числа классов соединений. Стоит отметить, что в литературе есть только несколько работ по применению хиральных сорбентов с несколькими селекторами в ВЭЖХ.

Таким образом, *актуальность* работы определяется потребностью в разработке новых хроматографических хиральных сорбентов, в том числе с несколькими селекторами, для разделения широкого круга оптически активных соединений, а также расширением областей применения уже известных хиральных сорбентов.

**Цель работы** заключалась в изучении свойств хирального сорбента с эремомицином в качестве селектора, получении на его основе новых смешанных хиральных сорбентов и их применениях для разделения энантиомеров различных классов оптически активных веществ.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить возможность разделения энантиомеров веществ различных классов, ранее не изученных на хиральном сорбенте с антибиотиком эремомицином;
- решить ряд фармацевтических задач по определению энантиомерной чистоты лекарственных средств, используя сорбент с эремомицином;
- оценить альтернативный способ иммобилизации эремомицина на силикагель с помощью наночастиц золота;
- разработать и оптимизировать методы синтеза смешанных хиральных сорбентов с эремомицином в качестве одного из хиральных селекторов и белка или другого антибиотика в качестве второй хиральной составляющей на силикагелевой матрице;
- изучить возможность применения полученных смешанных хиральных сорбентов в качестве неподвижной фазы для ВЭЖХ для разделения оптических изомеров различных классов соединений;
- апробировать новые синтезированные смешанные сорбенты при анализе лекарственных средств, в том числе в биологических жидкостях.

**Научная новизна работы.** Подобраны условия разделения энантиомеров трет-бутоксикарбонил- (БОК), бензоил-, бензилоксикарбонил- (КБЗ) производных аминокислот, производных  $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот, пиридотиодиазина на хиральном сорбенте на основе силикагеля, модифицированного эремомицином. Предложены методики определения энантиомерной чистоты лекарственного средства пеметрексед и экспериментального препарата на основе N-ацетил-L-глутамината на сорбенте с эремомицином.

Синтезирован смешанный хиральный сорбент на основе силикагеля, модифицированного одновременно эремомицином и ванкомицином. Показана возможность разделения на таком сорбенте энантиомеров  $\beta$ -блокаторов и аминокислот в обращенно-фазовом (ОФ) режиме ВЭЖХ, установлены особенности их удерживания.

Синтезирован смешанный хиральный сорбент на основе силикагеля, модифицированного эремомицином и бычьим сывороточным альбумином (БСА), оригинальность сорбента подтверждена патентом. Показана возможность разделения энантиомеров профенов и производных аминокислот на таком сорбенте в ОФ режиме ВЭЖХ, исследовано влияние состава подвижной фазы на энантиоселективность. Показана возможность разделения энантиомеров кетопрофена на синтезированном смешанном сорбенте в присутствии маркерных белков различной молекулярной массы, а также в искусственно созданных растворах кетопрофена в моче без предварительной пробоподготовки.

Предложен альтернативный способ закрепления эремомицина на силикагеле, модифицированном 3-меркаптопропилтриэтоксисиланом, через спейсер, содержащий наночастицы золота (НЧЗ).

**Практическая значимость.** В ходе работы расширена область применения хирального сорбента на основе силикагеля, модифицированного эремомицином. Практическую значимость имеют методики разделения энантиомеров БОК-, бензоил-, КБЗ-производных аминокислот,  $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот, методики определения энантиомерной чистоты лекарственных средств левалбутерол, пеметрексед и экспериментальных субстанций: на основе N-ацетил-L-глутамината и пиридотиодиазина.

В ходе работы синтезированы два новых смешанных хиральных сорбента для ВЭЖХ. Показана возможность разделения энантиомеров аминокислот,  $\beta$ -блокаторов на сорбенте на основе силикагеля, модифицированного одновременно эремомицином и ванкомицином. Показана возможность разделения энантиомеров производных аминокислот, профенов, бензоина на сорбенте на основе силикагеля, модифицированного эремомицином и бычьим сывороточным альбумином. Практическую значимость имеет методика количественного определения энантиомеров кетопрофена в присутствии маркерных белков в анализируемом растворе.

**На защиту выносятся:**

- данные по влиянию состава подвижной фазы на удерживание энантиомеров БОК-, бензоил-, КБЗ-производных аминокислот,  $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот и разделение их энантиомеров на силикагеле, модифицированном эремомицином;
- методики определения энантиомерной чистоты ряда лекарственных средств на сорбенте с эремомицином;
- разработанные способы синтеза новых смешанных хиральных сорбентов для ВЭЖХ: эремомицин-ванкомицин и эремомицин-бычий сывороточный альбумин; способ закрепления эремомицина на силикагеле через наночастицы золота;
- результаты исследования синтезированных сорбентов комплексом физико-химических методов (методы элементного анализа, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), низкотемпературной адсорбции азота, спектроскопии диффузного отражения (ДО), спектрофотометрии, рентгено-флуоресцентного анализа с полным внешним отражением (РФА ПВО));
- данные по влиянию состава подвижной фазы на удерживание аминокислот и  $\beta$ -блокаторов и разделение их энантиомеров на силикагеле, одновременно модифицированном эремомицином и ванкомицином; сравнение энантиоразделения  $\beta$ -блокаторов на смешанном сорбенте и на сорбенте с ванкомицином;
- данные по влиянию состава подвижной фазы на удерживание профенов и производных аминокислот и разделение их энантиомеров на силикагеле,

одновременно модифицированном эремомицином и БСА; сравнение энантиоразделения профенов, производных аминокислот, бензоина на смешанном сорбенте и на сорбенте с эремомицином;

- условия разделения кетопрофена в присутствии маркерных белков в анализе или в моче на сорбенте с эремомицином и БСА.

**Апробация работы.** XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2013" (Москва, 2013), Второй Съезд аналитиков России (Москва, 2013), 30 th International Symposium on Chromatography (Зальцбург, Австрия, 2014), Всероссийская конференция "Теория и практика хроматографии" с международным участием, посвященная памяти проф. М.С. Вигдергауза (Самара, 2015), 2nd Russian conference on medicinal chemistry (Новосибирск, 2015), I Всероссийская конференция с международным участием "Химический анализ и медицина" (Москва, 2015).

**Личный вклад автора.** Личный вклад автора заключается в постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов непосредственно автором, обработке, анализе и обобщении полученных результатов, написании статей, подготовке докладов и выступлениях на конференциях.

**Публикации.** Основное содержание работы изложено в 12 печатных работах: в 5 статьях, 6 тезисах докладов и 1 патенте.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

1. Шпигун О.А., Шаповалова Е.Н., Староверов С.М., Федорова И.А. Сорбент для разделения оптических изомеров веществ и их анализа в биологических жидкостях методом ВЭЖХ и способ его получения. // Патент № 2592893 (заявка № 2014152938, приоритет изобретения 26.12.2014, зарегистрировано 06.07.2016, срок действия истекает 26.12.2034).
2. Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Староверов С.М., Шпигун О.А. Разделение энантиомеров производных аминокислот на силикагеле, модифицированном макроциклическим антибиотиком эремомицином. // Сорбц. хромат. процессы. 2015. Т. 15. № 6, С. 769 – 775.
3. Fedorova I.A., Shapovalova E.N., Shpigun O.A., Staroverov S.M. Bovine serum albumin adsorbed on eremomycin and grafted on silica as new mixed-binary chiral

sorbent for improved enantioseparation of drugs. // J. Food Drug Anal. 2016. V. 24. P. 848 – 854.

4. Шаповалова Е.Н., Федорова И.А., Припорова А.А., Ананьева И.А., Шпигун О.А. Определение энантиомерной чистоты пеметрекседа на сорбентах с иммобилизованными макроциклическими антибиотиками. // Аналитика и контроль. 2016. Т. 20. № 2. С. 168 – 174.

5. Шаповалова Е.Н., Федорова И.А., Припорова А.А., Ананьева И.А., Шпигун О.А. Определение энантиомерной чистоты альбутерола на сорбентах, модифицированных макроциклическими антибиотиками. // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2: Химия. 2017. Т. 58. № 1. С. 20 – 27.

6. Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А. Разделение энантиомеров  $\beta$ -блокаторов и аминокислот на смешанном хиральном сорбенте, модифицированном макроциклическими антибиотиками эремомицином и ванкомицином. // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 1. С. 57 – 64.

7. Федорова И.А. Новый сорбент для ВЭЖХ на основе силикагеля, модифицированного наночастицами золота и макроциклическим антибиотиком эремомицином. // Тезисы докладов XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов-2013”. Москва, 8 – 13 апреля 2013. Электронный носитель.

8. Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Мажуга А.Г., Рудаковская П.Г., Шпигун О.А. Использование силикагеля, модифицированного наночастицами золота и макроциклическим антибиотиком эремомицином, для разделения изомеров фармпрепаратов // Тезисы докладов Второго Съезда аналитиков России. Москва, 23 – 27 сентября 2013. № 489. С. 440. Электронный носитель.

9. Fedorova I., Shapovalova E., Shpigun O. Mixed chiral sorbent based on silica gel modified by macrocyclic antibiotic eremomycin and bovine serum albumin // Materials of 30th International symposium on chromatography, Salzburg, Austria, September 14 – 18, 2014. USB Mass Storage Device.

10. Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А. Использование силикагеля, модифицированного макроциклическим антибиотиком эремомицином, для разделения энантиомеров производных фенилуксусной кислоты. // Тезисы

докладов Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» памяти профессора М.С. Вигдергауза. Самара, 24 – 30 мая 2015, С. 204.

11. Shapovalova E.N., Fedorova I.A., Priporova A.A., Ananieva I.A., Shpigun O.A. Determination of the enantiomeric purity pemetrexed and levalbuterol on the macrocyclic glycopeptide bonded phase. // Materials of 2nd Russian conference on medicinal chemistry. Новосибирск, 5 – 10 июля 2015, С. 269.

12. Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Шаранов П.Ю., Алов Н.В., Шпигун О.А. Хиральный сорбент на основе силикагеля, модифицированного бычьим сывороточным альбумином: синтез и хроматографические свойства. // Сборник тезисов I Всероссийской конференции с международным участием "Химический анализ и медицина". Москва, 8 – 13 ноября 2015. С. 105.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 3 глав обзора литературы, 1 главы экспериментальной части, 3 глав обсуждения результатов, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал диссертации изложен на 181 странице машинописного текста, содержит 56 рисунков, 37 таблиц, в списке цитируемой литературы 153 наименования.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

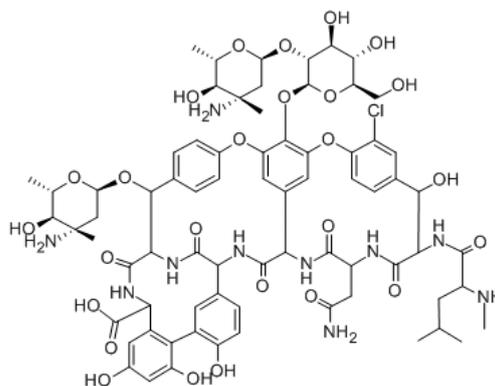
В обзоре литературы систематизированы и обсуждены сведения из научных публикаций, посвященных использованию антибиотика эремомицина в качестве хирального селектора для разделения энантиомеров веществ методами ВЭЖХ и капиллярного электрофореза (КЭ), а также хиральным неподвижным фазам с белками в качестве селекторов, и хиральным неподвижным фазам, содержащим одновременно несколько хиральных селекторов, и их применению для разделения энантиомеров различных классов веществ.

### Глава 1. Эремомицин как хиральный селектор для разделения оптических изомеров веществ

Эремомицин – отечественный гликопептидный антибиотик, открытый в 1979 году в НИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН, первая публикация относится к 1987 г [1 – 5].

Эремомицин относится к препаратам ванкомициновой группы, в которую входят такие антибиотики, как ванкомицин, тейкопланин, при этом активность эремомицина в несколько раз выше, а токсичность ниже, поэтому он может быть использован не только для внутривенного, но и для внутримышечного введения [3]. Эремомицин продуцируется актиномицетом *Amycolatopsis orientalis* [6]. Антибиотики ванкомициновой группы применяются при лечении инфекций, вызванных грамположительными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью (стафилококками, энтерококками, стрептококками, клостридиями). Механизм действия гликопептидов основывается на связывании с С-концевым фрагментом –Lys-D-Ala-D-Ala пептидогликана строящейся клеточной стенки бактерии. Это приводит к остановке синтеза пептидогликана и гибели бактерии [7]. Повышенную активность эремомицина по сравнению с ванкомицином и тейкопланином можно объяснить образованием им в растворе димеров, которые и взаимодействуют с мишенью –Lys-D-Ala-D-Ala бактерии, образуя более прочный комплекс антибиотик-мишень, в то время как другие антибиотики действуют на мишень в виде мономеров, образуя при этом комплексы антибиотик-мишень слабее [2].

Молекулярная формула эремомицина  $C_{73}H_{89}N_{10}O_{26}Cl$ , это амфотерное соединение с молекулярной массой 1557 г/моль, содержащее в своей структуре концевую карбоксильную ( $pK_a$  3.1), три аминных ( $pK^1_{a1}$  6.9,  $pK^2_{a1}$  7.9,  $pK^3_{a1}$  9.0) и три фенольных ( $pK^1_{a2}$  9.7,  $pK^2_{a2}$  10.4,  $pK^3_{a2}$  11.35) группы, которые и определяют свойства эремомицина как цвиттер-иона [1, 8]. Структура эремомицина представлена на рис. 1.



**Рис. 1.** Структура эремомицина.

Ближайшим аналогом эремомицина является макроциклический антибиотик ванкомицин. Отличие структуры эремомицина от ванкомицина в том, что в молекуле эремомицина только один атом хлора, в то время как в молекуле ванкомицина их два, также у эремомицина есть дополнительный углеводный остаток с первичной аминогруппой – эремозамин (4-эпи-ванкозамин), отличающийся от аналогичного остатка ванкомицина в дисахарной ветви обратной конфигурацией углерода  $C_4$  [9].

Эремомицин легко растворим в воде, водных растворах кислот и щелочей, нерастворим в органических растворителях, легко кристаллизуется из растворов воды с органическими растворителями, такими как этилацетат (насыщенный раствор), пропанол (80 % об.), этанол (50 % об.); выпадает в осадок в виде основания из концентрированных растворов в слабощелочной среде (pH 7.5); не имеет определенной температуры плавления, при температуре выше 250 °C разлагается. Максимум поглощения в УФ-спектре в воде при  $\lambda_{\text{макс}}$  282 нм, максимум поглощения в щелочных растворах (0.1 н NaOH) при  $\lambda_{\text{макс}}$  300 нм [10], изоэлектрическая точка 8.3 [3].

## 1.1. Эремомицин как хиральный селектор для энантиораспознавания веществ методом ВЭЖХ

С момента своего появления в области хирального разделения макроциклические гликопептидные антибиотики, в число которых входит эремомицин, благодаря своим структурным характеристикам доказали обоснованность их использования в качестве хиральных селекторов как в ВЭЖХ, так и в капиллярном электрофорезе. Обычно в их структуре содержатся несколько хиральных центров, различные функциональные группы (аминокислоты, N-замещенные аминокислоты, небольшие пептиды,  $\alpha$ -гидроксикарбоновые кислоты) и три или четыре полости (циклические амиды или нейтральные циклические амины). Такая структура обеспечивает многочисленные взаимодействия антибиотика с хиральным анализом посредством водородных связей,  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий, множества дипольных, электростатических и гидрофобных взаимодействий (гидрофобных комплексов включения или просто ассоциатов с гидрофобным «карманом»), а также стерических затруднений [11, 12].

Первые работы по использованию гликопептидных антибиотиков для хирального разделения принадлежат Армстронгу и датируются 1994 годом. В них описывается использование трех макроциклических антибиотиков: ванкомицина, рифамицина В и тиострептона, ковалентно связанных с силикагелем неподвижной фазы в ВЭЖХ. Эти антибиотики показали высокую энантиоселективность различных соединений как в обращенно-фазовом, так и в нормально-фазовом режимах хроматографии. Армстронг поделил энантиомеры 70 соединений, в том числе энантиомеры аминокислот, их дансил-, бензилоксикарбонил-, бензил-производные,  $\beta$ -блокаторы, лактоны [13]. В другом докладе Армстронг с сотрудниками использовали ванкомицин как хиральный селектор в капиллярном электрофорезе [14].

На сегодняшний день макроциклические антибиотики – одни из наиболее широко используемых хиральных селекторов, позволяющих разделять энантиомеры различных классов веществ. Возможности таких селекторов описаны в большом количестве научных статей и литературных обзоров, однако антибиотик эремомицин в качестве селектора используется пока мало [15 – 23].

### ***1.1.1. Разделение энантиомеров недериватизированных аминокислот***

Впервые хиральный сорбент для ВЭЖХ с эремомицином в качестве хирального селектора синтезирован в работе 2006 г [24]. Он представляет собой силикагель с эпокси-группами с привитым к ним антибиотиком эремомицином. Для синтеза использовали эпокси-силикагель с диаметром зерна сорбента 5 мкм, диаметром пор 11 нм, площадью поверхности сорбента 300 м<sup>2</sup>/г. К эпокси-силикагелю добавили раствор антибиотика в воде, доведенный до pH 8.6. Суспензию нагревали до 40 °С в течение 14 часов, затем сорбент отфильтровывали, промывали водой, метанолом, ацетоном и сушили 4 часа при температуре 50 °С. Плотность прививки антибиотика составила 50 мкмоль/г или 0.17 мкмоль/м<sup>2</sup>. Синтезированный сорбент проявил высокую способность к энантиораспознаванию аминокислот (особенно кислот, содержащих ароматический фрагмент или имино-группу) с использованием водно-метанольных элюентов, содержащих различные буферные растворы или добавку уксусной кислоты. Синтезированный подобным образом сорбент с антибиотиком ванкомицином не проявил способности к энантиораспознаванию недериватизированных аминокислот.

Возможности сорбента, модифицированного эремомицином, в области разделения энантиомеров недериватизированных α-аминокислот продолжили те же авторы в работе [25]. В качестве органической составляющей подвижной фазы использовали метанол, в качестве водной: бидистиллированную воду, растворы уксусной кислоты, ацетата аммония, дигидрофосфата натрия и триэтиламмония ацетата. С хорошими значениями коэффициентов разрешения и селективности разделены энантиомеры таких аминокислот, как триптофан, м-фтортирозин, фенилаланин, метионин, 2-тиенилаланин, аланин, валин, норвалин, норлейцин, цитрулин, серин, треонин.

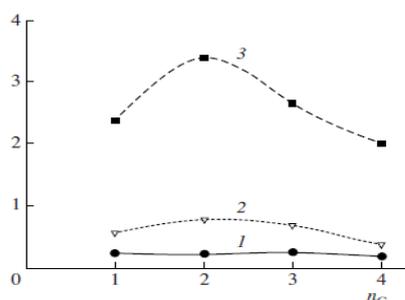
Показано, что концентрация буферного раствора подвижной фазы мало влияет на эффективность энантиоразделения, в то время как pH буферного раствора и концентрация органического модификатора в подвижной фазе оказывают на него значительное влияние.

В частности, величина pH элюента обеспечивает ионное состояние карбоксильных и аминогрупп аминокислот и антибиотика. Из исследования можно сделать вывод о том, что присутствие диссоциированных карбоксильных групп

положительно сказывается на энантиоразделении, а появление депротонированных аминогрупп подавляет распознавание энантиомеров. Электростатические взаимодействия в значительной степени влияют на удерживание аминокислот и в меньшей степени на энантиораспознавание, которое достигает максимального значения при рН элюента, близкого к значению изоэлектрической точки аминокислоты.

Результаты, полученные при изучении влияния концентрации метанола в подвижной фазе на разделение энантиомеров метионина, показали, что увеличение его концентрации в элюенте приводит к увеличению удерживания каждого из энантиомеров метионина, уменьшению селективности и разрешения, что свидетельствует о реализации механизма разделения за счет гидрофильных и ионных взаимодействий.

В группе *С.М. Староверова* также изучено влияние структуры аминокислоты на энантиораспознавание [25]. Разделение энантиомеров проводили с использованием в качестве элюента смеси метанол-вода (1:1), предполагая, что в данных условиях удерживание и селективность энантиоразделения определяется природой заместителя аминокислоты. Однако увеличение длины цепи заместителя в ряду аланин <  $\alpha$ -аминомасляная кислота < норвалин < норлейцин не привело к линейному увеличению удерживания энантиомеров или селективности разделения. Из рис. 2 видно, что удерживание L-изомеров аминокислот с увеличением длины боковой алифатической цепи, а, следовательно, и с увеличением их гидрофобности, практически не изменяется. Что же касается удерживания D-изомеров и коэффициента селективности, то эти зависимости носят куполообразный характер с максимумом для  $\alpha$ -аминомасляной кислоты.



**Рис. 2.** Зависимость факторов емкости оптических изомеров аминокислот (1)  $k_L$ , (2)  $k_D$  и (3) коэффициента селективности от длины алкильного радикала в боковой цепи аминокислот на сорбенте с иммобилизованным эремомицином. Подвижная фаза: метанол/вода, 1/1 [25].

Это свидетельствует о том, что гидрофобные ароматические кольца антибиотика локализованы внутри молекулы, образуя гидрофобные «карманы», размеры которых оптимальны для аминокислот с этильным заместителем в боковой цепи ( $\alpha$ -аминомасляная кислота). Дальнейшее увеличение величины бокового заместителя приводит к стерическим затруднениям его проникновения в такой «карман», что и приводит к уменьшению удерживания D-изомеров и энантиоселективности. Разветвленное строение валина и лейцина по сравнению с норвалином и норлейцином обеспечивает лучшее энантиоразделение. Таким образом, удерживание гидрофобных аминокислот на эремомицине не описывается обращенно-фазовым механизмом, значительное влияние оказывают размеры гидрофобного «кармана» антибиотика и бокового радикала самой аминокислоты.

Для ароматических аминокислот (фенилглицин, фенилаланин, тирозин, 3,4-дигидроксифенилаланин) характерна еще большая энантиоселективность, связанная с дополнительным вкладом  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействий с ароматическими структурами антибиотика.

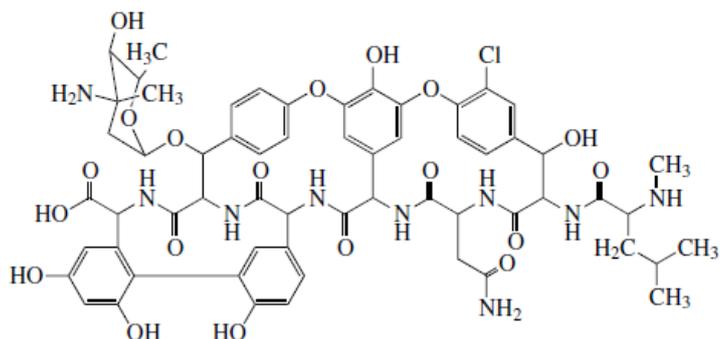
На возможность энантиораспознавания влияние оказывают такие структурные факторы, как гидроксильные группы в ароматическом ядре и боковой цепи аминокислот, полярные группы ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ) в боковой алифатической цепи.

Среди других веществ особое место занимают циклические аминокислоты, отличающиеся наличием вторичной аминогруппы и более жесткой структурой молекулы. Максимальные значения селективности получены для энантиомеров пролина и пипеколиновой кислоты.

Таким образом, авторы сделали вывод о том, что в механизме разделения аминокислот с эремомицином, как хиральным селектором, существенную роль играют как неспецифические (гидрофобные) взаимодействия, так и специфические (водородные связи, диполь-дипольные взаимодействия, ионообменные, донорно-акцепторные,  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия). Причем селективность разделения энантиомеров аминокислот уменьшается в ряду: циклические аминокислоты – ароматические и гидрофобные аминокислоты – аминокислоты с кислыми и основными функциональными группами в боковой цепи.

Помимо эремомицина авторы работы [25] в качестве хирального селектора для синтеза сорбента использовали его производное – эремозаминилагликон

эремомицина, отличающийся от исходного антибиотика отсутствием остатка дисахарида (рис. 3).



**Рис. 3.** Структура эремозаминалагликона эремомицина.

Полученные разделения энантиомеров на таком сорбенте позволяют говорить об увеличении энантиоселективности аминокислот с алифатической боковой цепью, ее уменьшении для циклических аминокислот, о полной потере энантиоселективности для ароматических аминокислот. Исчезновение энантиоселективности можно объяснить, если предположить, что гидрофобный карман, локализованный между углеводных остатков, является основным сайтом для хирального распознавания аминокислот. Алифатические заместители вызывают стерические затруднения при взаимодействии L-аминокислот с этим фрагментом. В случае ароматических аминокислот отсутствие остатка дисахарида позволяет избежать этих затруднений для L-изомеров, их удерживание увеличивается в 2 – 4 раза и достигает величины удерживания D-изомеров.

В работе [26] продолжено изучение хроматографического поведения энантиомеров ряда аминокислот на сорбенте с эремомицином (коммерческая колонка Nautilus-E) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. В работе использовали ту же подвижную фазу: метанол/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.04 М), рН элюента варьировали от 3.0 до 7.0. Авторам удалось расширить круг разделяемых аминокислот на сорбенте с иммобилизованным эремомицином. Получены зависимости удерживания энантиомеров аминокислот от рН раствора элюента для таких аминокислот, как аспарагиновая и глутаминовая кислоты, фенилаланин, цистин, метионин, аланин, серин. Причем зависимость удерживания для аспарагиновой и глутаминовой аминокислот сильно отличаются от остальных, они имеют ярко выраженный

максимум при рН 4.0. При данном значении рН преобладает форма аминокислот с двумя депротонированными карбоксильными группами, тогда как эремомицин при данном рН заряжен положительно. Увеличение рН в диапазоне 4.0 – 7.0 приводит к уменьшению величины положительного заряда на антибиотике и уменьшению удерживания отрицательно заряженных данных аминокислот. Этот факт также подтверждает значительный вклад ионных взаимодействий в механизм распознавания на таком сорбенте.

Авторы работы [26] выявили более заметное влияние рН раствора элюента на удерживание D-изомеров аланина, серина, фенилаланина, цистина, метионина, чем на удерживание L-изомеров. Для D-изомеров аминокислот также более существенен вклад в механизм распознавания таких взаимодействий как гидрофобные,  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия, образование водородных связей. Например, L-изомеры аланина и серина удерживаются одинаково в исследованном диапазоне рН, в то время как удерживание D-изомера аланина гораздо больше, чем D-серина. Уменьшение удерживания D-изомеров фенилаланина, аланина, метионина, серина с ростом рН приводит к уменьшению их разрешения с пиками L-изомеров. В работе показана возможность одновременного разделения энантиомеров трех аминокислот. Авторами предложен способ анализа лекарственного препарата «Элтацин», содержащего L-изомеры цистина, глутаминовой кислоты и глицина. Одновременное определение всех аминокислот, входящих в состав препарата, показало отсутствие в нем D-изомеров цистина и глутаминовой кислоты, что соответствует требованиям фармакопейной статьи на лекарственный препарат.

### ***1.1.2. Разделение энантиомеров дансил-производных аминокислот***

На хиральных неподвижных фазах с эремомицином возможно разделение энантиомеров не только недериватизированных аминокислот, но и их дансил-производных. М.А. Кузнецов в рамках своей диссертационной работы [27] проводил разделение энантиомеров дансил-производных аминокислот на ряде сорбентов, в том числе и на сорбенте, содержащем эремомицин, а также на сорбентах, содержащих его производные, такие как эремозаменилагликон эремомицина и полный агликон эремомицина. Структура эремозаменилагликона эремомицина была представлена на рис. 3, а структура полного агликона эремомицина характеризуется полным отсутствием сахаридных остатков.

В работе исследовали поведение дансил-производных таких аминокислот, как лейцин, норлейцин, метионин, фенилаланин, треонин, серин, валин. Разделение проводили в полярно-органическом режиме хроматографии, поскольку применение обращенно-фазового варианта невозможно из-за сильного удерживания сорбатов на колонке. Подвижная фаза представляла собой метанол с добавками триэтиламина (0.1 % и 1 %) и уксусной кислоты (УК) (0.1 % и 1 %). Использование 0.1 % добавок кислоты и амина в подвижной фазе позволило разделить энантиомеры дансил-производных почти всех аминокислот до базовой линии на сорбентах с эремозаминил- и агликоном эремомицина. В случае использования элюента состава метанол с добавкой по 1% уксусной кислоты и триэтиламина, разрешение пиков и селективность выше на сорбенте с эремомицином, а эремозаминилагликон предпочтительнее сорбента с полным агликоном эремомицина, за исключением дансил-серина. Хроматографические параметры дансил-серина, полученные для каждого из элюентов, выше на сорбенте с полным агликоном эремомицина (коэффициент селективности  $\alpha=11.0$  для элюента с содержанием добавок по 1 % и  $\alpha=3.2$  для элюента с 0.1% добавками).

### ***1.1.3. Разделение энантиомеров $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот***

Одним из классов веществ, разделение энантиомеров которых возможно на хиральном сорбенте с эремомицином, являются  $\alpha$ -фенилкарбоновые кислоты. В работе [28] в качестве тестовых соединений данного класса веществ использовали такие кислоты, как  $\alpha$ -гидроксифенилуксусная (миндальная) кислота,  $\alpha$ -метоксифенилуксусная кислота, 2-фенилпропионовая кислота, 2-фенилбутановая кислота. В качестве элюента использовали смесь этанола и водного раствора ацетата аммония (0.1 М) с добавкой 1 об. % уксусной кислоты, объемную долю спирта варьировали от 30 до 70 об. %. Поскольку все исследованные кислоты имеют схожую структуру, удерживание их энантиомеров и селективность разделения обусловлена природой заместителя в боковой цепи  $\alpha$ -фенилуксусной кислоты. Удерживание исследуемых кислот на сорбенте увеличивалось в ряду: 2-фенилпропионовая кислота  $\sim$  2-фенилбутановая кислота  $<$   $\alpha$ -метоксифенилуксусная кислота  $<$   $\alpha$ -гидроксифенилуксусная (миндальная) кислота. Увеличение удерживания двух последних кислот можно объяснить наличием в их структуре полярных  $\text{CH}_3\text{O}$ - и  $\text{OH}$ - групп, которые способны

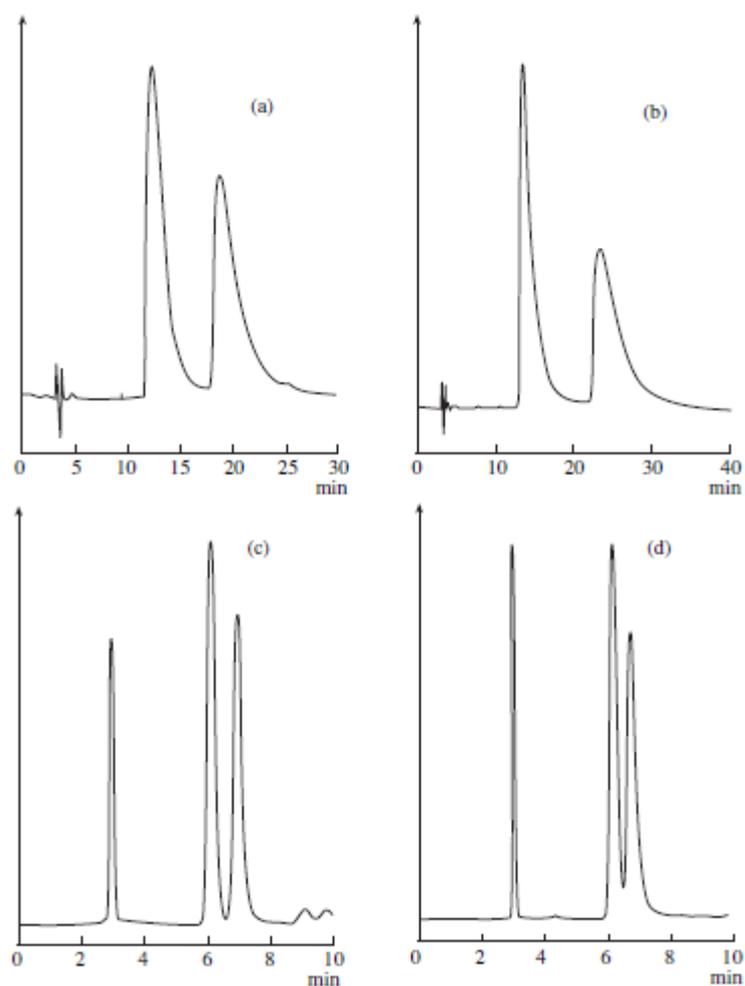
взаимодействовать с активными центрами антибиотика. Увеличение доли органического модификатора в подвижной фазе для каждого из исследованных производных  $\alpha$ -фенилуксусной кислоты приводит к уменьшению удерживания энантиомеров на сорбенте и разрешению их пиков. Однако изменение селективности при этом незначительно, а для  $\alpha$ -фенилбутановой кислоты есть тенденция увеличения селективности с увеличением объемной доли этанола, что позволяет сократить потребление элюента без ухудшения хроматографических параметров разделения.

При любом соотношении этанол - водный буферный раствор в подвижной фазе наилучшие значения селективности получены для 2-фенилбутановой и  $\alpha$ -метоксифенилуксусной кислот, что объясняется особенностями их структуры. Расчеты геометрии молекул показали, что эти кислоты имеют разветвленную структуру, в которой каждый из заместителей ( $C_6H_5$ -,  $-COOH$ ,  $CH_3O$ - или  $C_2H_5$ -) находится в своей плоскости. Авторы предположили, что такая конфигурация позволяет стереоселективно взаимодействовать сорбату с центрами хирального распознавания антибиотика. Низкая селективность разделения энантиомеров характерна для 2-фенилпропионовой и миндальной кислот. В молекуле 2-фенилпропионовой кислоты, двугранный угол между углеродом метильной группы, атомом водорода при хиральном центре и двумя атомами кислорода карбоксильной группы  $176.8^\circ$  (ось угла проходит через хиральный атом углерода и атом углерода из карбоксильной группы), это свидетельствует о том, что заместители находятся практически в одной плоскости с хиральным атомом углерода. Подобное строение и у миндальной кислоты, в которой двугранный угол между кислородом гидроксигруппы, двумя атомами кислорода карбоксильной группы и атомом водорода при хиральном атоме углерода равен  $156.3^\circ$ , однако фенильная группа, хиральный атом углерода и атом углерода из карбоксильной группы также лежат в одной плоскости. Это отличает миндальную кислоту от других исследуемых кислот, в которых карбоксильная группа всегда находится в другой плоскости относительно ароматического кольца. Такая структура миндальной кислоты, как полагают авторы [28], наименее благоприятна для стереоселективных взаимодействий по сравнению со структурами остальных кислот.

#### ***1.1.4. Разделение энантиомеров профенов***

Еще одним классом веществ наряду с аминокислотами, их дансил-производными, фенилкарбоновыми кислотами, разделение энантиомеров которых возможно на хиральных сорбентах с эремомицином, являются профены, представляющие собой действующие вещества нестероидных противовоспалительных препаратов, причем терапевтической активностью обладает только один из энантиомеров. Авторы работы [29] синтезировали 4 хиральных сорбента с макроциклическими антибиотиками в качестве хиральных селекторов, среди которых эремомицин, эремозаминилагликон, ристомидин А, ванкомицин, и исследовали их способность к распознаванию энантиомеров профенов. В качестве тестовых соединений использовали такие профены, как фенопрофен, ибупрофен, индопрофен, кетопрофен, флурбипрофен. Исследование проводили в двух вариантах хроматографии: обращенно-фазовом (водно-метанольные подвижные фазы) и полярно-органическом (метанол с добавками триэтиламина и уксусной кислоты).

Наиболее оптимальным для разделения энантиомеров профенов среди всех исследованных сорбентов оказался сорбент с привитым эремомицином, причем приемлемые значения селективности и разрешения достигнуты в каждом из вариантов хроматографии. Для всех профенов, кроме фенопрофена (максимальное  $R_s$  1.4), в оптимальных условиях разрешение пиков энантиомеров больше 1.5. Авторы отмечают, что обращенно-фазовый вариант хроматографии для разделения энантиомеров выигрывает по величине значений селективности и разрешения, однако эффективность колонки в таких условиях заметно ниже, чем в полярно-органическом режиме (рис. 4).



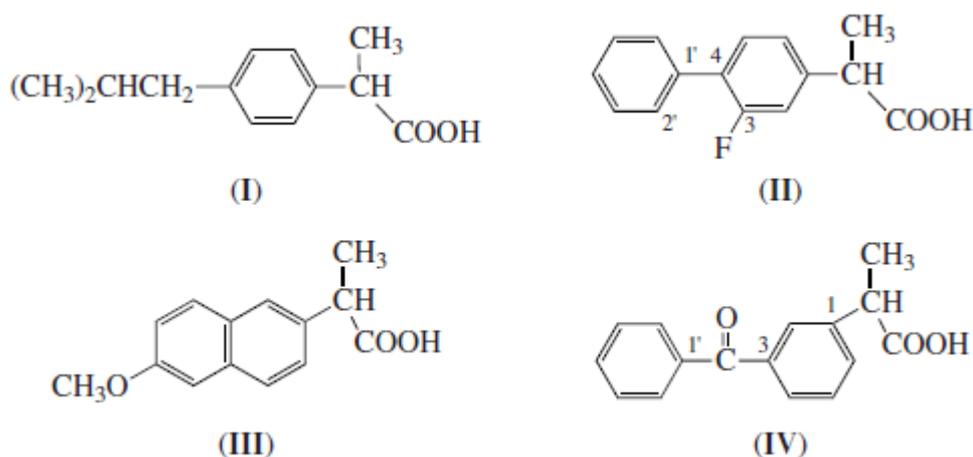
**Рис. 4.** Разделение энантимеров ибупрофена (а, с), индопрофена (b) и фенопрофена (d) на колонках с привитым эремомицином (а-с) и эремозаминилагликоном эремомицина (d). ПФ: (а, b) MeOH/ФБ (0.1 М, рН 6.5), 40/60; (с, d) MeOH/TEA/УК, 100/0.1/0.2. Скорость потока ПФ 0.7 мл/мин, 220 нм [29].

Общей закономерностью для всех профенов при разделении энантимеров в обращенно-фазовом режиме хроматографии на всех исследованных сорбентах является уменьшение их удерживания с ростом рН подвижной фазы (в диапазоне от 6.5 до 8.0), на сорбентах с ристомидином А и эремомицином при этом уменьшается разрешение пиков, а селективность остается неизменной. Сорбент с ванкомицином не позволяет разделить энантимеры профенов в обращенно-фазовом режиме хроматографии, а в полярно-органическом энантиоселективен только к изомерам флурбипрофена.

В полярно-органическом варианте хроматографии наилучшее разделение энантимеров профенов достигнуто на сорбенте с эремомицином с высокими

значениями селективности и разрешения, что позволяет использовать его как для аналитического, так и для препаративного разделения энантимеров профенов.

Авторы работы [30] также исследовали хроматографическое поведение и термодинамические характеристики энантимеров профенов на сорбенте с иммобилизованным эремомицином. В качестве аналитов использовали ибупрофен, флурбипрофен, напроксен, кетопрофен (рис. 5).

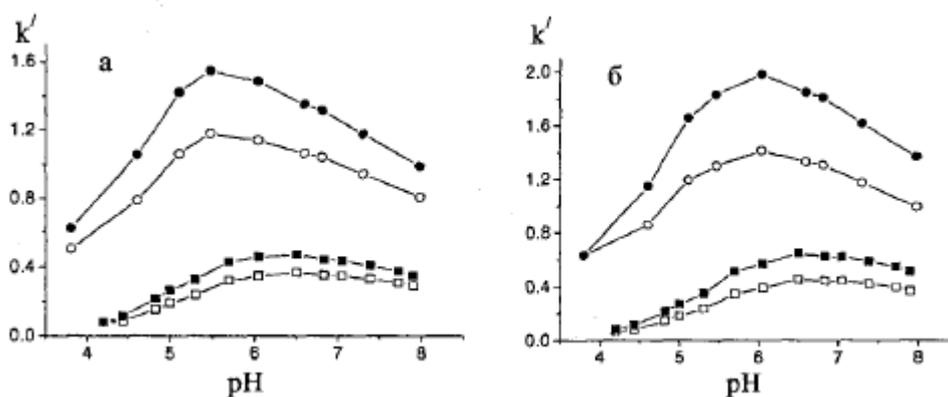


**Рис. 5.** Структурные формулы ибупрофена (I), флурбипрофена (II), напроксена (III), кетопрофена (IV) [30].

Исследование проводили в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ, подвижная фаза состояла из смеси этанол : 0.1 М раствор ацетата аммония (с рН в диапазоне от 4.6 до 5.7) в соотношении 60 : 40. Время удерживания профенов увеличивается в ряду ибупрофен < флурбипрофен ~ напроксен < кетопрофен, причем R-изомеры удерживаются сильнее. Более высокие значения коэффициентов селективности напроксена и флурбипрофена по сравнению с кетопрофеном авторы объясняют с помощью особенностей строения ароматических фрагментов данных веществ. У первых двух соединений бензольные кольца лежат на одной оси, повернутые под углом  $21^\circ$  друг к другу, тогда как у кетопрофена они лежат по разным осям ( $\text{C}_3\text{-C}(\text{O})\text{-C}_1$ , угол  $117^\circ$ ), что является менее предпочтительной конфигурацией для стереоселективных взаимодействий. При сравнении структур напроксена и флурбипрофена стоит отметить, что связь  $\text{C-F}$  во флурбипрофене длинее ( $1.39 \text{ \AA}$ ), чем связь  $\text{C}_2\text{-H}$  ( $1.08 \text{ \AA}$ ) в молекуле напроксена в симметричной позиции. Связь  $\text{C-F}$  может выступать в качестве регулятора стерических взаимодействий. Метокси-группа в напроксене таким регулятором не является из-за ее удаленности от хирального центра молекулы.

Также как и авторы предыдущей работы, в данном исследовании изучали изменение хроматографических параметров профенов при изменении рН элюента, однако диапазон рН составлял 4.6 – 5.7. Экспериментальные данные показывают, что удерживание профенов монотонно уменьшается с понижением рН элюента, селективность также медленно уменьшается для всех исследованных аналитов, за исключением ибупрофена. Однако термодинамические характеристики адсорбции изменяются немонотонно. Зависимости теплоты адсорбции ( $-\Delta H^\circ$ ) от рН элюента для напроксена, кетопрофена и S-флурбипрофена имеют минимум. Такой характер зависимости свидетельствует о наличии двух противодействующих факторов. С одной стороны, увеличение в составе подвижной фазы концентрации уксусной кислоты (то есть уменьшение рН элюента) приводит к увеличению доли конкурирующих взаимодействий между ионами подвижной фазы и центрами адсорбции антибиотика, что приводит к уменьшению  $|\Delta H^\circ|$ . С другой стороны, увеличивается адсорбционная активность антибиотика, вызванная протонированием amino-групп. Этот фактор преобладает при рН  $\geq 5.25$  для аналитов, имеющих куполообразную зависимость теплоты адсорбции от рН. Уменьшение рН элюента приводит к увеличению энтропии адсорбции, причем переход к элюенту с рН 4.63 дает гораздо большее увеличение энтропии адсорбции, что можно объяснить образованием низкоэнтропийного комплекса адсорбент-адсорбат при данном значении рН.

Полная картина зависимости удерживания профенов на сорбенте с эремомицином в зависимости от рН элюента описана в работах [31, 32]. Они объединяют в себе восходящую ветвь зависимости, как в работе [30], так и ниспадающую ветвь, полученную авторами исследования [29]. Зависимости получены на примере кетопрофена и напроксена в диапазоне рН 4÷8 (рис. 6).

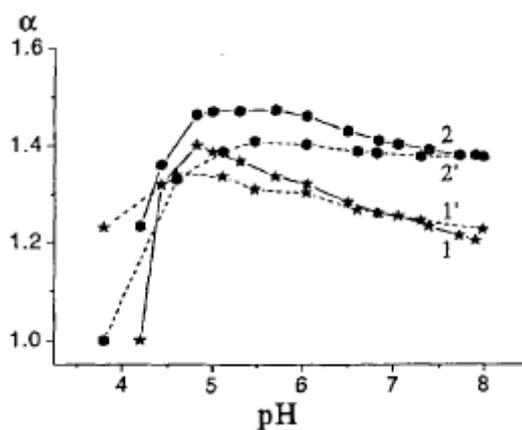


**Рис. 6.** Зависимость удерживания оптических изомеров кетопрофена (а) и напроксена (б) от значения рН элюента состава буферный раствор/этанол, 40/60 (□, ■) и буферный раствор/этанол, 60/40 (○, ●). Светлыми символами обозначены *S*-изомеры, темными – *R*-изомеры. Буферный раствор: 0.5 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1 М ( $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) [32].

Из рис.6 видно, что форма кривых не зависит от соотношения вода/спирт и одинакова для каждого из профенов. Фактор удерживания возрастает при увеличении основности среды и достигает максимума при  $\text{pH}_a \sim \text{pK}_a$  профена (в растворе вода/этанол, 60/40  $\text{pK}_a$  для напроксена 5.7, для кетопрофена 5.4; в растворе вода/этанол, 40/60  $\text{pK}_a$  для напроксена 6.4, для кетопрофена 6.1), после чего уменьшается.

Этот факт объяснён, полагая, что удерживание профенов определяется совокупностью ионообменного и классического адсорбционного механизмов. При низких значениях рН, когда диссоциация кислоты подавлена, профен адсорбируется в виде нейтральной молекулы. С повышением рН возрастает доля диссоциированных молекул, которые адсорбируются по ионообменному механизму. Поскольку ион-ионное взаимодействие сильнее межмолекулярных взаимодействий, вклад ионной составляющей в общее удерживание приводит к росту  $k'$ . Однако с увеличением основности подвижной фазы уменьшается доля протонированных amino-групп эремомидина, то есть центров наиболее сильной адсорбции анионов. Когда этот процесс начинает преобладать, наблюдается падение величины  $k'$ .

Автор [32] изучил зависимость коэффициента селективности от рН элюента, которая также не является монотонной функцией и имеет максимум, который меньше  $\text{pK}_a$  профена (рис. 7).



**Рис. 7.** Зависимость коэффициента селективности энантимеров кетопрофена (1, 1') и напроксена (2, 2') в подвижных фазах буферный раствор/этанол 40/60 (1, 2) и 60/40 (1', 2') от pH элюента [32].

Из данных рис. 7 следует, что изменение коэффициента селективности происходит в большей степени при уменьшении pH подвижной фазы от максимального значения, чем при увеличении основности среды. По этой причине разделение оптических изомеров профенов на сорбенте с эремомицином следует осуществлять при значениях pH, близких или несколько превышающих  $pK_a$  аналита. Кроме того, автор делает вывод о том, что ион-ионные взаимодействия вносят определяющий вклад в энантиоразделение, по мере подавления диссоциации аналитов величина  $\alpha$  быстро уменьшается вплоть до 1.

Помимо влияния pH элюента на энантиоразделение профенов на сорбенте с эремомицином в работе [32] исследовано и влияние концентрации буферного раствора в подвижной фазе, полученные результаты представлены в табл. 1.

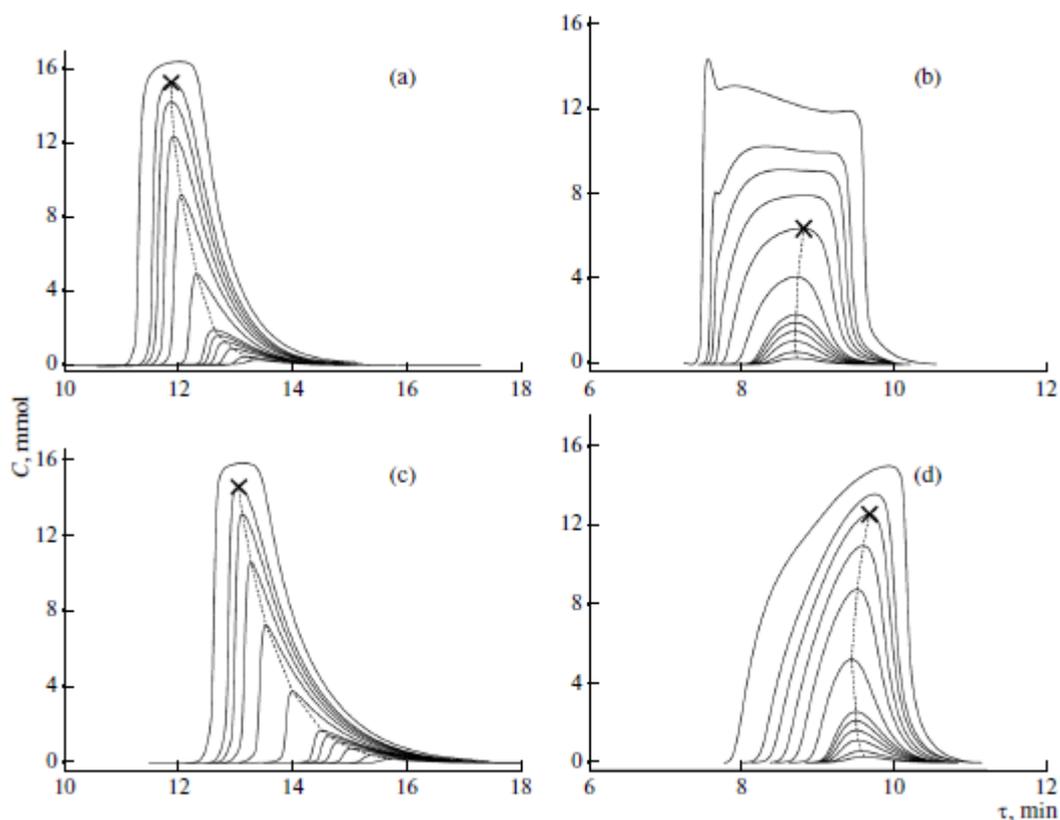
**Таблица 1.** Влияние концентрации ацетата аммония ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) и уксусной кислоты (УК) подвижной фазы на факторы удерживания и селективность разделения энантиомеров профенов. Содержание этанола в элюенте 60 об. % [32].

Соединение	0.1 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$			0.2 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$			0.3 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$		
	$k'_S$	$k'_R$	$\alpha$	$k'_S$	$k'_R$	$\alpha$	$k'_S$	$k'_R$	$\alpha$
	pH <sub>a</sub> 5.68								
	$C_{\text{УК}} = 0.175 \text{ М}$			$C_{\text{УК}} = 0.245 \text{ М}$			$C_{\text{УК}} = 0.402 \text{ М}$		
Ибупрофен	0.78	0.99	1.28	0.56	0.71	1.26	0.43	0.53	1.24
Флурбипрофен	1.90	2.79	1.47	1.28	1.86	1.45	0.94	1.33	1.42
Напроксен	1.92	2.50	1.31	1.37	1.77	1.29	1.03	1.30	1.26
Кетопрофен	2.04	2.49	1.22	1.38	1.66	1.21	1.02	1.22	1.20
	$C_{\text{УК}} = 0.175 \text{ М}$								
	pH <sub>a</sub> 5.68			pH <sub>a</sub> 5.79			pH <sub>a</sub> 5.96		
	Ибупрофен	0.78	0.99	1.28	0.66	0.84	1.28	0.59	0.75
Флурбипрофен	1.90	2.79	1.47	1.42	2.08	1.47	1.19	1.71	1.44
Напроксен	1.92	2.50	1.31	1.58	2.06	1.31	1.39	1.79	1.29
Кетопрофен	2.04	2.49	1.22	1.52	1.84	1.21	1.28	1.53	1.20

Из данных табл. 1 видно, что увеличение концентрации ацетата аммония приводит к значительному уменьшению удерживания профенов, при этом коэффициенты селективности незначительно уменьшаются только в случае подвижной фазы с максимальной концентрацией буферного раствора. Такой же характер зависимостей для аминокислот получен и в работе [25].

Получив хорошие результаты по разделению энантиомеров профенов, эта же группа авторов позже в работе [33] более подробно изучила адсорбцию одного из профенов, в частности, ибупрофена на сорбенте с эремомицином. Целью работы явилось выявление влияния различных факторов на величину сорбции профена и, тем самым, на возможность энантиораспознавания. Как и в предыдущей работе [32], в качестве подвижной фазы использовали смеси водного раствора ацетата аммония и этанола. Концентрация раствора ацетата аммония составляла 0.1 М, а добавка уксусной кислоты – 0.175 М. Авторы варьировали такие параметры, как объемная доля этанола в подвижной фазе (40 – 60 об. %), температура (15 – 40 °С), концентрация рабочих растворов ибупрофена (4 – 40 г/л), объем вводимой пробы (5–80 мкл). Хроматограммы энантиомеров ибупрофена при различном содержании этанола в подвижной фазе представлены на рис. 8. Существует явная тенденция изменения формы пика от формы, характерной для выпуклой изотермы адсорбции (рис. 8 а, с) к форме, характерной для вогнутой изотермы адсорбции (рис. 8 d), с

увеличением доли буферного раствора в элюенте. Такое явление в хиральной хроматографии наблюдали и авторы более ранних работ [34 – 37]. Это поведение авторы объясняют искажением состава подвижной фазы из-за конкурентной адсорбции элюата и компонентов элюента, а также изменением равновесия диссоциации адсорбата, связанным с искажением рН профиля подвижной фазы в движущейся хроматографической зоне из-за наличия в ней адсорбата. На рис. 8 также видно, что интенсивность искажения возрастает с увеличением концентрации пробы, X отмечены пики с явно выраженным максимумом.



**Рис. 8.** Хроматограммы (a, b) *S*- и (c, d) *R*-ибупрофена. Содержание этанола в ПФ (a, c) 40 и (b, d) 60 об. %. Минимальный (максимальный) пики на хроматограммах соответствуют концентрации образца 0.1 (15.5) мкмоль,  $t=22$  °C [33].

При изучении изотерм адсорбции энантиомеров авторы данной работы выяснили, что *S*-ибупрофен первым элюируется с колонки и его изотермы адсорбции лежат ниже изотерм, соответствующих *R*-изомеру, снижение концентрации этанола в элюенте приводит к увеличению сорбции каждого из энантиомеров на сорбенте. Этот эффект может быть объяснен уменьшением сольватирующей способности подвижной фазы с уменьшением доли этанола. Действительно, растворимость ибупрофена падает при уменьшении доли органической составляющей в подвижной фазе.

Исследование влияния температуры на величину адсорбции ибупрофена проводили, используя подвижную фазу состава: этанол/ацетатный буферный раствор, 60/40. Изотермы снимали при температурах 15, 22, 30, 40 °С. Построенные изотермы (зависимость  $\ln C_1$  от  $1/T$ ) линейны для *R*-ибупрофена (коэффициент корреляции  $r > 0.999$ ) и для *S*-ибупрофена ( $r > 0.99$ ).

#### **1.1.5. Сорбент с эремомицином для препаративной ВЭЖХ**

Данные по разделению энантиомеров на хиральных сорбентах с эремомицином позволяют прогнозировать возможность их использования в препаративной хиральной хроматографии для контроля оптической чистоты препаратов и их количественной наработки. В частности, в работе [38] показана возможность препаративного разделения энантиомеров D,L-метионина методом SMB-хроматографии (simulated moving bed). Особенностью SMB-хроматографии является подача рацемической смеси в центр колонки, заполненной сорбентом. За счет использования нескольких колонок и сложных режимов переключения потоков элюента изомеры накапливаются и отводятся по разные стороны от точки ввода. Основными преимуществами данной технологии по сравнению с традиционной препаративной хроматографией являются непрерывный режим работы, высокая производительность и низкий расход элюента [27]. В работе использовали восемь хиральных колонок с иммобилизованным эремомицином, размером 6×0.8 см, размером частиц 15 мкм, собранных в SMB-установку. Исследование разделения энантиомеров метионина проводили в двух режимах нагрузки (концентрация вводимой пробы 1 г/л и 10 г/л). Подвижная фаза: метанол/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1 М, рН 4.4), 20/80. Метод позволяет получить с высокой чистотой и продуктивностью оба энантиомера как в области линейной изотермы адсорбции, так и в нелинейной, причем стабильность условий сохранялась на протяжении трех недель непрерывной работы.

Таким образом, на данный момент хиральные неподвижные фазы с макроциклическим антибиотиком эремомицином позволяют разделять энантиомеры таких классов веществ, как аминокислоты, их дансил-производные, профены, производные  $\alpha$ -фенилуксусной кислоты. Сводные данные по энантиоразделению на сорбентах с эремомицином методом ВЭЖХ представлены в табл. 2.

**Таблица 2.** Условия разделения энантимеров веществ на сорбентах с эремомицином.

Вещество	Вариант ВЭЖХ	Подвижная фаза	Ссылка
<b>Аминокислоты</b>			
Аланин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
		Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 – 0.1 М, рН 3.0 – 7.0), 20/80	[24, 25, 26]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (рН 3.8), 60/40	[25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
		Метанол/ТЕАА (0.2 %, рН 4.1), 20/80, 40/60	[25]
Валин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
		Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.1 М), 20/80	[24, 25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (рН 3.8) 60/40	[25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
		Метанол/ТЕАА (0.2 %, рН 4.1), 20/80, 40/60	[25]
Норвалин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
		Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.1 М), 20/80	[24, 25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (рН 3.8), 60/40	[25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
		Метанол/ТЕАА (0.2 %, рН 4.1), 20/80, 40/60	[25]
Триптофан	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
		Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.1 М), 20/80	[24, 25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (рН 3.8), 60/40	[25]
		Метанол/ТЕАА (1 %, рН 4.1), 60/40	[25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
		Метанол/ТЕАА (0.2 %, рН 4.1), 20/80, 40/60	[25]
Метионин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
		Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 – 0.1 М, рН 3.0 – 7.0), 20/80	[24, 25, 26]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (рН 3.8), 60/40	[25]
		Метанол/ТЕАА (1 %, рН 4.1), 60/40	[25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
		Метанол/ТЕАА (0.2 %, рН 4.1), 20/80, 40/60	[25]
Лейцин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
Норлейцин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
		Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.1 М), 20/80	[24, 25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (рН 3.8), 60/40	[25]
		Метанол/ТЕАА (0.2 %, рН 4.1), 20/80, 40/60	[25]

Продолжение табл. 2			
Серин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
		Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 – 0.1 М, pH 3.0 – 7.0), 20/80	[24, 25, 26]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (pH 3.8), 60/40	[25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
Треонин	ОФ	Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (100 мМ), 20/80	[24, 25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
Цитрулин	ОФ	Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (100 мМ), 20/80	[24, 25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (pH 3.8), 60/40	[25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
		Метанол/ТЕАА (0.2 %, pH 4.1), 20/80	[25]
Пролин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
Пипеколиновая кислота	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
Фенилглицин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
Фенилаланин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
		Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 – 0.1 М, pH 3.0 – 7.0), 20/80	[24, 25, 26]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (pH 3.8), 60/40	[25]
		Метанол/ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
		Метанол/ТЕАА (0.2 %, 1 %, pH 4.1) 20/80, 40/60, 60/40	[25]
Тирозин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
Лизин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
3,4-дигидроксифенилаланин	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[24, 25]
<i>m</i> -Фтортирозин	ОФ	Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.1 М), 20/80	[24, 25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (pH 3.8), 60/40	[25]
		Метанол/ТЕАА (0.2 %, 1 %, pH 4.1) 20/80, 40/60, 60/40	[25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
2-Тиенилаланин	ОФ	Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.1 М), 20/80	[24, 25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COOH (pH 3.8), 60/40	[25]
		Метанол/ТЕАА (0.2 %, 1 %, pH 4.1) 20/80, 40/60, 60/40	[25]
		Метанол/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (25 мМ), 85/15	[25]
$\alpha$ -Аминобутановая кислота	ОФ	Метанол/вода, 50/50	[25]
Глутаминовая кислота	ОФ	Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 М, pH 3.0 – 7.0)	[26]
Аспарагиновая кислота	ОФ	Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 М, pH 3.0 – 7.0)	[26]
Цистеин	ОФ	Метанол/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 М, pH 3.0 – 7.0)	[26]
		Метанол/вода, 50/50	[25]

Продолжение табл. 2			
<b>Дансил-производные аминокислот</b>			
Дансил-производные (лейцин, метионин, норлейцин, фенилаланин, треонин, серин)	ПО	Метанол/0.1 % триэтиламин/0.1 % уксусная кислота	[27]
<b>Производные <math>\alpha</math>-фенилкарбоновых кислот</b>			
$\alpha$ -Гидроксифенилуксусная (миндальная) кислота	ОФ	Этанол/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0.1 М) (этанол 30 – 70 %)	[28]
$\alpha$ -Метоксифенилуксусная кислота	ОФ	Этанол/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0.1 М) (этанол 30 – 70 %)	[28]
2-Фенилпропионовая кислота	ОФ	Этанол/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0.1 М) (этанол 30 – 70 %)	[28]
2-Фенилбутановая кислота	ОФ	Этанол/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0.1 М) (этанол 30 – 70 %)	[28]
<b>Профены</b>			
Напроксен	ОФ	Этанол/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0.1 М, pH 4 – 8)	[30–32]
Ибупрофен	ОФ	Этанол/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0.1 М, pH 4 – 8)	[30–32]
	ПО	Метанол/триэтиламин/уксусная кислота	[29]
	ОФ	Метанол/фосфатный буфер (100 мМ), 40/60	[29]
Флурбипрофен	ОФ	Этанол/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0.1 М, pH 4 – 8)	[30–32]
	ОФ	Метанол/ фосфатный буфер (100 мМ), 40/60	[29]
Кетопрофен	ОФ	Этанол/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0.1 М, pH 4 – 8)	[30–32]
	ПО	Метанол/триэтиламин/уксусная кислота	[29]
	ОФ	Метанол/фосфатный буфер (100 мМ), 40/60	[29]
Фенопрофен	ПО	Метанол/триэтиламин/уксусная кислота	[29]
	ОФ	Метанол/фосфатный буфер (100 мМ), 40/60	[29]
Индопрофен	ПО	Метанол/триэтиламин/уксусная кислота	[29]
	ОФ	Метанол/фосфатный буфер (100 мМ), 40/60	[29]

Из данных табл. 2 видно, что разделение энантиомеров веществ на сорбенте с эремомицином возможно в двух вариантах хроматографии – обращенно-фазовом и полярно-органическом, причем в ОФ варианте чаще всего в качестве подвижной фазы используют метанол в сочетании с водой, фосфатным буферным раствором, раствором ацетата аммония, уксусной кислоты или триэтиламиноацетатным буферным раствором. В ПО режиме подвижной фазой чаще всего служит метанол с добавками триэтиламина и уксусной кислоты.

## **1.2. Эремомицин как хиральный селектор для энантиораспознавания веществ методом капиллярного электрофореза**

Помимо хроматографии макроциклические антибиотики широко используют в качестве хиральных селекторов и в методе капиллярного электрофореза [20, 39]. Опубликовано много работ, в которых антибиотики зарекомендовали себя для разделения энантиомеров различных классов веществ, в том числе лекарственных препаратов [40 – 46].

Основными факторами в капиллярном электрофорезе, влияющими на энантиоразделение являются состав и рН буферного раствора, концентрация введенного хирального селектора, добавка органического модификатора, эффект образования мицелл при добавлении поверхностно-активных веществ в фоновый электролит [46].

Эремомицин, хорошо зарекомендовавший себя в качестве хирального селектора в хроматографии, стал интересен для изучения и в капиллярном электрофорезе в силу схожести реализации механизмов энантиораспознавания этих методов.

### ***1.2.1. Разделение энантиомеров ароматических кислот (профены, производные $\alpha$ -фенилуксусной кислоты)***

Одними из первых эремомицин в качестве селектора в капиллярном электрофорезе стали использовать сотрудники химического факультета МГУ.

В работе [47] впервые проведено разделение энантиомеров профенов с помощью эремомицина методом КЭ. Разделение энантиомеров проводили на примере таких профенов, как флурбипрофен, фенопрофен, ибупрофен, индопрофен, кетопрофен, в кварцевом капилляре с фосфатным или боратным буферным раствором в качестве фонового электролита.

Изучение авторами стабильности раствора эремомицина в 0.1 М фосфатном буферном растворе показало, что раствор стабилен в течение порядка 170 часов, однако при использовании растворов со значением рН <4.0 и больше рН >8.5 раствор стабилен в течение нескольких часов. Увеличение температуры раствора с 25 до 30 °С также ускоряет процесс деструкции.

Авторы исследовали несколько параметров, влияющих на разделение профенов, в частности: рН и состав фонового электролита, концентрация

эремомицина, условия разделения, органический растворитель. рН фосфатного буферного раствора варьировали от 5.3 до 8.2, рН боратного буфера (концентрация 50 мМ) 9.2. Буферные растворы с большей концентрацией (50 и 100 мМ) уменьшают адсорбцию эремомицина на стенках капилляра, повышая эффективность разделения, растворы с меньшей концентрацией увеличивают времена миграции профенов. При использовании буферного раствора с концентрацией выше 100 мМ увеличивается нестабильность фонового сигнала, что ухудшает энантиоразделение. Наилучшие результаты были получены авторами при использовании в качестве фонового электролита фосфатного буферного раствора 50 мМ при рН 6.5.

Увеличение концентрации эремомицина в фоновом электролите с 1 до 7.5 мМ приводит к увеличению разрешения пиков профенов и времени их миграции, разрешение пиков до базовой линии наблюдалось, начиная с концентрации 2.5 мМ.

Изучая влияние условий разделения, авторы варьировали длину капилляра, его внутренний диаметр и величину приложенного напряжения. Использование короткого капилляра ухудшает параметры разделения энантиомеров. Увеличение приложенного напряжения от +5 до +10 кВ незначительно уменьшает (около 3 мин) время миграции и повышает эффективность, дальнейшее повышение напряжения повышает уровень шума фонового сигнала, и обнаружение профенов становится невозможным.

Добавка ацетонитрила в фоновый электролит (<18%) привела к незначительному изменению параметров разделения, наблюдали лишь незначительное увеличение селективности и улучшение формы пика. При дальнейшем увеличении объемной доли ацетонитрила форма пиков, их разрешение ухудшаются, что, возможно, связано с перестройкой адсорбционного слоя на поверхности капилляра, связанной с сольватацией эремомицина и аналитов. Те же явления наблюдали и при добавлении метанола в фоновый электролит.

В работе [48] сотрудники химического факультета исследовали адсорбцию эремомицина уже не только на кварцевых капиллярах, как в предыдущей работе, но и на стенках кварцевого капилляра, модифицированного хитозаном. Помимо уже упомянутых в предыдущей работе профенов (флурбипрофен, фенопрофен,

ибупрофен, индопрофен, кетопрофен), авторы в качестве тестовых соединений использовали миндальную,  $\alpha$ -метоксифенилуксусную, 2-фенилпропионовую, 3-фенилбутановую кислоты. В качестве фонового электролита использовали ацетатный буферный раствор. Показаны два варианта модифицирования капилляра хитозаном: получение покрытия путем промывки подготовленного капилляра 0.5 % раствором хитозана, описанное в [49], получение сшитого слоя хитозана на стенках капилляра, путем обработки капилляра 1 % раствором хитозана с последующей промывкой 12.5 % раствором глутарового альдегида, описанное в [50].

В зависимости от pH раствора антибиотик эремомицин может быть положительно или отрицательно заряжен, в 0.1 М фосфатном буферном растворе его изоэлектрическая точка  $pI$  7.6. Авторами выявлено, что использование добавки эремомицина с концентрацией больше 0.8 мМ при его адсорбции на немодифицированном капилляре приводит к обращению электроосмотического потока, что вызвано взаимодействием положительно заряженного эремомицина с поверхностью кварцевого капилляра. Поэтому для уменьшения адсорбции изменяют заряд поверхности кварцевого капилляра путем покрытия его хитозаном ( $pK_a$  6.5). Использование капилляра со слоем несшитого хитозана не позволило воспроизводимо разделить энантиомеры исследованных соединений в ацетатном буферном растворе с pH 5.5. Вероятно, это связано с невозможностью времен миграции и площадей пиков аналитов из-за конкурентной адсорбции хитозана и эремомицина на стенках кварцевого капилляра.

Только капилляр со сшитым на его поверхности хитозаном обеспечил хорошие результаты разделения энантиомеров исследованных соединений. На таком капилляре авторы исследовали влияние концентрации эремомицина в фоновом электролите на параметры разделения энантиомеров. Разрешение пиков улучшается при увеличении концентрации эремомицина с 0.75 до 1.60 мМ, при этом времена миграции незначительно увеличиваются. Для увеличения воспроизводимости времен миграции исследователи добавляли хитозан в фоновый электролит. Наилучшие результаты разделения в присутствии добавки хитозана  $5 \cdot 10^{-3}$  % получены для индопрофена и флурбипрофена. Дальнейшее увеличение

концентрации хитозана в растворе увеличивает уровень шума фонового сигнала, время миграции и ухудшает разрешение пиков.

Максимальное разрешение в работе [48] достигнуто для индопрофена, кетопрофена, флурбипрофена ( $R_s$  6.0, 4.1, 2.6 соответственно), минимальное - для  $\alpha$ -метоксифенилукусной кислоты, 2-фенилпропионовой кислоты ( $R_s$  0.8 и 0.7 соответственно). Время анализа для всех исследуемых соединений не превышало 9 минут, что значительно меньше, чем при использовании капилляра, не модифицированного хитозаном.

Эти же авторы [51] получили хорошее разделение энантиомеров ароматических кислот при низкой концентрации эремомицина в фоновом электролите на капилляре, химически модифицированном 3-аминопропилтриметоксисиланом, и капилляре, модифицированном эремомицином через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан. Авторы исследовали адсорбцию эремомицина на стенках капилляров путем его ввода в качестве анализируемой пробы. Для всех исследованных капилляров с увеличением концентрации эремомицина во вводимой пробе уменьшается эффективность и увеличивается асимметрия пика, что связано с адсорбцией эремомицина на поверхности капилляра. Степень адсорбции эремомицина на модифицированных капиллярах существенно меньше, чем на немодифицированном кварцевом капилляре. Причем, покрытие аминосиланом в большей степени уменьшает адсорбцию, чем покрытие эремомицином через эпоксисилан.

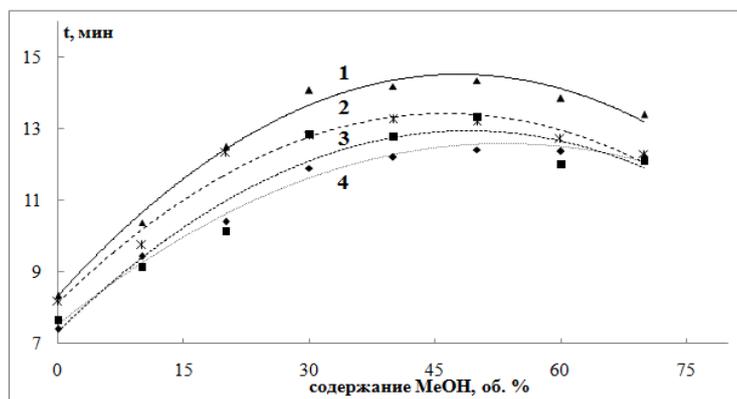
Разделение энантиомеров профенов в присутствии эремомицина на немодифицированных капиллярах занимало 30 – 40 минут [47], а в модифицированных капиллярах достаточно 12 минут. Помимо уменьшения времени анализа, еще одним достоинством модифицированных капилляров по сравнению с немодифицированными является более низкая концентрация эремомицина, при которой достигается энантиоразделение. Разделение пиков энантиомеров профенов в капилляре, модифицированном эремомицином через эпоксисилан, достигается при более низкой концентрации эремомицина (0.1 мМ) в фоновом электролите, чем в аминированном капилляре (0.25 мМ).

*Лебедева* с соавторами [52] продолжили изучение влияния добавки органического растворителя в фоновый электролит, которое начали в [47], в

качестве органического модификатора для разделения энантиомеров профенов использовали метанол. Разделение энантиомеров флурбипрофена, кетопрофена, фенопрофена, индопрофена проводили в немодифицированном кварцевом капилляре, в качестве фонового электролита использовали смеси метанола и фосфатного буферного раствора (50 мМ, рН 4.8; 5.8; 7.3) с добавками эремомицина.

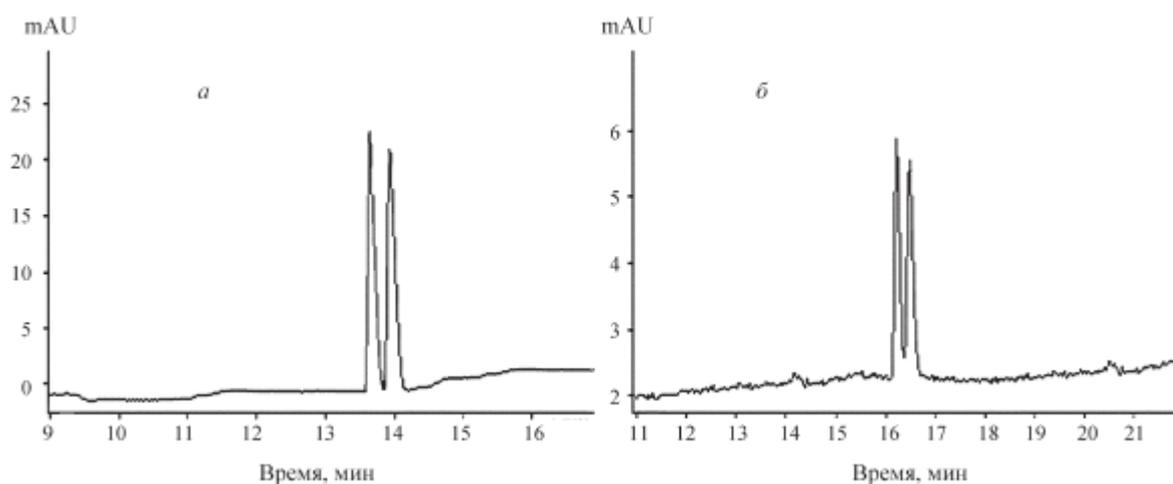
В работе исследована адсорбция эремомицина на стенках капилляра при его концентрации во вводимой пробе в диапазоне от 0.01 до 8.25 мМ, при этом соотношение метанол/фосфатный буфер в фоновом электролите составляло 60/40 об. %. Авторы отмечают, что скорость электроосмотического потока при увеличении концентрации эремомицина во вводимой пробе падает, что связано с уменьшением суммарного отрицательного заряда стенок капилляра вследствие адсорбции положительно заряженных молекул селектора. Общая подвижность эремомицина с ростом его концентрации во вводимой пробе увеличивается, а затем выходит на плато (диапазон концентраций 4.12÷8.25 мМ). Начальный (1.03–4.12 мМ) участок полученной изотермы линейен, его можно рассматривать как изотерму Генри, тангенс угла наклона которой равен константе  $A$ , которая пропорциональна степени заполнения поверхности стенки капилляра молекулами эремомицина и характеризует скорость изменения общей подвижности в зависимости от концентрации антибиотика. Константа  $A$  в исследованных условиях составила  $6 \times 10^{-3} \text{ см}^2/\text{кВ} \times \text{мМ} \times \text{с}$ , что меньше константы, полученной в ранних работах авторов для капилляра, модифицированного через 3-глицидилоксипропилтриэтоксисилан ( $A=8.8 \times 10^{-2} \text{ см}^2/\text{кВ} \times \text{мМ} \times \text{с}$ ). Таким образом, применение водно-органического фонового электролита значительно уменьшает адсорбцию эремомицина на внутренних стенках кварцевого капилляра, и она уменьшается даже по сравнению с его адсорбцией при использовании модифицированных капилляров.

Исследование разделения энантиомеров авторы проводили, используя концентрацию метанола в фоновом электролите в диапазоне 0 – 70 об.% (рис. 9).



**Рис. 9.** Зависимость времен миграции профенов от объемной доли метанола в фоновом электролите в присутствии эремомицина в качестве хирального селектора в кварцевом капилляре [52].

Зависимость времени миграции индопрофена, кетопрофена, фенопрофена и флурбипрофена от содержания метанола в ФЭ представлена на рис. 9. Времена миграции профенов монотонно возрастают при увеличении содержания метанола от 0 до 30 об. %, при дальнейшем увеличении содержания метанола до 60 об. % практически не меняются, а затем несколько уменьшаются. Увеличение содержания метанола приводит к увеличению времени миграции профенов, а также некоторому уменьшению коэффициентов селективности и разрешения пиков энантиомеров профенов. Это связано с тем, что при увеличении доли метанола в фоновом электролите заряд молекулы эремомицина уменьшается, и электростатические взаимодействия между селектором и профенами ослабевают. Содержание метанола 60 об. % позволяет разделить энантиомеры профенов до базовой линии. При таком содержании метанола в фоновом электролите авторами проведено исследование влияния pH фосфатного буфера на параметры разделения. При изменении pH от 4.8 до 7.3 времена миграции профенов увеличиваются примерно в полтора раза, а энантиоселективность ухудшается, наилучший результат наблюдается при pH 5.8. Разрешение пиков энантиомеров зависит от концентрации селектора, которую изменяли в интервале 0.5 – 2.0 мМ. Разрешение пиков энантиомеров с ростом концентрации селектора увеличивается, что свидетельствует об образовании диастереомерных комплексов, при этом время миграции профенов почти не изменяется. Лучше всего делятся энантиомеры флурбипрофена и индопрофена, хуже всего – фенопрофена. На рис. 10 приведены электрофореграммы рацемических смесей флурбипрофена и индопрофена.



**Рис. 10.** Электрофореграммы флурбипрофена (а) и индопрофена (б). Условия: метанол/фосфатный буферный раствор (рН 5.8), 60/40, 0.5 мМ эремомицин,  $U=-20$  кВ [52].

Авторы использовали выбранные условия для определения кетопрофена в геле «Быструм гель», найденное содержание кетопрофена ( $2.4 \pm 0.1$ ) % совпадает с заявленным производителем (2.5 %).

### **1.2.2. Разделение энантиомеров N-производных аминокислот**

В работе [53] оценены возможности использования макроциклического антибиотика эремомицина как хирального селектора для разделения энантиомеров N-производных аминокислот в капиллярном электрофорезе. В качестве тестовых соединений использовали дансильные производные фенилаланина, лейцина, треонина, карбоксбензильные производные аспарагиновой кислоты и аланина. В качестве фонового электролита использовали растворы эремомицина в фосфатном (50 и 100 мМ, рН 6.2 и 7.1), боратном (50 мМ, рН 9.2) буферных растворах, а также раствор ТРИС (50 мМ, рН 8.0). Для выбора условий разделения энантиомеров тестовых соединений варьировали природу и рН фонового электролита, длину капилляра, величину приложенного напряжения, концентрацию хирального селектора.

При использовании фосфатного буферного раствора с рН 7.1 тестовые соединения имеют низкую подвижность, поэтому для получения пиков на электрофореграмме необходимо прикладывать внешнее давление 10 – 15 мбар. Время миграции веществ составляет 17 – 26 минут. Использование авторами такого буферного раствора позволило разделить энантиомеры всех исследованных дансил-производных аминокислот. Селективность разделения энантиомеров

возрастает в ряду дансил-фенилаланин < дансил-лейцин < дансил-треонин. Использование фосфатного буферного раствора с рН 6.2 уменьшает времена миграции веществ, при этом параметры разделения энантиомеров ухудшаются, тоже происходит и при уменьшении эффективной длины капилляра.

Использование боратного буферного раствора (50 мМ, рН 9.2) увеличивает подвижность аналитов, тем самым разделение можно проводить без дополнительного внешнего давления, хотя длительность анализа велика (40 минут для дансил-лейцина). При этом наблюдается повышение эффективности, незначительное уменьшение селективности. Использование боратного буферного раствора позволило разделить энантиомеры дансил-производных аминокислот без внешнего давления в коротком капилляре с хорошими значениями разрешения пиков (2.64, 1.59 и 1.80 для дансил-производных фенилаланина, лейцина и треонина, соответственно).

Применение буферного раствора ТРИС (50 мМ, рН 8.0) в качестве фонового электролита значительно уменьшает величину тока во время анализа за счет уменьшения электропроводности, повышая тем самым стабильность системы, но при этом уменьшаются энантиоселективность и эффективность капилляра (разрешение пиков энантиомеров дансил-производных аминокислот составляет 1.6 – 1.9).

В целом, наиболее удачным для разделения энантиомеров исследованных соединений оказался фосфатный буферный раствор с рН 7.1.

Параметры разделения энантиомеров зависят и от концентрации хирального селектора, которую изменяли в диапазоне 1 – 5 мМ. Время миграции всех исследуемых соединений возрастает с увеличением концентрации эремомицина, причем разделение энантиомеров КБЗ-производных аспарагиновой кислоты и аланина возможно только при минимальной концентрации антибиотика. Наилучшие значения разрешения пиков для дансил-производных аминокислот получены при концентрации эремомицина 2.5 мМ.

Таким образом, метод капиллярного электрофореза с использованием в качестве хирального селектора эремомицина позволяет разделять энантиомеры таких классов веществ, как профены, производные  $\alpha$ -фенилуксунной кислоты, дансил- и КБЗ-производные аминокислот, причем разделение возможно как в

немодифицированных капиллярах, так и в модифицированных капиллярах (в частности, модифицирование хитозаном, 3-аминопропилтриметоксисиланом, 3-глицидилоксипропилтриэтоксисиланом) в присутствии и без органического модификатора в фоновом электролите. Как и другие макроциклические антибиотики, эремомицин сильно адсорбируется на стенках кварцевого капилляра, что ухудшает эффективность и искажает результаты анализа [54]. Уменьшить адсорбцию антибиотиков на стенках капилляра можно путем предварительного модифицирования стенок капилляра [55] или используя неводные фоновые электролиты.

## **Глава 2. Бычий сывороточный альбумин как хиральный селектор для разделения оптических изомеров веществ**

### **2.1. Протеиновые хиральные неподвижные фазы**

Белки – высокомолекулярные природные органические соединения, состоящие из  $\alpha$ -аминокислот, соединённых в цепочку пептидной связью. Сложная молекулярная структура белков делает их очень интересным объектом для изучения процессов связывания с сорбатом. Метод аффинной хроматографии был развит на основе представлений о способности пар белок – лиганд образовывать весьма прочные комплексы. Подобные пары можно обнаружить во многих природных системах, это, например, такие пары, как фермент – субстрат, фермент – кофактор, гормон – рецептор и т.д. Кроме того, многие «неприродные» синтетические соединения также могут сильно связываться с белками.

Об энантиоселективных свойствах белков известно уже больше 60 лет. В 1954 году *Karush* впервые [56, 57] сообщил о том, что концентрационные зависимости связывания двух энантиомеров анионного красителя фенил-(*n*-(*n*-диметиламинобензолазо)-бензоиламиноацетата с сывороточным альбумином человека различны. Чуть позже *McMenamy* и *Oncley* [58] также изучили энантиоселективную природу белков. Они отмечали, что L-триптофан связывается гораздо сильнее с сывороточным альбумином, нежели D-триптофан при проведении экспериментов с помощью изотопных меток. В 1972 году в [59] авторы указывали на различия в связывании D- и L-стероидов прогестерона и альдостерона, меченных тритием и C<sub>14</sub>, с сывороточным альбумином.

Первое упоминание белка (в частности БСА), закрепленного на поверхности неподвижной фазы для разделения энантиомеров триптофана, произошло в 1973 в [60]. С этого момента белки стали полноправным классом хиральных селекторов для разделения энантиомеров оптически активных соединений в ВЭЖХ и КЭ. На сегодняшний день опубликовано ряд обзоров, освещающих применение белков в качестве селекторов [61 – 69].

Белки состоят из аминокислот, гликопротеины – из аминокислот и сахаров. Поскольку аминокислоты и сахара являются оптически активными, все белки могут распознавать хиральные молекулы. Тем не менее, только ограниченное количество белков используют в качестве хиральных неподвижных фаз (**ХНФ**) для ВЭЖХ. ХНФ на основе белков представляют особый интерес, так как они обладают уникальными энантиоселективными свойствами и подходят для разделения широкого спектра энантиомерных форм [63]. Основные типы белков, используемые в качестве хиральных селекторов, представлены в табл. 3.

**Таблица 3.** Типы белковых хиральных селекторов [63].

<b>Классы белков</b>	<b>Белки</b>	<b>Молекулярная масса</b>	<b>Изоэлектрическая точка</b>
Альбумины	Бычий сывороточный альбумин	66000	4.7
	Человеческий сывороточный альбумин	65000	4.7
Гликопротеины	Авидин	66000	10
	Рибофлавин	32000 – 36000	4.0
	Овомукоид	28000	4.1
	$\alpha_1$ -Кислый гликопротеин	41000	2.7
	Овогликопротеин	30000	4.1
Ферменты	Лизоцим	14300	10.5
	Амилоглюкозидаза	97000	4.2
	Целлобиогидролаза I	64000	3.9
	Пепсин	34600	<1.0
Другие	Овотрансферрин	77000	6.1
	$\beta$ -Лактоглобулин	18000/ 36000	5.2

Основными преимуществами хиральных неподвижных фаз на основе белков являются: возможность работы с водными ПФ в варианте ОФ ВЭЖХ,

энантиоселективность по отношению к широкому кругу соединений, в том числе лекарственных препаратов, возможность проведения разделения энантиомеров без предварительной дериватизации. К недостаткам можно отнести низкую емкость, ограниченные условия использования и сложность в интерпретации механизмов удерживания. В настоящее время энантиоразделение с использованием белков в качестве селекторов, как правило, осуществляется в формате ВЭЖХ, существует целый ряд коммерчески доступных колонок с протеиновыми селекторами (CHIRAL-AGP, CHIRAL-HSA, CHIRAL-CBH, CHIRAL-RSA, CHIRAL-DSA, CHIRAL-MSA, Resolvosil-BSA).

Рассмотрим более подробно возможности бычьего сывороточного альбумина в качестве хирального селектора, как первого белка, использовавшегося для этих целей.

## **2.2. Бычий сывороточный альбумин в качестве хирального селектора в ВЭЖХ**

Бычий сывороточный альбумин, относящийся к глобулярным белкам, представляет собой глобулу в форме сплюснутого эллипсоида вращения размером  $140 * 40 \text{ \AA}$  [70]. БСА имеет молекулярную массу 66210 Да и состоит из 581 аминокислотного остатка, включает 17 внутримолекулярных дисульфидных мостиков, соединяющих 34 остатка цистеина с образованием 9 двойных петель, сгруппированных в 3 схожих домена. БСА – относительно кислый белок, растворим в воде, изоэлектрическая точка  $pI$  4.7. При  $pH$  7.0 имеет заряд -18. БСА способен связывать большинство органических соединений, содержащих по меньшей мере 5 или 6 гидрофобных метиленовых звеньев, и неорганические анионы, очень гидрофобные в природе. Анионы жирных кислот сильно связываются с БСА, тем самым, вызывая стабилизирующий эффект, поэтому БСА стабилизируют каприловой кислотой [57].

В упоминавшейся уже первой статье с БСА [60] как хиральным селектором авторы *Stewart* и *Doherty* в качестве основы для закрепления БСА использовали агарозу (сорбент агароза-БСА), закрепление белка на ее поверхности проводили или напрямую, или через этилендиамин-янтарную кислоту (сорбент агароза-сукциниламиноэтил-БСА). Для сравнения авторы синтезировали ХНФ, не содержащую БСА, сукциниламиноэтил-агарозу. Используя в качестве

элюирующих растворов 0.1 М боратный буферный раствор, а затем 0.1 М уксусную кислоту на каждой из хиральных неподвижных фаз, авторы элюировали из колонки сначала D-триптофан, а затем L-изомер. А при работе с неподвижной фазой только с сукциниламиноэтил-агарозой триптофан выходил в виде одного пика вместе с системным пиком.

Немного позже *Allenmark* и *Bomgren* [71] синтезировали еще одну ХНФ с БСА на основе агарозы. В данной работе пришивку БСА проводили к активированной CN-Sepharose 4B и к эпокси-активированной Sepharose 6B. В качестве тестируемых соединений использовали триптофан, 5-гидрокситриптофан, кинуренин, 3-гидрокскинуренин, 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), норэпинефрин. Как и в предыдущей работе, авторам удалось разделить энантиомеры триптофана, заметив при этом, что уменьшение рН буферного раствора до 6.5 позволяет добиться разделения до базовой линии. На синтезированной ХНФ не удалось разделить энантиомеры ДОФА и норэпинефрина.

Позже, в 1983 году эти же авторы *Allenmark* и *Bomgren* [72] ковалентно иммобилизировали БСА на силикагель (10 мкм), заметно увеличив при этом эффективность колонки. Такую ХНФ успешно использовали для разделения энантиомеров различных полярных ароматических соединений, в частности N-бензоил- и N-нафтоил-производных аминокислот. В качестве подвижной фазы использовали фосфатный буферный раствор с или без 5 % добавки 1-пропанола. Для всех 9 исследуемых соединений достигнуты хорошие значения коэффициентов селективности. Исследование зависимостей коэффициентов удерживания изомеров N-бензоил-D,L-аланина от концентрации буферного раствора подвижной фазы и его рН показало, что увеличение концентрации буферного раствора (в диапазоне 10 – 200 мМ) и его рН (5 – 8) приводит к заметному уменьшению удерживания, причем влияние рН раствора больше. Продолжение этого исследования описано в [73], где авторы более подробно изучают зависимость удерживания энантиомеров этих производных аминокислот от состава подвижной фазы (рН, концентрация буферного раствора, добавка изопропанола). Показано, что факторы удерживания энантиомеров уменьшаются при увеличении объемной доли 1-пропанола в подвижной фазе (от 0 до 2 об. %), а также при увеличении рН и концентрации

буферного раствора. Однако для некоторых веществ (в частности для N-бензоил-фенилаланина) увеличение концентрации буферного раствора от 200 до 500 мМ приводит к резкому увеличению удерживания энантиомеров веществ.

Сорбент, описанный в двух предыдущих работах, дал настолько хорошие результаты по энантиоразделению веществ, что в 90-х – начале 2000-х годов *Allenmark* с соавторами посвятили целый цикл работ ХНФ на основе силикагеля с привитым БСА, названной *Resolvosil-BSA*.

В работе 1986 года [74] авторы исследовали энантиоразделяющие способности ХНФ на основе силикагеля с привитым БСА на примере класса N-(2,4-динитрофенил)- (ДНФ) и дансил-производных аминокислот. Для данных классов соединений происходит уменьшение удерживания при увеличении рН фосфатного буферного раствора, увеличении его концентрации и увеличении добавки 1-пропанола в подвижной фазе.

В [75] авторы делили на ХНФ *Resolvosil-BSA-7* изомеры оптически активных барбитуратов. Полученные зависимости удерживания от состава подвижной фазы носят более сложный характер, чем для производных аминокислот, однако сохраняется зависимость разрешения пиков соединений от рН буферного раствора.

На этом же сорбенте *Resolvosil-BSA Allenmark* с соавторами [76] делили энантиомеры ряда биологически активных веществ, среди которых бензadiaзепины, арилпропионовые кислоты, хлорталидон, глутетимид, морфолеп, баклофен, темазепам, кинуренин, метаквалон, аценафтенол. Энантиомеры всех тестовых соединений были разделены с хорошими значениями разрешения и селективности, в качестве подвижной фазы использовали фосфатный буферный раствор с добавками и без 1-пропанола.

В своей следующей работе [77] авторы изменили способ синтеза сорбента с БСА. Вместо химической прививки белка проведена физическая сорбция БСА, сшитого глутаровым альдегидом, в порах силикагеля. Для этого к БСА в растворе дигидрофосфата аммония (100 мМ, рН 4.4) добавляли силикагель и перемешивали в течение 24 часов, затем к суспензии добавляли 250 мкл 5 % раствора глутарового альдегида, перемешивали еще 2 часа. Стоит отметить, что использование силикагеля с маленьким диаметром пор (50 Å) приводит к тому, что количество

БСА в порах силикагеля мало из-за стерических препятствий проникновения в поры, а небольшое количество БСА на силикагеле с диаметром пор 300 Å можно объяснить вымыванием белка в процессе промывки сорбента. Максимальное количество белка обнаружено на силикагеле со средним диаметром пор 100 Å. Глутаровый альдегид, выступающий в роли сшивающего агента, увеличивает гидрофобность сорбента, что приводит к увеличению удерживания на таком сорбенте гидрофобных веществ. Изучение свойств сорбента проводили на примере ДНФ-, бензоил-производных аминокислот и бензоина. Хроматографические параметры, полученные при разделении энантиомеров бензоина на такой ХНФ, превосходят параметры, полученные авторами для Resolvosil-BSA. Добавка 1-пропанола в подвижную фазу негативно влияет на разделение энантиомеров всех тестовых соединений.

Сравнение сорбентов с БСА, полученных различными способами нанесения селектора на силикагель, и сорбентами, содержащими фрагменты БСА в качестве селектора, проведено теми же авторами в [78]. Использованы четыре типа ХНФ:

1. Resolvosil-BSA (100 Å, 7 мкм); 110 мг БСА/г SiO<sub>2</sub>;
2. Силикагель с адсорбированным в порах БСА, сшитым глутаровым альдегидом (100 Å, 7 мкм); 190 мг БСА/г SiO<sub>2</sub>;
3. 3-Аминопропилсиликагель с БСА, сшитым глутаровым альдегидом (100 Å, 7 мкм); 210 мг БСА/г SiO<sub>2</sub>;
4. Силикагель с адсорбированным БСА (300 Å, 5 мкм); 60 мг БСА/г SiO<sub>2</sub>.

Таким же способом, как и при синтезе ХНФ 3 и 4, на силикагель иммобилизованы также фрагменты БСА (ММ 38000 Да), полученные путем ферментативного расщепления БСА. Для получения сорбента 4 колонку, заполненную силикагелем, промывали раствором БСА в фосфатном буферном растворе (50 мМ, рН 5) до появления в элюате БСА (регистрировали оптическую плотность при 280 нм).

Сравнение сорбентов с фрагментами БСА и с нефрагментированным БСА показало, что на сорбентах с фрагментами БСА сохраняется энантиоселективность только для ограниченного числа соединений, энантиомеры которых можно разделять на сорбенте с БСА. Удерживание на таких колонках значительно меньше.

Способ иммобилизации БСА на силикагель играет большую роль в формировании энантиоселективных свойств сорбента. Сравнение сорбентов с БСА, сшитым глутаровым альдегидом на силикагеле и на 3-аминопропилсиликагеле, показывает, что удерживание веществ на сорбенте на основе 3-аминопропилсиликагеля гораздо больше. Этот факт указывает на то, что уменьшение полярности сорбента по сравнению с силикагелем, вызванное наличием аминопропильных групп, способствует увеличению удерживания веществ и его способности к энантиораспознаванию. Сорбенты 1 и 4 заметно уступают сорбентам 2 и 3 в силу меньшего количества привитого белка на их поверхности.

Выявив значительное преимущество сорбентов с БСА, сшитым глутаровым альдегидом, по сравнению с сорбентами, где БСА не сшит, авторы исследовали влияние природы сшивающего агента на энантиоселективные свойства сорбента [79]. В качестве сшивающих агентов применяли: глутаровый альдегид, формальдегид и ди-(N-сукцинимидил)-карбонат. Матрицей для иммобилизации БСА служил 3-аминопропилсиликагель. В качестве тестовых соединений использовали бензодиазепины, альбендазол и его структурные аналоги, триптофан, метаквалон, бензоин. Из полученных результатов следует, что гидрофобность сшивающего агента сильно влияет на свойства сорбента. Наименее гидрофобный сорбент с ди-(N-сукцинимидил)-карбонатом, в целом, показывает самые низкие значения удерживания веществ и самую высокую энантиоселективность для кислотных соединений. В то же время эффективность колонки с таким сорбентом очень низкая, пики широкие, что пагубно сказывается на величине разрешения. Сорбент с формальдегидом в качестве сшивающего агента имеет самую высокую емкость. В процессе иммобилизации, по-видимому, в зависимости от сшивающего агента белок имеет разную конформацию, и, как следствие, доступность некоторых хиральных центров распознавания изменяется. На удерживание, энантиоселективность, эффективность колонки и форму пика влияет также тип используемого органического модификатора. Как правило, использование апротонного растворителя, такого как ацетонитрил, приводит к получению более симметричных пиков и лучшей эффективности колонки, по сравнению с метанолом.

Хорошие результаты по энантиоразделению на хиральном сорбенте на основе 3-аминопропилсиликагеля с привитым БСА, сшитым с помощью ди-(N-сукцинимидил)-карбонатом, позволили авторам *Andersson* и *Allenmark* более подробно исследовать его свойства в своих работах. В работе [80] на таком сорбенте они делили энантиомеры ряда  $\alpha$ -арил- и  $\alpha$ -арилокси-карбоновых кислот (ибупрофен, напроксен, индопрофен, карпрофен, пирпрофен, беноксапрофен, 2-фенилпропионовая кислота, 2-(4-нитрофенил)-пропионовая кислота, ее амид, ее 2-хлорэтиловый эфир, 2-фенилбутановая кислота, 2-(4-хлорофенокси)-пропионовая кислота), а также изучали энантиоразделение ряда N-(N'-карбазол-карбонил)-производных аминокислот в зависимости от длины углеводородного радикала в аминокислоте ( $R=C_1 - C_6$ ). Производные получали взаимодействием аминокислоты с N-(хлорформил)-карбазолом. Обнаружено быстрое увеличение удерживания производных аминокислот с увеличением длины радикала в структуре аминокислоты. Этот эффект сказывается гораздо сильнее на удерживании второго элюируемого энантиомера, что приводит к существенному увеличению разрешения (для гексил-производного разрешение составило 7.3 при элюировании смесью 20 мМ фосфатного буфера (рН 8.0) и ацетонитрила, 70/30). Кроме того, разрешение увеличивается и с уменьшением объемной доли органического модификатора в подвижной фазе. Таким образом, энантиоселективность зависит от гидрофобности аналита. Анионный заряд молекулы анализируемого вещества также вносит вклад в удерживание, поэтому связывание молекулы аналита определяется одновременно электростатическими и гидрофобными взаимодействиями. Увеличение доли гидрофобных взаимодействий уменьшает конформационную свободу аналита, и тогда основополагающей является стерическая конфигурация при атоме  $\alpha$ -углерода. Стерические затруднения из-за  $\alpha$ -заместителей в первом элюируемом энантиомере препятствуют его сильному связыванию, тем самым, величина удерживания уменьшается.

Более подробное изучение энантиоразделения N-(N'-карбазол-карбонил)-производных аминокислот на сорбенте с БСА описано этими авторами в [81]. Наряду с N-(N'-карбазол-карбонил)-производными делили энантиомеры и FMOС-производных аминокислот, получены хорошие результаты по энантиоразделению для каждого из производных. Авторы предлагают использовать N-(хлорформил)-

карбазол-производные аминокислот для их чувствительного определения с помощью флуоресцентного детектора.

В качестве примеров веществ, энантиомеры которых можно делить на хиральной фазе с БСА *Allenmark* с коллегами в [82] взяли N-ацетил-триптофан, его этиловый эфир, N-(4-нитробензоил)-серин. Получены хорошие результаты по энантиораспознаванию изученных веществ при использовании в качестве подвижной фазы фосфатного буферного раствора (50 мМ, рН 6).

На примере таких соединений, как N-ацетил-триптофан, N-бензоил-фенилглицин, бензонал, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, их ДНФ-производные, фталимидо-аланин, фталимидо-треонин, оксазепам, политиазид, ибупрофен, кетопрофен в работе [83] исследовано влияние амфифильных добавок в подвижную фазу на энантиоразделение. В качестве добавок к буферному раствору и 1-пропанолу использовали катионные (например, гексиламин, октиламин), анионные (гексановая, октановая, декановая кислоты), нейтральные (гексанол) добавки. Результаты показали, что основная функция липофильных (гидрофобных) добавок – конкурирование с аналитом за гидрофобные участки связывания, тем самым такие добавки приводят к значительному уменьшению удерживания аналитов. В удерживание вносит вклад и величина заряда добавки, что подтверждается различным влиянием добавок кислот, аминов и спиртов.

В работе [84] авторы изучали влияние наличия кислот в качестве модификаторов подвижной фазы на удерживание и селективность сорбента с БСА. В качестве добавок использовали трихлоруксусную, цикламовую, лауриновую кислоты, которые, как известно, в качестве модификаторов подвижной фазы вытесняют варфарин из БСА, и три вещества (лоразепам, D-триптофан, L-триптофан), которые не вытесняют варфарин из БСА. Также исследовано влияние трихлоруксусной и цикламовой кислот на разделение энантиомеров бензоина, N-бензоил-аланина, N-бензоил-фенилаланина, лейковорина. Исследование показало, что модификаторы подвижной фазы улучшают энантиораспознавание веществ. Влияние модификаторов на факторы удерживания и селективность зависит от силы связывания аналита и модификатора с БСА.

Разделение и определение энантиомеров омепразола в плазме человека с помощью сорбента Resolvosil-BSA-7 с предварительным концентрированием методом твердофазной экстракции проведено в работе [85].

Авторы работы [86] немного раньше, чем авторы цикла работ про ХНФ с БСА в [78] предложили получать ХНФ с БСА в качестве хирального селектора путем его адсорбции на поверхности силикагеля. Для этого раствор БСА с концентрацией 1 мг/мл в 0.05 М фосфатном буферном растворе пропускали через колонку с силикагелем (300 Å, 5 мкм) до тех пор, пока в элюате не появился БСА, наличие которого контролировали спектрофотометрически при 280 нм. Количество белка, адсорбированное на поверхности сорбента, сильно зависит от pH буферного раствора и максимально при pH 5. Эта зависимость носит куполообразный характер, причем при pH < 3 и при pH > 8 адсорбции БСА на силикагеле практически не происходит. Уменьшение концентрации фосфатного буферного раствора приводит к незначительному увеличению величины адсорбции. На синтезированном сорбенте проведено разделение энантиомеров триптофана, варфарина, бензоина, оксазепамы, энантиомеры омепразола и 2-метилсульфинилбензойной кислоты разделены не были. Такая ХНФ была стабильна в течение 6 месяцев при хранении при температуре +4 °С, pH 5 – 7.

Один из авторов предыдущей работы *Erlandsson* с коллегами синтезировали ХНФ на основе силикагеля с закрепленным фрагментом БСА с N-концевой группой, являющимся продуктом его протолитического распада [87]. На сорбентах с фрагментами БСА с хорошими значениями коэффициентов селективности и разрешения поделили энантиомеры оксазепамы, бензоина, морфолепа. Увеличение (или такие же значения) разрешения, а также уменьшение удерживания на сорбентах с фрагментами БСА, по сравнению с сорбентом с исходным БСА, свидетельствуют о том, что на сорбентах с фрагментами БСА отсутствует часть взаимодействий, не вносящих вклад в хиральное распознавание. Авторы пришли к выводу, что стереоселективные центры для распознавания энантиомеров бензоина, оксазепамы и морфолепа находятся в N-концевой половине БСА. Центры распознавания изомеров веществ, энантиомеры которых делятся на сорбенте с БСА, но не делятся на сорбентах с фрагментами БСА (бензоил-аланин, ДНФ-

глицин, варфарин, триптофан, миндальная кислота, кинуренин), находятся в другой части белка.

К схожим выводам пришла и другая группа ученых в [88]. Они также сравнивали ХНФ с БСА и с фрагментом БСА-FG75 (ММ около 35000 Да), состоящим из нескольких пептидов с N-концевой группой. БСА и его фрагменты прививали на 3-аминопропилсиликагель и сшивали с помощью ди-(N-сукцинимидил)-карбоната. Авторы пришли к выводу о том, что ХНФ с неповрежденным БСА обладает большей энантиоселективностью, в связи с наличием на такой фазе большего числа сайтов энантиораспознавания.

Немного позже эти же авторы в [89] взяли фрагмент БСА, использованный ими в предыдущей работе БСА-FG75 [88] и поделили его на два фрагмента БСА-F1 и БСА-F2, каждый из которых привили на 3-аминопропилсиликагель с помощью ди-(N-сукцинимидил)-карбоната. Сорбенты с фрагментами БСА более энантиоселективны по отношению к лоразепаму и бензоину, но менее к другим тестовым соединениям (среди которых варфарин, темазепам, лорметазепам, оксазепам), по сравнению с сорбентом с БСА. Это может быть следствием изменений в глобулярном строении фрагментов БСА и / или изменений в локальной среде вокруг сайтов распознавания.

*Qiang Zhang* с соавторами [90] синтезировали белковую хиральную неподвижную фазу на основе силикагеля с иммобилизованным БСА с помощью *s*-триазина. В новом методе синтеза ХНФ с БСА к 3-аминопропилсиликагелю пришивается 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазин, к которому затем пришивается БСА путем замены одного из атомов хлора связующего агента на атом азота белка. Авторы также синтезировали стандартный сорбент с БСА, где в качестве сшивающего агента используется глутаровый альдегид. В качестве оптически активного вещества для исследования хроматографических свойств полученного сорбента использовали триптофан. Обнаружено, что БСА, иммобилизованный предложенным новым методом, обладает более высокой энантиоразделяющей способностью по отношению к триптофану по сравнению с БСА, привитым с помощью глутарового альдегида. Это может быть связано с более подходящей конформацией БСА и его большим количеством на силикагеле. В данном исследовании провели энантиоразделение 13 веществ, в их числе: варфарин,

бензоин, триптофан, атропин, фенпрофен и др. Предложенный метод синтеза прост, надежен и воспроизводим; он также подходит для иммобилизации различных биополимеров в подготовке биореакторов, биосенсоров и колонок для аффинной хроматографии.

Еще один способ синтеза ХНФ с БСА для ВЭЖХ предложили в [91]. Вместо силикагелевой матрицы авторы использовали полимер на основе гидроксиэтилметакрилата. Полученный сорбент обладает высокой гидролитической стабильностью и временем жизни, энантиоселективность сохраняется в течение 18 месяцев. рН подвижной фазы варьировали в диапазоне 2 – 11 с добавками 1-пропанола и каприловой кислоты. В качестве тестовых соединений использовали триптофан, гидрокситриптофан, кинуренин, N-2,4-ДНФ-глутаминовую кислоту, бензоил-фенилаланин, дансил-глутаминовую кислоту, 2,3-дibenzoил-винную кислоту, индол-3-молочную кислоту. Максимальное удерживание и коэффициенты селективности всех тестовых соединений достигаются при рН 9. С уменьшением рН подвижной фазы селективность разделения веществ с одной карбоксильной группой падает, а с двумя – увеличивается. Исходная энантиоселективность БСА может быть восстановлена метанолом. При наличии в подвижной фазе модификатора (1-пропанола или каприловой кислоты) изменение рН подвижной фазы существенно влияет на величину коэффициентов селективности веществ. Авторы также отметили, что времена удерживания исследуемых аналитов зависят от объема вводимой в хроматографическую колонку пробы. Недостатком синтезированного сорбента является низкая эффективность, которую авторы объясняют наличием БСА в его составе.

Три способа синтеза сорбента с БСА описаны в работе [92], среди которых уже описанные в других работах – адсорбция БСА на силикагеле путем пропускания через колонку раствора БСА (ХНФ 1) и прививка на 3-аминопропилсиликагель БСА (ХНФ 2), сшитого глутаровым альдегидом, и отличный от всех предыдущих работ синтез – химическая прививка БСА к диол-силикагелю, полученному путем гидролиза эпокси-силикагеля, с карбонилдиимидазолом (ХНФ 3). Количественное содержание БСА на всех трех сорбентах составило около 110 мг/г. В качестве тестовых соединений использовали

бензоил-, циклогексанкарбонил- и N-ацил-производные аминокислот. Для всех сорбентов наблюдали практически полное отсутствие влияния объемной доли 2-пропанола в подвижной фазе на коэффициент селективности, а также его независимость от объема вводимой пробы. Однако ХНФ на основе диол-силикагеля наиболее энантиоселективна и наиболее восприимчива к добавке органического модификатора в подвижную фазу. Авторы доказали, что способ иммобилизации БСА на поверхности силикагеля влияет на доступность сайтов хирального распознавания белка и приводит к изменению гидрофобных взаимодействий, участвующих в хиральном распознавании. Доступность сайтов распознавания белка уменьшается в ряду: ХНФ 3 > ХНФ 2 > ХНФ 1. Влияние органических модификаторов в подвижной фазе на разделение энантиомеров бензоил-производных аминокислот коррелирует с гидрофобностью самой аминокислоты, в то время как энантиораспознавание ацильных производных не зависит от гидрофобности кислоты, но сильно зависит от наличия ароматических фрагментов в структуре.

В работе [93] описана иммобилизация БСА на сорбент, обладающий ионообменными свойствами. В основе синтеза лежит электростатическое взаимодействие белка и ионнообменника. В качестве матрицы использовали анионообменную стационарную фазу с размером частиц 10 мкм и диаметром пор 300 Å. Нанесение БСА на поверхность анионообменника проводили динамически при пропускании через колонку с сорбентом раствора белка концентрацией 2 мг/мл до появления БСА в элюате. Использовали раствор с рН на 1.7 выше, чем изоэлектрическая точка БСА (4.7). Свойства сорбента исследовали на примере разделения энантиомеров бензоил-аланина и миндальной кислоты. Авторы выяснили, что данный способ иммобилизации белка на поверхность не позволяет контролировать ориентацию белка на сорбенте, которая во многом зависит от распределения заряда по его поверхности. Расчеты показали, что на синтезированном хиральном сорбенте только одна из 5 молекул БСА, находящихся на анионообменнике, доступна для энантиораспознавания.

В работе [94] эти же авторы помимо анионообменной фазы для иммобилизации БСА использовали катионообменник. Для иммобилизации БСА на катионообменнике использовали его раствор с рН, на 1.7 ниже, чем

изоэлектрическая точка БСА 4.7, т.е. рН 3. Сорбент обладал теми же хиральными свойствами, что и сорбент на основе анионообменника. Основным преимуществом хиральных сорбентов с БСА на основе ионообменников является то, что количество белка, прививаемого на сорбент, легко контролировать изменением рН раствора белка, и такие фазы легко подвергаются регенерации.

*Satoshi Kiyohara, Masanori Nakamura* и др. [95, 96] исследовали ХНФ на основе пористой полиэтиленовой мембраны с иммобилизованным на ней БСА. Глицидилметакрилат прививали на мембрану из пористого полиэтилена, часть эпокси-групп преобразовывали в диэтиламино-группы путем взаимодействия с диэтиламином, остальные подвергали взаимодействию с этанол-амином для замедления процесса неселективной адсорбции БСА. Через полученное полое волокно пропускали раствор БСА в буферном растворе ТРИС-НСl (рН 8). В работе [96] дополнительно проводили сшивание белка раствором глутарового альдегида в этом же буферном растворе. В результате на грамм мембраны в [95] было иммобилизовано 190 мг БСА, а в [96] – 150 мг/г. Впоследствии, рацемический раствор триптофана пропускали через БСА-многослойную пористую мембрану. Установлено, что распознавание D- и L-триптофана на БСА, адсорбированном в многослойной мембране, представляет собой двухступенчатый процесс, что позволяет разделять и определять его энантиомеры таким способом. При варьировании значений рН буферного раствора подвижной фазы и использовании различных органических модификаторов ХНФ оставались стабильными, смывания БСА с сорбентов не происходило.

*Gilpin* с соавторами в [97] использовали одно из самых популярных тестовых соединений для ХНФ с БСА - триптофан для изучения влияния температуры на его энантиораспознавание на 3-аминопропилсиликагеле с БСА, сшитым глутаровым альдегидом. Температурная зависимость фактора удерживания для D-триптофана ( $\ln k' = f(1/T)$ ) носит линейный характер, а для L-триптофана имеет максимум в районе 20 – 24 °С, эти данные подтверждают тот факт, что у БСА нет специальных сайтов связывания с D-изомером, в отличие от L-изомера, то есть для D-изомера термодинамических изменений в процессе удерживания не происходит.

Сравнение взаимодействий триптофана со свободным и связанным БСА проведено в [98]. Связывание D- и L- молекул триптофана с бычьим сывороточным

альбумином изучено с использованием методов ВЭЖХ и ультрафильтрации в диапазоне рН от 7 до 11. При рН 7 авторы наблюдали гидрофобное взаимодействие между триптофаном и БСА, при более высоком рН сила этого взаимодействия становится пренебрежимо малой. Как для свободного, так и для связанного белка механизм комплексообразования представлял собой конкурентное связывание с D- и L-триптофаном на одном сайте. Кажущиеся константы комплексообразования для D- и L-триптофана максимальны в диапазоне рН 9 – 10. Изменение кажущихся констант комплексообразования в зависимости от рН происходит в результате протонирования аминокислоты и сайта энантиораспознавания, при условии, что комплексообразование происходит между аминокислотой в форме цвиттер-иона и непротонированным сайтом БСА. Кажущаяся  $pK_{BSA}$  привитого белка 8.3 сдвинута относительно  $pK_{BSA}$  свободного белка 9.4, что, по-видимому, объясняется различной конформацией белка.

Авторы работы [99] проводили разделение энантиомеров 6 инденоиндольных соединений на ХНФ с тремя различными белками (БСА,  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин (АГП), овомукоид). Энантиомеры всех исследуемых веществ делятся, по крайней мере, на одной из ХНФ. Фазы с АГП и овомукоидом показали хорошие энантиоселективные свойства для большинства соединений, ХНФ с овомукоидом обладают лучшей эффективностью и пики, полученные на такой ХНФ, наиболее симметричны. Сорбент с БСА самый стабильный из исследованных в данной работе.

Исследование энантиоселективных сайтов связывания сорбента с БСА на примере 19 дансил-производных аминокислот проведено в [100]. Обнаружено, что для 7 производных аминокислот L-изомер элюируется первым, а для 10 дансил-производных аминокислот первым элюируется D-изомер. Энантиомеры дансил-треонина и дансил-глутаминовой кислоты разделены не были. С помощью различий в связывании N-дансил-L-пролина и N-дансил-D-норвалина, авторы пришли к выводу о том, что БСА в своей структуре имеет либо два разных класса, либо два независимых участка распознавания.

*I. Fitos и др.* [101] разработали методику стереоселективного связывания бензодиазепинов и кумаринов сывороточным альбумином из крови человека и млекопитающих. В работе использовали три варианта хроматографии:

- 1) афинную хроматографию (альбумины иммобилизованы на сефарозе 4В);
- 2) ВЭЖХ с использованием хиральных колонок на основе ЧСА и БСА;
- 3) хиральную ультрафильтрационную ВЭЖХ (анализ растворов, содержащих рацемические смеси препаратов и нативный протеин).

Детектирование проводили с помощью УФ-детектора. В качестве подвижной фазы использовали фосфатный буферный раствор (рН 7.0) с добавками органических модификаторов: 2-пропанола и ацетонитрила. Использовали две коммерческие колонки – колонку на основе человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и на основе  $\alpha_1$ -кислого гликопротеина, а также колонку, заполненную силикагелем, химически модифицированным БСА. В ходе эксперимента на предложенной колонке с БСА получили лучшее разделение энантиомеров препаратов по сравнению с коммерческими колонками.

Среди исследованных образцов сывороточных альбуминов обнаружили существенные различия в их предпочтительных конфигурациях и конформации, также авторами отмечена разница в связывании бензодиазепиновых и кумариновых препаратов с сывороточным альбумином человека по сравнению с сывороточным альбумином собаки.

### **2.3. Бычий сывороточный альбумин в качестве хирального селектора в капиллярном электрофорезе**

Существуют несколько примеров использования БСА в качестве хирального селектора в методе капиллярного электрофореза и электрохроматографии.

Разделение энантиомеров пантопразола натрия, омепразола и лансопразола методом капиллярного зонного электрофореза с использованием БСА в качестве хирального селектора осуществлено в [102]. Достигнуто разделение до базовой линии каждого из исследованных веществ. Фоновый электролит представлял собой фосфатный буферный раствор 10 мМ, рН 7.4 с добавкой 40 мкМ БСА и 7 об. % 1-пропанола. Для выбора условий разделения изучено влияние ряда параметров, таких как концентрация БСА, рН буферного раствора, концентрация 1-пропанола, на энантиоразделение. Увеличение концентрации БСА улучшает энантиораспознавание, но понижает чувствительность определения. Разделение энантиомеров исследуемых соединений возможно только в узком диапазоне рН буферного раствора 7 – 8. рН 7.4 оптимален с точки зрения энантиоселективности

и формы получаемых пиков. Авторами подобраны условия для рутинного анализа пантопразола натрия.

БСА и ЧСА использовали в качестве селекторов для разделения энантиомеров прометазина и D,L- $\alpha$ -амино- $\beta$ -[4-(1,2-дигидро-2-оксо-хинолин)]-пропионовой кислоты (АОХ) [103]. Для оптимизации условий разделения варьировали условия предварительной обработки капилляра, тип электролита, pH фонового электролита, органический модификатор, хиральный селектор. Разделение энантиомеров прометазина до базовой линии достигнуто только при наличии БСА (50 мкМ) в фоновом электролите, который представлял собой 50 мМ фосфатный буферный раствор pH 7.6, в этих условиях БСА отрицательно заряжен. Разделение энантиомеров АОХ достигнуто с 50 мкМ ЧСА в фоновом электролите - 50 мМ фосфатном буферном растворе (pH 7.4). Также для разделения энантиомеров АОХ в тех же условиях можно использовать капилляр, предварительно покрытый ЧСА.

*Tingting Hong* и др. [104] разработали два способа иммобилизации БСА на монолитную колонку для аффинной капиллярной электрохроматографии. В качестве связывающих реагентов использовали 3-глицидопропилтриметоксисилан и 3-аминопропилтриметоксисилан. Хроматографические свойства полученных колонок изучены на примере триптофана. Разделение энантиомеров тестового соединения возможно на колонках с использованием в качестве связывающих реагентов как 3-глицидопропилтриметоксисилана, так и 3-аминопропилтриметоксисилана, однако наибольшее разрешение достигнуто на колонке с 3-глицидопропилтриметоксисиланом.

Разнообразие примеров использования БСА в качестве хирального селектора можно дополнить примером синтеза хирального сорбента на основе магнитных наночастиц.

*Yan Fu* и др. [105] исследовали энантиоселективное разделение хиральных лекарственных средств на функциональных магнитных наночастицах с использованием в качестве хирального селектора БСА. Бычий сывороточный альбумин закрепляли на поверхности магнитных наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и изучали его свойства в качестве нового сорбента с хиральными свойствами для разделения энантиомеров хиральных лекарственных средств. Для получения Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

кристаллогидраты  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  растворяли в растворе  $\text{HCl}$  с последующей обработкой ультразвуком. Затем смесь нагревали с добавлением раствора аммиака, после чего полученные наночастицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  охлаждали до комнатной температуры и промывали деионизованной водой. Далее наночастицы диспергировали буфером, к которому добавляли раствор БСА при интенсивном перемешивании. Было установлено, что иммобилизованные молекулы БСА на магнитных наночастицах сохраняют свою стереоселективность при связывании ибупрофена при pH 7.0 и офлоксацина при pH 9.0. При использовании магнитных наночастиц с несколькими слоями БСА наблюдали улучшение разделения энантиомеров ибупрофена и офлоксацина.

Таким образом, бычий сывороточный альбумин в качестве хирального селектора достаточно широко используется в методе ВЭЖХ и смежных с ним методах. Энантиоселективность сорбентов с БСА зависит от многих факторов, главными из которых являются: физические свойства матрицы, длина спейсера и метод пришивки белка. Основными способами пришивки БСА на матрицу являются физическая адсорбция белка или его ковалентная пришивка, при этом связывание с поверхностью матрицы происходит за счет амино- или карбоксильных групп белка. В качестве матрицы чаще всего используют предварительно дериватизированный силикагель, возможно использование агарозы, полимерной, ионообменной матриц, наночастиц. В качестве сшивающих агентов используют глутаровый альдегид, формальдегид, ди-(N-сукцинимидил)-карбонат.

На ХНФ с БСА в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ возможно разделение большого количества веществ различных классов, среди которых профены, аминокислоты, всевозможные производные аминокислот, барбитураты, инденоиндолы, бензодиазепины. Сводные данные по разделению веществ на сорбентах с БСА представлены в табл. 4.

**Таблица 4.** Условия разделения энантиомеров веществ на сорбентах с БСА.

Вещество	Подвижная фаза	Ссылка
Триптофан	ББ (0.1 М, рН 9.2), затем уксусная кислота (0.1 М)	[60]
	ФБ (50 мМ, рН 6.5; 7; 7.4)	[71, 86, 90, 97]
	ФБ (50 мМ, рН 7.6 и 6) /1-пропанол, 96/4, 98/2	[78]
	ФБ (50 мМ, рН 7.7) / 2-пропанол (метанол или ацетонитрил), 98/2	[79]
5-Гидрокситриптофан	ББ (50 мМ, рН 8)	[71]
Ароил-производные аминокислот	ФБ (50 мМ, рН 7) или ФБ (50 мМ, рН 7)/1-пропанол, 95/5	[72,73]
Варфарин	ФБ (50 мМ, рН 6; 7; 7.6)/1-пропанол, 98/2, 96/4	[78, 86]
	ФБ (0.2 М, рН 7.5)/трифторуксусная кислота (0 – 5 мМ)/1-пропанол, 97/3	[84]
	ФБ (0.2 М, рН 7.5)/цикламовая кислота (0 – 7 мМ)/1-пропанол, 97/3	[84]
	ФБ (50 мМ, рН 6.7)/ацетонитрил/1-пропанол, 93/5/2	[90]
Бензоин	ФБ (50 мМ, рН 6 – 8) /1-пропанол, 98/2	[77, 78, 84, 86]
	ФБ (0.2 М, рН 7.5)/трифторуксусная кислота (5 мМ)/1-пропанол, 98/2	[84]
	ФБ (0.2 М, рН 7.5)/цикламовая кислота (7 мМ)/1-пропанол, 98/2	[84]
	ФБ (50 мМ, рН 6.7)/ацетонитрил/1-пропанол, 84/15/1	[90]
Оксазепам	ФБ (50 мМ, рН 7)/1-пропанол, 98/2, 96/4	[78, 86]
	ФБ (50 мМ, рН 7.1)/2-пропанол, 93/7	[79]
Лоразепам	ФБ (50 мМ, рН 7.1)/2-пропанол, 93/7	[79]
	ФБ (10 мМ, рН 6.5)/трифторуксусная кислота (0.5 – 3 мМ)/1-пропанол, 99/1	[84]
Лорметазепам	ФБ (50 мМ, рН 7.1)/2-пропанол, 93/7	[79]
Лопиразепам	ФБ (50 мМ, рН 7.1)/2-пропанол, 93/7	[79]
Омепразол	ФБ (50 мМ, рН 5.8)/1-пропанол, 98/2	[78]
Кинуренин	ББ (50 мМ, рН 8)	[71]
	ФБ (50 мМ, рН 6, 7.1 – 8)/1-пропанол, 100/0, 98/2, 96/4	[75, 78]
3-Гидроксикинуренин	ФБ (0.2 М, рН 7) или ББ (0.05 М, рН 8) или ТРИС-НСl буфер (0.2 М, рН 9)	[71]

Продолжение табл. 4.		
ДНФ-производные аминокислот (серин, аланин, метионин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, фенилглицин, фенилаланин, тирозин)	ФБ (25 – 100 мМ, рН 5.8 – 7.4)/1-пропанол, 99/1, 96/4	[74]
ДНФ-аспарагиновая кислота	ФБ (50 мМ, рН 7.6, 7.7)/1-пропанол, 97/3	[77, 78]
Дансил-производные аминокислот (серин, треонин, метионин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, аланин, фенилаланин)	ФБ (25 – 100 мМ, рН 5.8 – 7.4)/1-пропанол, 99/1, 96/4	[74]
Дансил-треонин	ФБ (50 мМ, рН 7.4) ацетонитрил/1-пропанол, 89/10/1	[90]
Дансил-(аланин, метионин, валин, лизин, фенилаланин, цистеин, глутамин, аспарагиновая кислота, серин, аспарагин, изолейцин, лейцин, пролин, триптофан)	ФБ (25 мМ, рН 7)/2-пропанол, 95/5	[100]
Барбитураты	ФБ (50 мМ, рН 5.8 – 8.6)/1-пропанол, 94/6	[75]
Миндальная кислота	ФБ (50 мМ, рН 5.6, 6.8)	[78,94]
Ибупрофен	ФБ (50 мМ, рН 8,0)/ октановая кислота (1 – 5 мМ)/1-пропанол, 97/3	[78, 83]
Кетопрофен	ФБ (50 мМ, рН 8.0)/ октановая кислота (0 – 4 мМ)/1-пропанол, 90/10	[76, 83]
	ФБ (50 мМ, рН 7.4) /ацетонитрил/1-пропанол, 88/10/2	[90]
Фенопрофен	ФБ (50 мМ, рН 7.4) /ацетонитрил/1-пропанол, 81/15/4	[90]
Морфолеп	ФБ (25 – 100 мМ, рН 4.9 – 8.1)/1-пропанол (0 – 4 об. %)	[76, 78]
Альбендазол сульфоксид и структурные аналоги	ФБ (50 мМ, рН 7.7)/2-пропанол, 98/2	[79]
Метаквалон	ФБ (50 мМ, рН 7.7)/2-пропанол (метанол или ацетонитрил), 98/2	[79]
	ФБ (25 – 100 мМ, рН 6.5 – 8.1)/1-пропанол (0 – 4 об. %)	[76]
Бензотиадиазины	ФБ (25 – 100 мМ, рН 6.5 – 8.1)/1-пропанол (0 – 4 об. %)	[76]
$\alpha$ -Арил и арилокси- кислоты (ибупрофен, напроксен, индопрофен, карпрофен, пирпрофен, беноксапрофен, 2-фенилпропионовая, 2-(4-нитрофенил)-пропионовая кислоты, ее амид, ее 2-хлорэтиловый эфир, 2-фенилбутановая, 2-(4-хлорофеноксид)-пропионовая кислоты)	ФБ (20 мМ, рН 8)/метанол (0 – 40 об. %)	[80]

Продолжение табл. 4.		
Хлорталидон	ФБ (50 мМ, рН 6.5 – 7.6)/1-пропанол, 98/2, 99/1	[76]
Глютетимид	ФБ (25 – 100 мМ, рН 4.9 – 8.1)/1-пропанол (0 – 4 об. %)	[76]
Баклофен	ФБ (50 мМ, рН 5.8 – 8.2)	[76]
Лактам баклофена	ФБ (50 мМ, рН 5.8 – 8.2)	[76]
Темазепам	ФБ (50 мМ, рН 6.7 – 7.3)/1-пропанол, 98/2	[76]
Аценафтенол	ФБ (25 – 100 мМ, рН 6.5 – 8.1)/1-пропанол (1 – 4 об. %)	[76]
$\alpha$ -N-(N'-карбазолкарбонил)-производные аминокислот (аланина, норвалина, норлейцина)	ФБ (20 мМ, рН 8)/метанол (0 – 40 об. %)	[8080]
$\alpha$ -N-(N'-карбазолкарбонил)-производные аминокислот (серин, аланин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, метионин, треонин, валин, лейцин, фенилаланин, тирозин, аспарагин, глутамин, норвалин, норлейцин, гистидин, триптофан, аргинин, лизин)	ФБ (10 – 50 мМ, рН 6.0 – 8.5)/(метанол, 1-пропанол, ацетонитрил) (4 – 50 об. %)	[81]
FMOC-производные АК (серин, аланин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лейцин, валин, фенилаланин)	ФБ (50 мМ, рН 7.5 – 8.3)/(метанол 30 об.% или 1-пропанол 10 – 20 об. %)	[81]
N-ацетил-триптофан, N-бензоил-фенилглицин, бензонал, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, их ДНФ-производные, фталимидо-аланин, фталимидо-треонин, оксазепам, политиазид, ибупрофен, кетопрофен	ФБ (50 мМ, рН 6.0, 7.8)/1-пропанол, 96/4	[82]
N-ацетил-триптофан, N-бензоил-фенилглицин, бензонал, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, их ДНФ-производные, фталимидо-аланин, фталимидо-треонин	ФБ (50 мМ, рН 6.0, 7.8)/1-пропанол, 96/4	[82]
	ФБ (50 мМ, рН 6.0, 7.8)/гексановая (октановая) кислота (0.75 мМ)/1-пропанол, 96/4	[82]
Бензонал, аспарагиновая и глутаминовая кислоты	ФБ (50 мМ, рН 6.0, 7.8)/гексановая (октановая или декановая) кислота (0.75 мМ)/1-пропанол, 96/4	[8282]
ДНФ-метионин	ФБ (50 мМ, рН 6) /ацетонитрил/1-пропанол, 88/10/2	[90]
ДНФ-глутаминовая кислота	ФБ (50 мМ, рН 8) /ацетонитрил/1-пропанол, 97/2/1	[90]
	ФБ (50 мМ, рН 6.0, 7.8)/гексановая (октановая или декановая) кислота (0.75 мМ)/1-пропанол, 96/4	[82]

Продолжение табл. 4.		
ДНФ-аспарагиновая кислота	ФБ (50 мМ, рН 6.0, 7.8)/гексановая (октановая или декановая) кислота (0.75 мМ)/1-пропанол, 96/4	[82]
N-ацетил-триптофан, бензонал, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, их ДНФ-производные, фталимидо-аланин, фталимидо-треонин, оксазепам, политиазид	ФБ (50 мМ, рН 6.5, 8)/1-пропанол, 97/3	[82]
	ФБ (50 мМ, рН 6.5, 8)/гексановая (октановая или декановая) кислота (0.75 мМ)/1-пропанол, 97/3	[82]
Бензоил-аланин	ФБ (50 мМ, рН 6.8)	[93]
	ФБ (50 мМ, рН 6.5)/1-пропанол, 99/1, 95/5	[77, 84]
	ФБ (50 мМ, рН 7)/2-пропанол (0 – 10 об. %)	[92]
	ФБ (50 мМ, рН 6.5)/цикламовая кислота (7 мМ)/1-пропанол, 99/1	[84]
	ФБ (50 мМ, рН 6.5)/трифторуксусная кислота (5 мМ)/1-пропанол, 99/1	[84]
Бензоил-серин	ФБ (50 мМ, рН 6.5)/1-пропанол, 95/5	[77]
Бензоил-фенилаланин	ФБ (50 мМ, рН 6.5)/1-пропанол, 99/1, 95/5	[77, 84]
	ФБ (50 мМ, рН 7)/2-пропанол (0 – 10 об. %)	[92]
	ФБ (50 мМ, рН 6.5)/трифторуксусная кислота (5 мМ)/1-пропанол, 99/1	[84]
	ФБ (50 мМ, рН 6.5)/цикламовая кислота (7 мМ)/1-пропанол, 99/1	[84]
Бензоил-лейцин	ФБ (50 мМ, рН 7)/2-пропанол (0 – 10 об. %)	[92]
Бензоил-изолейцин	ФБ (50 мМ, рН 7)/2-пропанол (0 – 10 об. %)	[92]
Бензоил-метионин	ФБ (50 мМ, рН 7)/2-пропанол (0 – 10 об. %)	[92]
Бензоил-валин	ФБ (50 мМ, рН 7)/2-пропанол (0 – 10 об. %)	[92]
Бензоил-треонин	ФБ (50 мМ, рН 7)/2-пропанол (0 – 10 об. %)	[92]
N-циклогексанкарбонил-фенилаланин	ФБ (50 мМ, рН 7)/2-пропанол (0 – 10 об. %)	[92]
N-циклогексанкарбонил-аланин	ФБ (50 мМ, рН 7)/2-пропанол (0 – 10 об. %)	[92]
Лейковорин	ФБ (0.2 М, рН 5)	[84]
	ФБ (0.2 М, рН 5)/трифторуксусная кислота (5 мМ)	[84]
	ФБ (0.2 М, рН 5)/цикламовая кислота (7 мМ)	[84]
N-ацетил-триптофан	ФБ (50 мМ, рН 6)	[82]
Этиловый эфир N-ацетил-триптофана	ФБ (50 мМ, рН 6)	[82]
N-(4-нитробензоил)-серин	ФБ (50 мМ, рН 6)	[82]

Продолжение табл. 4		
Инденоиндолы (Н290/51, Н290/30, Н266/86, Н301/20, Н325/10, Н294/43)	ФБ (20 – 100 мМ, рН 7) или цитратный (рН 5, 5.8) буфер/ацетонитрил или 2-пропанол (10 – 20 об. %)	[99]
$\alpha$ -Метилфенил- ацетонитрил	ФБ (50 мМ, рН 7.4) /ацетонитрил/ 1-пропанол, 88/10/2	[90]
$\alpha$ -Этилфенил-ацетонитрил	ФБ (50 мМ, рН 7.4) /ацетонитрил/ 1-пропанол, 88/10/2	[90]
$\alpha$ -Пропилфенил-ацетонитрил	ФБ (50 мМ, рН 7.4) /ацетонитрил/ 1-пропанол, 88/10/2	[90]
$\alpha$ -Бутилфенил-ацетонитрил	ФБ (50 мМ, рН 7.4) /ацетонитрил/ 1-пропанол, 88/10/2	[90]
Атропин	ФБ (50 мМ, рН 7.4) /ацетонитрил/ 1-пропанол, 88/10/2	[90]

ФБ – фосфатный буферный раствор

ББ – боратный буферный раствор

### Глава 3. Смешанные хиральные неподвижные фазы

Появление все большего количества хиральных сорбентов с селекторами различной природы, позволяющих разделять энантиомеры оптически активных веществ, заставляет задуматься о поиске универсального сорбента, который можно использовать для энантиоразделения большинства классов оптических соединений. На сегодняшний день шагом к решению этой задачи стало появление, так называемых, смешанных хиральных неподвижных фаз. Основное отличие таких фаз от обычной ХНФ заключается в том, что такая фаза содержит не один, а сразу несколько селекторов.

#### 3.1. Смешанные хиральные неподвижные фазы в газовой хроматографии

Большинство хиральных неподвижных фаз для газовой хроматографии в качестве хирального селектора содержат производные  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -ЦД). Авторы работы [106] синтезировали стационарные фазы для газовой хроматографии, содержащие перметилированный  $\beta$ -ЦД (колонка А), перпентилированный (колонка Б)  $\beta$ -ЦД и бинарную фазу, содержащую их смесь (колонка АБ). Производные  $\beta$ -ЦД наносили на кварцевые капиллярные колонки в растворе OV-1701 в качестве растворителя в соотношении 1 : 4 для колонок А и Б и в соотношении перметилированный  $\beta$ -ЦД : перпентилированный  $\beta$ -ЦД : OV-1701 1 : 1 : 4 для смешанной фазы. На полученных таким образом колонках было проведено разделение энантиомеров таких веществ, как инданол, валин, аланин, дигидрокарвил ацетат. Валин, аланин определяли после их дериватизации с

использованием трифторуксусного ангидрида и изопропилового спирта. Коэффициенты селективности для всех исследованных оптически активных веществ на колонке АБ со смешанной фазой больше, чем коэффициенты, полученные на колонках А и Б. Так, например, коэффициент селективности для энантиомеров валина на смешанной стационарной фазе составил 1.04, тогда как на колонках с одним из производных  $\beta$ -циклодекстрина коэффициенты равны 1.02. Коэффициент селективности дигидрокарвил ацетата на смешанной фазе 1.05, на колонках А и Б он равен 1.02 и 1.00 соответственно. Эти данные указывают на улучшение энантиораспознавания некоторых соединений на смешанной фазе по сравнению с фазами только с одним производным  $\beta$ -ЦД.

Как правило, на смешанных фазах наблюдается усредненный эффект от соответствующих фаз с индивидуальными компонентами, однако в данном исследовании авторы наблюдали синергетический эффект. Причины этого могут заключаться в стерическом совпадении конформации молекул растворенного вещества и полостей производных циклодекстрина, а также наличием взаимодействий различных типов (дисперсионные, диполь-дипольные,  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия, образование водородных связей).

Авторы работы [107] в качестве хиральных селекторов помимо перметилированного  $\beta$ -циклодекстрина (ПМБЦД), также использовали *гептакис*(2,6-ди-*O*-бутил-3-*O*-бутирил)- $\beta$ -циклодекстрин (ДБББЦД) и *гептакис*(2,6-ди-*O*-нонил-3-*O*-трифторацетил)- $\beta$ -циклодекстрин (ДНТБЦД) и синтезировали стационарные фазы:

- колонка А: 15 % ПМБЦД + 85 % OV-1701
- колонка Б: 50 % ДБББЦД + 50 % OV-1701
- колонка В: 50 % ДНТБЦД + 50 % SE-54
- колонка АБ: 15 % ПМБЦД + 50 % ДБББЦД + 35 % OV-1701
- колонка АВ: 15 % ПМБЦД + 50 % ДНТБЦД + 35 % OV-1701.

На полученных колонках разделяли оптические изомеры пиретроидных инсектицидов, которые являются синтетическими аналогами природных пиретринов. Тестовые соединения имеют два хиральных атома углерода в циклопропановом кольце (в частности, метиловый эфир хризантемовой кислоты (1), L-метиловый эфир хризантемовой кислоты (2), метиловый эфир перметрина

(3), метиловый (4) и этиловый (5) эфиры 3-(2,2,2-трихлорэтил)-2,2-диметилциклопропановой кислоты). При изучении энантиоразделения данных веществ авторы наблюдали синергетический эффект для фаз с двумя селекторами по сравнению с фазами с одним производным. Так, например, коэффициенты разрешения для (4) и (5) на колонках АБ и АВ выше, чем на колонках А, Б, В. Такой же эффект наблюдали и для *транс*-(3) на колонке АБ. Однако, для большинства тестовых рацематов полученные значения коэффициентов разрешения на колонке АБ были между значениями, полученными на колонках А и Б. Одним из достоинств колонки АБ стала возможность одновременного разделения диастереомеров и энантиомеров метилового эфира хризантемовой кислоты, тогда как на колонках А, Б с одним селектором это невозможно. По аналогии, диастереомеры и энантиомеры метилового эфира перметрина не могут быть разделены на колонках А, Б, В, но делятся с хорошим разрешением на смешанных колонках АБ и АВ.

Возможности *гептакис*(2,6-ди-*O*-метил-3-*O*-пентил)- $\beta$ -циклодекстрина и *октакис*(2,6-ди-*O*-метил-3-*O*-трифторацетил)- $\beta$ -циклодекстрина как хиральных селекторов в газовой хроматографии оценены в работе [108]. Синтезированная фаза Chiramix позволила разделить энантиомеры компонентов персикового масла, а также смесь монотерпенов, спиртов, кетонов и лактонов лучше, чем фазы, содержащие только один из селекторов, при их одновременном присутствии.

В работе [109] для синтеза смешанной стационарной фазы использовали *гептакис*(2,3-ди-*O*-метил-6-*O*-*трет*-бутилдиметилсилил)- $\beta$ -циклодекстрин и *гептакис*(2,3-ди-*O*-ацетил-6-*O*-*трет*-бутилдиметилсилил)- $\beta$ -циклодекстрин, отличающиеся полярностью и, соответственно, энантиоразделяющими способностями. На такой фазе делили энантиомеры веществ, входящих в состав эфирных масел лаванды, апельсина, неролиевого масла, в частности лимонена, линалоола, его оксидов, линалилацетата, (*E*)-неролидола,  $\alpha$ - и  $\beta$ -пиненов, терпинен-4-ола,  $\alpha$ -терпенола. Синтезированная фаза позволила разделить энантиомеры всех тестируемых соединений при их одновременном присутствии в анализируемой смеси.

В работе [110] синтезирован бинарный жидкокристаллический сорбент на основе 4-метокси-4-этокси-азобензола и ацетилированного  $\beta$ -циклодекстрина.

Массовая доля макроциклического *гептакис*(2,3,6-три-*O*-ацетил)- $\beta$ -циклодекстрина составляла 10.25 %. Установлено, что макроциклическая добавка индуцирует образование спирально закрученной хиральной нематической фазы. На синтезированной фазе изучена сорбция 29 органических соединений разных классов (*n*-алканы, циклоалканы, арены, спирты, гетероциклы), среди них камфен, лимонен, бутандиол-2,3 оптически активны. Энантиоселективной по отношению к оптически активным веществам данная стационарная фаза является только в узком диапазоне температур 91 – 100 °С из-за затруднения образования комплекса макроцикл – сорбат в силу закрученности спирали нематической фазы.

Еще одна бинарная стационарная фаза для газовой хроматографии синтезирована в работе [111], содержащая в себе перметилированный циклодекстрин и D- или L-валин. При метилировании  $\beta$ -ЦД в 6 положении защищали с помощью фторида тетрабутиламмония в растворе тетрагидрофурана, далее оставшиеся ОН-группы в 6 положении окисляли до –СООН. Валин ковалентно прививали в виде D- или L-валин-*трет*-бутиламида в 6 положение перметилированного  $\beta$ -ЦД посредством образования пептидной связи, далее полученные производные циклодекстрина растворяли в полисилоксане OV11 (35 % фенил- и 65 % метилсилоксана) и покрывали кварцевую капиллярную колонку. Способность к энантиораспознаванию синтезированной фазы оценивали путем ее сравнения с фазами, содержащими только перметилированный циклодекстрин (ПМ- $\beta$ -ЦД) и только L-валин-*трет*-бутиламид Chirasil-L-Val. Исследование фаз провели на 117 оптически активных соединений разных классов, поделенных на три группы. К первой группе относятся протеиногенные производные аминокислот, энантиомеры которых хорошо делятся на фазе Chirasil-L-Val, это N-трифторацетил-этиловые и изопропиловые эфиры аминокислот. Ко второй группе относятся вещества с различными функциональными группами (ароматические соединения, спирты, сложные эфиры), энантиомеры которых делятся на ПМ- $\beta$ -ЦД. К третьей группе относятся 14 соединений, энантиомеры которых до этого не делили на фазах, содержащих только один из селекторов.

Стоит отметить, что исходная фаза ПМ- $\beta$ -ЦД позволяет разделить энантиомеры 79 из 117 исследуемых соединений, тогда как Chirasil-L-Val только 50. При этом наиболее универсальной является смешанная фаза с S-валином,

которая позволяет разделить энантиомеры 89 соединений, в том числе 2 соединения из группы 3, энантиомеры которых не делятся на исходных фазах, на фазе с *R*-валином поделены энантиомеры 76 соединений. Среди двух синтезированных смешанных фаз поведение фазы с *S*-валином наиболее похоже на поведение фазы Chirasil-L-Val. Для того чтобы еще больше увеличить количество разделяемых соединений на смешанной фазе, необходимо прививать валин к ЦД через спейсер, чтобы избежать попадания его в полости макроцикла и, тем самым, увеличить его доступность.

В качестве компонентов бинарной фазы в работе [112] использовали *октакис-О*-[(L-валин-третбутиламид)-N-ацетил]-С-деценил-резорцинарен и *монокис-О*-октенил-перметил-β-циклодекстрин. Перметилированный β-циклодекстрин является селектором благодаря образованию комплексов включения, а производное резорцинарена – образованию водородных связей. Оба селектора пришиты на поли(гидроксиметил)диметилсилоксан с помощью Pt-катализируемой реакции гидроксиллирования алкенов в одном сосуде. Полученная таким образом смешанная фаза названа Chirasil-Calixval-Dex. На фазе Chirasil-Calixval-Dex, а также на фазах Chirasil-Calixval и Chirasil-Dex, содержащих только один из селекторов, проводили энантиоразделение таких классов веществ, как N-трифторацетил-этиловые эфиры аминокислот. Стоит отметить, что фаза Chirasil-Dex позволяет разделить производные только аланина, цистеина, серина, пролина, фенилаланина с приемлемыми коэффициентами разрешения, в то время как Chirasil-Calixval позволяет разделять энантиомеры N-трифторацетил-этиловые эфиры почти всех аминокислот, но не способна к энантиораспознаванию веществ, не образующих водородные связи. При использовании смешанной фазы авторы получили результаты, которые позволяют судить об аддитивном эффекте от каждого селектора, однако при этом наблюдается незначительное уменьшение коэффициентов разрешения в силу меньшей, по сравнению с индивидуальными селекторами, концентрацией каждого из селекторов в смешанной фазе.

Этот же коллектив авторов в более поздней работе [113] более подробно исследовали такой же сорбент, но в отличие от предыдущей работы, синтезировали стационарную фазу не только с производным резорцинарена с L-валином, но и с D-изомером. Свойства смешанного хирального селектора не изменились. В этом же

году один из авторов предыдущей работы с коллегами публикует исследование [114], в котором синтезирована схожая смешанная фаза с перметилированным β-ЦД и N-ацил-L-валинамидом, однако пришивка последнего осуществляется к макроциклу через длинный углеводородный спейсер C<sub>11</sub>, а не на резорцинарен. Синтезированная фаза названа Chirasil-DexVal-C<sub>11</sub>. В работе синтезированы и стационарные фазы, содержащие отдельные хиральные селекторы Chirasil-Val и Chirasil-Dex. Смешанная фаза обладает энантиоселективностью к производным аминокислот, как и Chirasil-Val, и к недериватизированным спиртам, кетонам, углеводородам, как и Chirasil-Dex. Также такая фаза значительно улучшает энантиораспознавание пролина, разделение энантиомеров которого затруднено на диамидных хиральных неподвижных фазах.

### **3.2. Смешанные хиральные неподвижные фазы в жидкостной хроматографии**

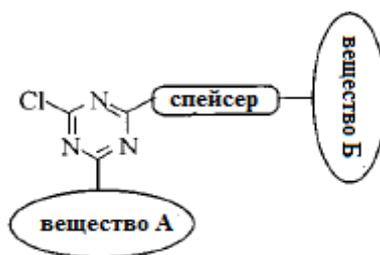
Смешанную хиральную неподвижную фазу для ВЭЖХ в 1987 году одними из первых синтезировали *Hyun* и *Pirkle* [116], в составе низкомолекулярного смешанного селектора были как π-основные (1-(6,7-диметил)нафтил-), так π-кислотные сайты (N-3,5-динитробензоил-) производных додециламина. В качестве тестовых соединений использовали N-3,5-динитробензоил-производные аминов и аминокислот. Коэффициент селективности разделения энантиомеров увеличивается с увеличением количества атомов в гомологическом ряду исследуемых соединений. Наличие жесткого каркаса в структуре молекулы анализатора может либо усилить, либо уменьшить степень хирального распознавания, в зависимости от того, какая конформация является более предпочтительной.

Немного позже в [117] синтезирована еще одна смешанная хиральная фаза для ВЭЖХ, содержащая те же π-кислотный и π-основной участки, что и в предыдущей работе. Отличие состоит в том, что в данном случае π-кислотные и основные сайты вводились как производные тирозина. Исследователи отмечают, что такая хиральная фаза позволяет разделять энантиомеры как органических кислот, так и оснований, причем сайты, отвечающие за энантиораспознавание этих веществ, не мешают друг другу.

Авторы [118] синтезировали и исследовали бинарную хиральную фазу для ВЭЖХ на основе аминопропилсиликагеля. В качестве селекторов использовали (S)-1-(α-нафтил)-этиламин, связанный с (S)-фенилаланином или (S)-N-(3,5-

динитробензоил)-фенилаланином, поэтому смешанная фаза содержала и  $\pi$ -донорную, и  $\pi$ -акцепторную составляющие. В работе исследованы неподвижные фазы, в которых в одном случае к силикагелю пришиты оба селектора, а в другом проводили предварительное сшивание двух селекторов и на силикагель прививали только через один из них. Кроме того получена смешанная фаза, в которой механически смешаны сорбенты с двумя селекторами в соотношении 1 : 1. В качестве анализов использовали различные хиральные соединения с ароматическими фрагментами в их структуре. Полученные результаты позволили авторам сделать вывод о том, что наиболее удачной смешанной ХНФ оказалась фаза, полученная механическим смешиванием двух сорбентов. Два различных хиральных асимметричных центра в той же фазе могут, в зависимости от их конфигурации, приводить к уменьшению селективности энантиоразделения. Авторы ставят под сомнение достоверность предложенных ранее моделей распознавания.

Позднее учеными из Италии [119 – 121] синтезированы бинарные ХНФ с использованием в качестве селекторов производных аминокислот, сшитых с помощью S-триазина. Общая схема структуры таких биселекторов представлена на рис. 11. Селектор 1 представляет собой вещество А и триазин, селектор 2 – вещество Б.



**Рис. 11.** Общая схема структуры биселектора [121].

Все синтезированные фазы протестированы на примере целого ряда оптически активных соединений, среди которых производные бинафтола, алкиларилкарбинолы, бензамиды, ацетамиды, анилиды.

В работе [119] использовали оптически активные 1-(1-нафтил)этиламин (НЭЭ), (S)-N-3,5-динитробензоилфенилглицин (ДБФГ), (S)-N-3,5-динитробензоиллейцин (ДБЛ), ковалентно пришитые к силикагелю с помощью остатка S-триазина в различном сочетании из R- и S-изомеров. Синтезированы четыре неподвижные фазы с двумя селекторами:

- 1 – (S)-НЭЭ; (S)-ДБЛ
- 2 - (R)-НЭЭ; (S)-ДБЛ
- 3 - (S)-НЭЭ; (S)-ДБФГ
- 4 - (R)-НЭЭ; (S)-ДБФГ

Проведено сравнение энантиоразделяющей способности каждой из них на примере ряда оптически активных веществ, среди которых 3,5-динитрофенил-производные 1-арилпропионовых кислот, (алкил-арил)-метиламины, 3,5-динитробензоил-производные (алкил-арил)-метиламинов, 3,5-динитроанилид ибупрофена. С точки зрения эффективности и универсальности для разделения энантиомеров кислотного характера лучшей оказалась фаза 1. Авторы предположили, что конформация и, следовательно, энантиоразделяющие способности бинарной ХНФ сильно зависят от «удаленности хиральности» в молекулах селекторов.

В более поздней работе [120] те же авторы синтезировали хиральную неподвижную фазу с двумя селекторами, в качестве которых использовали производные аминокислот N-3,5-динитробензоил-лейцин и N-1-нафтоилфенилглицин, сшитых с помощью остатка S-триазина.

В целом, положительные результаты по энантиоразделению рацематов как  $\pi$ -донорных, так и  $\pi$ -акцепторных ароматических соединений во всех работах данных авторов позволяют говорить о том, что данная система выступает в роли истинного биселектора с полной независимостью действий каждого из них, благодаря присутствию S-триазина, связывающего селекторы между собой.

В 1994 г *Anne-Fraçoise Aubry* с соавт. [115] синтезировали смешанную хиральную неподвижную фазу для ВЭЖХ на основе белков. В качестве хиральных селекторов использовали сывороточный альбумин человека и  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин (орозомукоид). Выбор этих белков обусловлен тем, что при разделении оптических изомеров они дополняют друг друга: ЧСА используют для соединений кислотного характера, АГП – для основного характера. Предварительно синтезировали сорбенты с каждым из белков по отдельности. Синтез проводили путем циклической промывки колонки с силикагелем, активированным 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом, растворами белков в фосфатном буферном растворе (50 мМ, рН 7.5) в течение 24 часов. Далее

полученные таким образом сорбенты смешали в эквивалентных количествах и заполнили смесью хроматографическую колонку (ЧСА-АГП-ХНФ). Содержание ЧСА в смешанной фазе составило 80 мг/г SiO<sub>2</sub>, АГП – 100 мг/г SiO<sub>2</sub>. В качестве тестовых оптически активных соединений использовали соединения разных классов, среди которых: темазепам, оксазепам, окспренолол, пропранолол, супрофен, кетопрофен, дизопирамид, прометазин, гексобарбитал, пентобарбитал, бензоин, варфарин, кеторолак, верапамил, мефлохин, анаприлин.

Разделение энантиомеров проводили на трех колонках: со смешанной ХНФ и с каждым из белков по отдельности. Наилучшие результаты разделения достигаются, если разделение проводят в условиях, когда в энантиораспознавании участвует только один из белков. Разделение оптически активных аналитов на смешанном сорбенте происходит, если их энантиораспознавание возможно хотя бы на одном из белков смешанной фазы, тем самым число разделяемых соединений на смешанной фазе представляет собой «сумму» соединений, разделение которых возможно на каждом из белков, входящих в его состав по отдельности. На смешанной фазе из исследованных соединений не были разделены только энантиомеры гексобарбитала, хотя его энантиораспознавание возможно на колонке с каждым из протеинов по отдельности. Также среди веществ, разделение энантиомеров которых возможно отдельно на каждом протеине (гексобарбитал, пентобарбитал), наблюдали меньшее удерживание на смешанном сорбенте, чем ожидалось. Это можно объяснить тем, что вовлечение сразу двух белков в энантиораспознавание приводит к тому, что увеличивается количество как хиральных, так и нехиральных взаимодействий, в результате чего суммарная энантиоселективность фазы снижается.

Еще одним классом хиральных селекторов, использованных для синтеза смешанных ХНФ в ВЭЖХ, стали полисахариды, в частности, производные целлюлозы и амилозы. В работе [122] использовали для синтеза *n*- и *m*-метилбензоилцеллюлозу, 3,5-диметилфенилкарбамоилцеллюлозу. Производные прививали на силикагель, предварительно модифицированный 3-аминопропилтриэтоксисиланом. Авторы использовали два способа получения смешанной фазы: одновременная прививка двух производных целлюлозы и механическое смешивание сорбентов, содержащих каждое из производных по

отдельности. В качестве подвижной фазы использовали смесь гексана и изопропанола в объемном соотношении 90 : 10. В качестве тестовых соединений были взяты 28 ароматических веществ, структуры которых представлены на рис. 12.

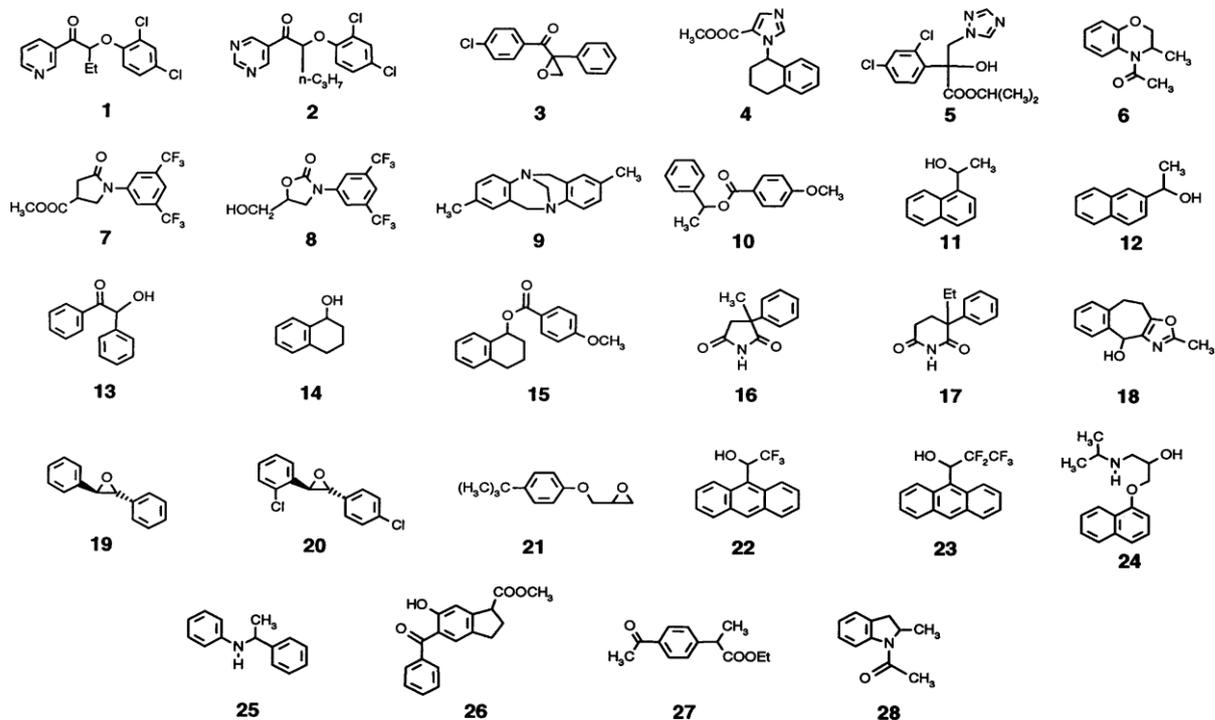


Рис. 12. Структуры анализируемых рацематов работы [122].

Авторы отмечают, что полученные значения коэффициентов селективности практически не зависят от способа получения смешанной фазы, однако для колонки с механически смешанными сорбентами характерно небольшое уменьшение удерживания веществ, что почти не сказывается на энантиораспознавании. Небольшое снижение селективности бинарной фазы для веществ, разделение энантиомеров которых возможно только на одном из производных, по сравнению с фазами только с одним производным целлюлозы объясняется уменьшением его концентрации на сорбенте за счет наличия другого производного. Варьируя соотношения селекторов на сорбенте, можно добиться желаемых значений селективности исследуемых аналитов.

Совместное применение в ВЭЖХ нашли и (фенилкарбамат)-целлюлоза и (4-метилбензоат)-целлюлоза в работе [123]. Причем *трис*-(фенилкарбамат)-целлюлозу и *трис*-(4-метилбензоат)-целлюлозу наносили на силикагель путем физической адсорбции, а 2,3-*бис*-(фенилкарбамат)-целлюлозу и 2,3-*бис*-(4-

метилбензоат)-целлюлозу путем ковалентной сшивки. В качестве аналитов использовали: оксид *транс*-стильбена, бензоин, празиквантел, бендрофлуметиазид, основание Трегера, варфарин, N-2,4-ДНФ-глутаминовая кислота. Показано, что сорбенты и с «покрытыми», и с «привитыми» производными целлюлозы обладают энантиоселективностью каждого из хиральных компонентов сорбента, итоговая энантиоселективность бинарного сорбента является чем-то средним между энантиоселективностями каждого из его компонентов. В зависимости от способа синтеза бинарных сорбентов на их поверхности образуются разные «хиральные полости», что приводит к тому, что сорбенты с одними и теми же хиральными селекторами, но полученными разными способами, имеют разную способность к энантиораспознаванию некоторых тестовых соединений.

Производные амилозы *трис*-фенилкарбамат и *трис*-бензоат в качестве селекторов неподвижной фазы использовали в [124]. Соотношение производных на аминированном силикагеле составляло 1 : 1. В качестве аналитов использовали 35 соединений ароматической структуры, среди которых талидомид, (2-циано-этил)-4-нитробензол, 4-(2-аминоэтил)-метокситолуол. Установлено, что разделение энантиомеров различных веществ на смешанном сорбенте лучше по сравнению с сорбентами, содержащими только один селектор.

В работе [125], для получения смешанной хиральной фазы использовали производные целлюлозы: *трис*-(4-метилфенилкарбамат)-целлюлозу (ЦМФК), *трис*-(фенилкарбамат)-целлюлозу (ЦФК), *трис*-(4-хлорфенилкарбамат)-целлюлозу (ЦХФК); в качестве производных амилозы: *трис*-(3,5-диметилфенилкарбамат)-амилозу (АДМФК). Синтезированы 4 ХНФ с каждым из производных, привитых на 3-аминопропилсиликагель (ХНФ **1** – **4** соответственно) и 3 смешанные фазы, содержащие производное амилозы и одно из производных целлюлозы в соотношении 1:1, привитых на 3-аминопропилсиликагель (ЦМФК-АДМФК (**5**), ЦФК-АДМФК (**6**), ЦХФК-АДМФК (**7**)). В качестве тестовых соединений взяли 33 оптически активных вещества разных классов, наиболее часто используемых для тестирования сорбентов с полисахаридами. Оказалось, что смешанная ХНФ **5** обладает энантиоселективностью, схожей с ХНФ **1**, но лучше, чем у фазы **4**. ХНФ **6** похожа на фазу **4**, но лучше, чем фаза **2**. В целом, смешанные фазы обладают хорошей способностью к энантиораспознаванию. Однако, в силу одновременного

действия двух селекторов или в силу изменений в супрамолекулярной структуре смешанных ХНФ, большинство значений коэффициентов разрешения, полученных на биселекторных фазах, находятся между значениями коэффициентов разрешения, полученных на сорбентах с каждым из производных. Кроме того, фазу с производными ЦХФК и АДМФК (7) можно использовать при элюировании энантиомеров смесью н-гексан/этанол, 70/30, тогда как добавка этанола в подвижную фазу при использовании сорбента, содержащего только ЦХФК (3), невозможна. Более того, разделение оптических изомеров на ХНФ 5 возможно при элюировании 100 % этанолом. В целом, синтезированные фазы с биселекторами перспективны для практического применения.

Таким образом, смешанные стационарные фазы для разделения энантиомеров веществ достаточно широко применяются как в жидкостной, так и в газовой хроматографии. В качестве хиральных селекторов в газовой хроматографии чаще всего выступают производные  $\beta$ -циклодекстрина, в жидкостной хроматографии селекторами могут быть белки, производные полисахаридов, производные аминокислот. Стоит отметить, что в литературных данных по методу ВЭЖХ не найдено данных о смешанных хиральных неподвижных фазах на основе антибиотиков, а также фазах с двумя селекторами различных классов веществ, сильно отличающихся по структуре и свойствам. В частности, нет ни одной бинарной ХНФ с белком и антибиотиком при одновременном присутствии.

Как правило, смешанные стационарные фазы проявляют среднюю способность к энантиораспознаванию по сравнению с фазами с одним исходным селектором, но выявлены случаи и увеличения суммарной энантиоразделяющей способности. Основным достоинством смешанных хиральных фаз является расширение круга разделяемых соединений, тем самым унифицирование такой фазы.

\*\*\*

Анализ литературных данных показал, что на силикагеле, модифицированном эремомицином, возможно успешное разделение энантиомеров аминокислот и их дансильных производных, производных  $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот и профенов в двух вариантах хроматографии – обращенно-фазовом и полярно-органическом. На наш взгляд, необходимо исследование энантиоселективности эремомицина к более широкому кругу веществ, особенно используемых в фармацевтике. Интересно, что эремомицин дополняет возможности близкого по структуре ванкомицина, одного из наиболее известных хиральных селекторов из группы макроциклических антибиотиков. Основным способом закрепления антибиотиков на поверхности сорбента является химическая пришивка, причем, наиболее часто антибиотик пришивают к эпокси-активированному силикагелю. Все это позволяет предположить возможность создания смешанного хирального сорбента с двумя антибиотиками, что пока не описано в литературе.

Бычий сывороточный альбумин в качестве хирального селектора достаточно широко используется в методе ВЭЖХ и смежных с ним методах. Энантиоселективность сорбентов с БСА зависит от многих факторов, главными из которых являются: физические свойства матрицы, длина спейсера и метод пришивки белка. На хиральных фазах с БСА исследовано разделение широкого круга энантиомеров, в их числе вещества, к которым проявляет энантиоселективность эремомицин. Основными способами пришивки БСА на матрицу являются физическая адсорбция белка или его ковалентная пришивка, при этом связывание с поверхностью матрицы происходит за счет амино- или карбоксильных групп белка. В зависимости от способа синтеза получают то или иное расположение молекулы белка на поверхности сорбента, что сильно сказывается на хиральных свойствах сорбента.

Важным направлением в практике хроматографического разделения энантиомеров веществ является синтез новых хиральных сорбентов, позволяющих более эффективно и с высокой чувствительностью разделять энантиомеры все большего числа веществ. Это необходимо еще и потому, что число лекарственных препаратов, в которых в качестве действующего вещества выступает только один

из изомеров, постоянно растет, что влечет за собой жесткий контроль качества таких препаратов на наличие второго изомера. Поэтому также важна разработка методик контроля энантиомерной чистоты новых препаратов на уже хорошо зарекомендовавших себя сорбентах. Прием человеком таких препаратов может повлечь за собой необходимость контроля концентрации препарата в биологических жидкостях человека.

Для синтеза хиральных сорбентов важно выбрать недорогие стабильные селекторы, позволяющие подобрать условия разделения изомеров большого числа веществ. С нашей точки зрения, такими селекторами могут быть макроциклические антибиотики близкой структуры – эремомицин и ванкомицин, а также белок бычий сывороточный альбумин. Необходимы исследования возможности сочетания нескольких селекторов на сорбенте для изучения особенностей энантиораспознавания на них веществ различных классов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 4. Исходные вещества, аппаратура, методики эксперимента, техника эксперимента

#### 4.1. Исходные вещества

В качестве хиральных селекторов в работе использовали: эремомицина гидрохлорид, предоставленный д.х.н. Староверовым С.М. (ЗАО «БиоХимМак СТ», Москва, Россия); ванкомицина гидрохлорид – лиофильно высушенный аптечный препарат производства ОАО «Красфарма» (Красноярск, Россия); бычий сывороточный альбумин (>99.0%) («Диаэм», Москва, Россия).

Для синтеза сорбентов в работе использовали следующие реагенты:

3-глицидооксипропилтриметоксисилан (98 %), 1,4-бутандиол диглицидиловый эфир (>95 %, оба реактива «SigmaAldrich», США), ацетата натрия тригидрат («Химмед», Россия), уксусная кислота конц. (ос.ч.) («Реахим», Россия), гидроксид калия (х.ч.) («Химмед», Россия), глутаровый альдегид, тетрагидроборат натрия («Реахим», Россия), этиловый спирт (х.ч.), ацетон (ч.д.а.) («Реахим», Россия), МПТМС, (95 %, «Acros Organics», США). -  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (х.ч., “Merck”, Германия),  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5.5\text{H}_2\text{O}$ , (ос.ч., “Merck”, Германия), МПК (х.ч.), азотная кислота, конц. (ос.ч.), соляная кислота, конц. (ос.ч.), толуол (х.ч.).

Реактивы, для которых не указано отдельно, производства фирмы «SigmaAldrich» (США).

Фосфатный, боратный, ацетатный, ацетат триэтиламина буферные растворы готовили, как указано в работе [126]. Для приготовления буферных растворов использовали точные навески твердых и жидких препаратов дигидрофосфата калия, дигидрофосфата аммония, тригидрата гидрофосфата калия («Panreac», Испания), фосфорной кислоты (85 %), буры, гидроксида калия, уксусной кислоты («Реахим», Россия), триэтиламин (99 %, «Acros Organics», США). В работе использовали ацетонитрил, метанол, изопропанол («для хроматографии», «Panreac», Испания), диэтиламин, трибутиламин (99 %, «Acros Organics», США).

Для определения количественного содержания белка использовали: медь (II) серноокислая пятиводная (ч.д.а.) («Химмед», Россия), натрий-калий виннокислый,

гидроксид натрия (х.ч.), йодид калия (х.ч.), цитрат натрия (ч.д.а.), карбонат натрия («Реахим», Россия).

В качестве матриц для синтеза сорбентов использовали силикагель Kromasil 100-5-Sil (сферический, размер частиц 5 мкм, площадь поверхности 300 м<sup>2</sup>/г, размер пор 100 Å, «Ekachemicals», Швеция), аминированный силикагель Диасфер-110-амин (сферический, размер частиц 5 мкм, размер пор 110 Å, ЗАО «БиоХимМак СТ», Россия).

В качестве коммерческих колонок для разделения изомеров фармпрепаратов использовали: Nautilus-E (250×4 мм, ЗАО «БиоХимМак СТ», Россия), диаметр зерна сорбента - 5 мкм, Chirobiotic TAG (250 × 4.6 мм, Supelco, Sigma-Aldrich, США), диаметр зерна сорбента - 5 мкм.

В работе использовали стандартные образцы и фармацевтические субстанции: гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутаминат (предоставлен Чернобровкиным М.Г.), левалбутерол, альбутерол, пеметрексед, (1*RS*)-2-[[[(1*RS*)-2-(4-гидроксифенил)-1-метил-этил]амино]-1-(3,5-дигидроксифенил)этанол] гидробромида (фенотерола гидробромид) (предоставлены Заикиным П.Г.), L-энантиомер пеметрекседа (Ph. Eur. Reference Standard), (8-(4-((4-хлоробензил)окси)фенил)-3-(2,4-диметоксифенил)-6-оксо-2,3,4,6,7,8-гексагидропиридо[2,1-*b*][1,3,5]тиадиазен-9-карбонитрил (далее пиридоптиадазин, предоставлен кафедрой органической химии химического факультета МГУ), исходные растворы которых (0.1–1 мг/мл) готовили растворением точных навесок в ацетонитриле, метаноле, изопропаноле или воде.

Исходные растворы (0.2–1 мг/мл) пиндолола, метопролола, окспренолола, атенолола, альпренолола, надолола, лабетолола, кетопрофена, фенпрофена, ибупрофена, флурбипрофена, индопрофена готовили растворением точных навесок в ацетонитриле или метаноле. Растворы миндальной кислоты, α-метоксифенилпропионовой кислоты, 2-фенилпропионовой кислоты, бензоина («Sigma-Aldrich», США) готовили растворением точных навесок в воде или в смеси воды и ацетонитрила.

Исходные растворы аминокислот и производных аминокислот фирмы Sigma Aldrich (США) (0.5–1 мг/мл): метионина, треонина, триптофана, варфарина, фенилаланина, дегидроксифенилаланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой

кислоты, ацетилглутаминовой кислоты, фенилглицина, бензоил-аланина, бензоил-валина, бензоил-метионина, бензоил-фенилаланина, бензоил-аргинина, КБЗ-валина, КБЗ-аланина, КБЗ-фенилаланина, КБЗ-метионина, КБЗ-лейцина, КБЗ-норлейцина, КБЗ-аспарагиновой кислоты, КБЗ-аспарагина, КБЗ-триптофана, БОК-валина, БОК-триптофана, БОК-аланина, БОК-серина готовили растворением точных навесок в воде или в смеси воды и ацетонитрила.

#### 4.2. Аппаратура

В работе использовали жидкостной хроматограф LC-20 Prominence («Shimadzu», Япония) с диодно-матричным детектором SPD-M20A («Shimadzu», Япония). Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LC Solution фирмы «Shimadzu». Скорость подачи элюента составляла 0.5-1.5 мл/мин, объем петли дозатора составлял 20 мкл, ввод пробы осуществляли шприцом объемом 50 мкл.

Перед использованием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой ванне «Сапфир 6580» (рабочая частота 35 кГц, мощность 60 Вт, НПФ «Сапфир», Россия) в течение 10 мин для снижения колебаний фонового сигнала и обеспечения нормальной работы насоса. рН водных растворов измеряли на рН-метре «рН-410» («Аквилон», Россия).

Синтезированными сорбентами заполняли стальные колонки размером 100×4.6 мм и 150×4.6 мм при помощи насоса «Кнауер К-1900» под давлением 200-300 бар суспензионным способом. Для этого навеску сорбента (1.2 г) вносили в 20 мл растворителя (изопропанол : вода, 1:1) и гомогенизировали полученную суспензию в ультразвуковой ванне в течение 15 мин. Затем проводили заполнение колонки.

Элементный анализ образцов проводили на анализаторе Elementar Vario Micro CUBE («Elementar», Германия).

Спектрофотометрическое определение проводили на двухлучевом сканирующем спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония).

Для получения микрофотографий сорбентов использовали сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM-6390LA (ускоряющее напряжение 20 кВ, «JEOL», Япония). Морфологию образцов определяли в режиме вторичных электронов SEI. Для элементного микроанализа поверхности образцов

использовали энергодисперсионную систему EX-54 175 JMH («JEOL», Япония). Автор выражает благодарность к.х.н. Савилу С.В. (кафедра физической химии Химического факультета МГУ) и с.н.с. В.В. Апяри за помощь в проведении микроскопических исследований.

Регистрацию спектров диффузного отражения синтезированных сорбентов осуществляли на CS-9001PC Dual-Wavelength Flying Spot Scanner («Shimadzu», Япония).

Измерение площади поверхности и пористости методом низкотемпературной адсорбции азота проводили на приборе для измерения сорбции газов NOVA 4200e («Quantachrome», США).

Рентгенофлуоресцентный анализ с полным внешним отражением проводили на энергодисперсионном РФА ПВО спектрометре S2 PICOFOX («Bruker GmbH», Германия). В качестве внутреннего стандарта использовали галлий. Автор выражает благодарность к.ф.-м.н., в.н.с Н.В. Алову и аспиранту П.Ю. Шаранову за помощь в проведении исследований методом РФА ПВО.

### 4.3. Методики эксперимента

**Методика 1. Синтез силикагеля, модифицированного 3-глицидоксипропилтриэтоксисиланом (сорбент эпокси-силикагель).**

К 5 г силикагеля Kromasil добавили 100 мл 0.1 М раствора ацетата натрия, доведенного уксусной кислотой до pH 5.5. К полученной суспензии добавили 7.8 мл 3-глицидоксипропилтриэтоксисилана. Реакционную смесь интенсивно перемешивали на качалке в течение 2 часов, затем оставили без перемешивания на 4 суток. По окончании реакции сорбент промыли водой, этанолом, ацетоном, отфильтровали. Сушили при температуре 100 °С в течение 2 часов. Данные элементного анализа в %: С 7.0, О 4.7, Н 1.4.

**Методика 2. Имобилизация эремомицина на силикагель, модифицированный 3-глицидоксипропилтриэтоксисиланом (сорбент силикагель/эремомицин).**

К 3 г силикагеля, модифицированного 3-глицидоксипропилтриэтоксисиланом, добавили раствор 1 г эремомицина в 15 мл боратного буферного раствора pH 8.5. Реакционную смесь нагревали при температуре 40 °С в течение 2 часов, затем оставляли без нагревания на неделю,

периодически перемешивая. После окончания реакции сорбент отфильтровали, промыли водой, метанолом, ацетоном. Сушили на воздухе в течение 24 часов. Данные элементного анализа в %: С 13.4, О 9.6, N 1.3, H 2.2.

**Методика 3. Синтез смешанного хирального сорбента на основе силикагеля, модифицированного эремомицином и БСА (сорбент силикагель/эремомицин-БСА).**

Раствор 0.2 г БСА в 25 мл раствора ацетата натрия, доведенного до pH 5.6 уксусной кислотой, добавили к 2 г силикагеля с иммобилизованным эремомицином. Полученную реакцию смесь выдерживали при комнатной температуре, подвергая периодической ультразвуковой обработке (суммарное время обработки составило 4 часа), в течение двух дней. После окончания реакции сорбент отфильтровали и отмыли водой. Затем его суспендировали в раствор глутарового альдегида (1.5 мл 25 % глутарового альдегида в 25 мл ацетатного буферного раствора с pH 5.6). Полученную реакцию смесь выдерживали при комнатной температуре, периодически перемешивая, в течение одного дня. После окончания реакции сорбент отфильтровали и отмыли водой, добавили к нему раствор 0.16 г  $\text{NaBH}_4$  в 25 мл дистиллированной воды. Полученную реакцию смесь выдерживали при комнатной температуре, периодически перемешивая, в течение одного дня. После окончания реакции сорбент отфильтровали и отмыли водой, этанолом. Сушили на воздухе в течение 24 часов. Данные элементного анализа в %: С 16.1, О 11.3, N 1.5, H 2.8.

**Методика 4. Синтез смешанного хирального сорбента на основе силикагеля, модифицированного эремомицином и ванкомицином (сорбент силикагель/эремомицин-ванкомицин).**

0.2 г эремомицина и 0.2 г ванкомицина растворили в 20 мл дистиллированной воды, довели pH до 8.5, прибавляя по каплям раствор 1 М КОН. Полученный раствор добавили к 1.5 г силикагеля, модифицированного 3-глицидоксипропилтриэтоксисиланом. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов, затем оставляли, периодически перемешивая, на неделю. После окончания реакции сорбент отфильтровали, промыли водой, метанолом, ацетоном. Сушили на воздухе в течение 20 часов. Данные элементного анализа в %: С 12.2, О 8.8, N 1.0, H 2.0.

**Методика 5. Модифицирование аминированного силикагеля 1,4-бутандиол диглицидиловым эфиром.**

В круглодонную колбу на 100 мл помещали 1.5 г аминированного силикагеля, добавляли 1.5 мл 1,4-БДДГЭ и 50 мл дистиллированной воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут при температуре 60° С. Полученный сорбент отфильтровали, промыли водой и высушили на воздухе.

**Методика 6. Синтез смешанного хирального сорбента на основе аминированного силикагеля, модифицированного эремомицином и ванкомицином (сорбент аминосиликагель/эремомицин-ванкомицин).**

0.2 г эремомицина и 0.2 г ванкомицина растворили в 20 мл дистиллированной воды, довели рН до 8.5, прибавляя по каплям раствор 1 М КОН. Полученный раствор добавили к 1.5 г аминосиликагеля, модифицированного 1,4-БДДГЭ. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов, затем оставляли без нагревания, периодически перемешивая, на неделю. После окончания реакции сорбент отфильтровали, промыли водой, метанолом, ацетоном. Сушили на воздухе в течение 24 часов.

**Методика 7. Синтез хирального сорбента на основе силикагеля, модифицированного БСА.**

1 г БСА добавили к 15 мл раствора дигидрофосфата аммония с концентрацией 100 мМ, рН 4.6. Раствор поместили в ультразвуковую ванну на 3 минуты до полного растворения белка. К раствору БСА маленькими порциями добавили 2 г силикагеля, поместили в ультразвуковую ванну на 10 минут. Реакционную смесь перемешивали в течение суток при комнатной температуре. Затем к суспензии добавили 125 мкл 5 % раствора глутарового альдегида, перемешивали в течение 2 часов. Сорбент отцентрифугировали, удалили маточный раствор, затем 2 раза промыли раствором дигидрофосфата аммония (100 мМ, рН 4.6). К промытому сорбенту добавили 20 мл раствора дигидрофосфата аммония и 300 мкл 5 % раствора глутарового альдегида. Суспензию выдержали 1 час при постоянном перемешивании при 40 °С, затем оставили при комнатной температуре на ночь, постоянно перемешивая. Сорбент отфильтровали, промыли фосфатным буферным раствором (50 мМ, рН 7), затем 40 % раствором изопропанола в этом же буферном растворе. Сушили на воздухе в течение 24 часов.

### **Методика 8. Биуретовый метод количественного определения белка.**

Метод основан на способности белков давать с раствором сернокислой меди фиолетовое окрашивание в щелочной среде [127]. Чувствительность данного метода позволяет определять белок в диапазоне от 2 до 10 мг в пробе.

Готовили стандартный раствор БСА в воде с концентрацией 10 мг/мл. Для этого навеску 1 г БСА поместили в мерную колбу на 100 мл, растворили в воде и довели объем раствора до метки водой.

Для приготовления биуретового реактива 0.15 г сульфата меди пятиводного  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и 0.6 г натрия-калия виннокислого  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  растворили в 50 мл воды, затем при перемешивании прилили 30 мл 10 % раствора  $\text{NaOH}$ , затем добавили 0.1 г  $\text{KI}$ .

Для построения градуировочного графика из стандартного раствора БСА путем разбавления водой готовили растворы с концентрацией белка 2; 4; 6; 8; 10 мг/мл. В каждую пробирку, содержащую 1 мл раствора БСА соответствующей концентрации, добавляли 4 мл биуретового реактива, перемешивали и оставляли на 30 мин.

Измеряли оптическую плотность градуировочных растворов при 540 нм в кювете толщиной 1 см. Строили градуировочный график. Количество белка в анализируемом растворе определяли по градуировочному графику.

### **Методика 9. Количественное определение белка методом Бенедикта.**

Метод аналогичен биуретовому методу, но позволяет определять белок в растворе в диапазоне от 0.1 до 2 мг в пробе [127].

Готовили стандартный раствор БСА в воде с концентрацией 2 мг/мл. Для этого навеску 200 мг БСА поместили в мерную колбу на 100 мл, растворили в воде и довели объем раствора до метки водой.

Для приготовления реактива Бенедикта 17.3 г цитрата натрия и 10 г карбоната натрия растворили при нагревании в 40 мл воды. В раствор добавили 1.73 г сульфата меди, растворенного в 10 мл воды. Объем раствора довели водой до 100 мл.

Для построения градуировочного графика из стандартного раствора БСА путем разбавления водой готовили растворы с концентрацией белка 0.2; 0.6; 1; 1.4; 2 мг/мл. В каждую пробирку, содержащую 1 мл раствора БСА соответствующей

концентрации, добавляли 3 мл 3 % раствора NaOH и 0.2 мл реактива Бенедикта, перемешивали и оставляли на 15 мин.

Измеряли оптическую плотность градуировочных растворов при 330 нм в кювете толщиной 1 см. Строили градуировочный график. Количество белка в анализируемом растворе определяли по градуировочному графику.

**Методика 10. Количественное определение белка спектрофотометрическим методом.**

Метод основан на способности ароматических кислот в составе белка поглощать в УФ-свет при 280 нм.

Готовили стандартный раствор БСА в воде с концентрацией 1 мг/мл. Для этого навеску 100 мг БСА поместили в мерную колбу на 100 мл, растворили в воде и довели объем раствора до метки водой.

Измеряли оптическую плотность раствора белка в кварцевой кювете толщиной 1 см при 260 и 280 нм. Содержание белка находили по формуле Калькара [127]:

$$c_{\text{БСА}} (\text{мг/мл}) = 1.45 \cdot A_{280} - 0.74 \cdot A_{260}$$

**Методика 11. Приготовление искусственных растворов профена в моче.**

Приготовление искусственных растворов кетопрофена и фенопрофена в биологической жидкости осуществляли добавлением в мочу человека 0.05; 0.1; 0.2; 0.5; 1; 2.5 мг профена с последующей фильтрацией полученного образца через мембранный пористый фильтр с диаметром пор 0.22 мкм.

**Методика 12. Синтез наночастиц золота (10 нм).<sup>1</sup>**

Перед каждой стадией синтеза посуду для проведения эксперимента тщательно мыли царской водкой (1/3 HNO<sub>3</sub> конц / HCl конц.) и затем ополаскивали дистиллированной водой. Такая операция позволяет избежать агрегации наночастиц золота. В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, помещали раствор 75 мг HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O в 250 мл дистиллированной воды и доводили раствор до кипения. Быстро добавляли 26.0 мл 1 % раствора цитрата натрия и кипятили в течение одного часа. При кипении наблюдали изменение цвета раствора со светло-желтого (раствор золотохлористоводородной кислоты) на

<sup>1</sup> Автор выражает благодарность д.х.н. Мажуге А.Г., к.х.н. Рудаковской П.Г. (кафедра органической химии Химического факультета МГУ) за помощь в проведении синтезов, связанных с наночастицами золота.

вишневый через темные (серые и черные) тона. Раствор охлаждали до комнатной температуры. Полученный раствор наночастиц золота хранили в холодильнике при температуре около 4 °С, в таких условиях раствор сохранялся длительное время.

**Методика 13. Модифицирование силикагеля 3-меркаптопропилтри-метоксисиланом.**

Навеску силикагеля 3 г суспендировали в 300 мл свежеперегнанного толуола в трехгорлой колбе объемом 300 мл, доводили суспензию до кипения, добавляли 3.0 мл МПТМС и кипятили в течение 4 ч в атмосфере аргона. Затем модифицированный силикагель отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре в атмосфере аргона. Данные элементного анализа в %: С 3.2, Н 1.0, S 1.0.

**Методика 14. Модифицирование тиолированного силикагеля наночастицами золота (10 нм), стабилизированными цитрат-ионами.**

Полученный по методике 13 тиолированный силикагель (около 2.1 г) суспендировали в 150 мл раствора свежеприготовленных наночастиц золота при тщательном перемешивании на механической верхнеприводной мешалке при комнатной температуре в инертной атмосфере. Смесь перемешивали в течение 24 ч, фильтровали на стеклянном пористом фильтре. Вещество на фильтре промывали последовательно водой и этиловым спиртом и оставляли сохнуть при 50 °С на 24 ч. Данные элементного анализа в %: С 3.7, Н 1.1, S 1.1.

**Методика 15. Модификация наночастиц золота на силикагеле 3-меркаптопропионовой кислотой (МПК).**

Полученный по методике 14 силикагель суспендировали в 100 мл воды и добавляли 5.0 мл МПК при интенсивном перемешивании. Перемешивание продолжали в течение часа. Полученный раствор фильтровали, вещество на фильтре промывали последовательно водой и этиловым спиртом, высушивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Данные элементного анализа в %: С 3.8, Н 1.1, S 2.4.

**Методика 16. Имобилизация эремомицина на модифицированный наночастицами золота (10 нм) тиолированный силикагель (сорбент  $\text{SiO}_2\text{-S-Au-S-C(O)-NH-эремомицин}$ ).**

К полученному по методике 15 силикагелю при интенсивном перемешивании добавляли 100 мг растворенного в воде эремомицина, трехкратный избыток (35 мг на данное количество антибиотика)  $\text{N,N'}$ -дициклогексилкарбодиимида и каталитические количества 4-(диметиламино)пиридина. Полученный раствор перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре, отделяли фиолетовый осадок фильтрованием на воронке Бюхнера со стеклянным фильтрующим дном и промывали водой, а затем этанолом. Силикагель высушивали в течение 24 ч и хранили в сухом бюксе на воздухе. Данные элементного анализа в %: С 7.3, Н 1.4, S 2.5, N 0.8.

#### **4.4. Техника эксперимента**

##### **Определение хроматографических параметров разделения**

Новую хроматографическую колонку после заполнения промывали соответствующим растворителем в течение 5 часов со скоростью 0.5 мл/мин.

Непосредственно перед проведением экспериментов колонку кондиционировали подвижной фазой в течение 20 - 30 минут до формирования стабильной базовой линии.

Аликвотную часть (20 мкл) растворов исследуемых соединений вводили в колонку при помощи петлевого дозатора (инжектора). Скорость подачи элюента составляла 0.5 – 1.5 мл/мин.

Из полученных хроматограмм определяли времена удерживания неудерживаемых (мертвое время) и удерживаемых компонентов, а также ширину пиков у основания и на половине высоты. Хроматографические параметры: исправленное время удерживания ( $t'_r$ ), фактор удерживания ( $k'$ ), коэффициент селективности ( $\alpha$ ), разрешение пиков ( $R_s$ ), число теоретических тарелок ( $N$ ) рассчитывали по формулам:

$$t'_r = t_r - t_m$$

$$k = \frac{t'_r}{t_m}$$

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2}$$

$$N = 5.55 \left( \frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$

где  $t_m$  - мертвое время;

$t_{r1}, t_{r2}$  – времена удерживания компонентов;

$w_1, w_2$  - значение ширины пика у основания;

$w_{1/2}$  – значение ширины пика на половине высоты.

Время удерживания неудерживаемых компонентов ("мертвое время") определяли по системному пику на полученных хроматограммах.

Для проверки правильности результатов проводили определение методом добавок в тех же условиях. Для этого получали хроматограммы раствора препарата без добавок и с добавками.

Для расчёта содержания использовали следующую формулу:

$$C_x = \frac{y_x \times V_{доб} \times C_{доб}}{y_{x+доб} \times V_{доб} + (y_{x+доб} - y_x) \times V}$$

где  $C_x$  – неизвестная концентрация определяемого компонента,  $y_x, y_{x+доб}$  – аналитические сигналы пробы анализируемого образца и образца с добавкой,  $V_{доб}$  – объём добавленного раствора определяемого компонента,  $C_{доб}$  – концентрация добавленного раствора определяемого компонента,  $V$  – аликвота анализируемой пробы.

Порядок выхода L- и D-изомеров, там, где было возможно, определяли, вводя в хроматографическую колонку индивидуальные изомеры оптически активных веществ.

#### 4.5. Изучение физико-химических свойств синтезированных сорбентов

Для контроля наличия хиральных селекторов на синтезированных сорбентах и оценки некоторых свойств сорбентов в работе использовали различные физико-химические методы анализа:

## Элементный анализ

Для определения содержания селекторов на поверхности сорбентов был проведен элементный анализ полученных в работе сорбентов. В табл. 5 представлено среднее содержание углерода, водорода, азота и кислорода для двух параллельно синтезированных сорбентов каждого типа.

**Таблица 5.** Данные элементного анализа синтезированных сорбентов.

Элемент	Ед. измерения	Сорбент			
		Эпокси-силикагель	Силикагель/эремомицин	Силикагель/эремомицин-БСА	Силикагель/эремомицин-ванкомицин
N	% масс.	–	1.28	1.45	1.01
C		6.95	13.40	16.14	12.21
H		1.42	2.22	2.78	2.04
O		4.66	9.61	11.26	8.75

Исходя из данных табл. 5, видно, что основным показателем изменения структуры сорбента от более простой к сорбенту с более сложной структурой является наличие атомов азота. Так, отсутствие азота в эпокси-активированном силикагеле, с дальнейшим увеличением его в сорбенте, содержащем эремомицин, и максимальным количеством азота в сорбенте с эремомицином и БСА, свидетельствует о постепенном усложнении структуры сорбента путем прививки сначала антибиотика к эпокси-силикагелю, а затем и прививки к такому сорбенту БСА. Полученное количество атомов углерода соответствует 115 мг эремомицина на 1 г эпокси-силикагеля на сорбенте, модифицированном эремомицином.

Расчет содержания привитого эремомицина проводили, исходя из данных элементного анализа по содержанию углерода, по формуле:

$$E \text{ (мкмоль/г)} = \Delta C / (1.2 \cdot n_C),$$

где  $n_C$  – число атомов углерода в молекуле эремомицина ( $n_C=73$ ),  $\Delta C$  – прирост содержания углерода в сорбенте после стадии прививки эремомицина [27].

Схожие результаты анализа сорбента с эремомицином и смешанного сорбента с эремомицином и ванкомицином (с учетом того, что количество атомов углерода в ванкомицине меньше на 7  $n_C=66$ ) говорят о близких величинах суммарного содержания антибиотика на грамм эпокси-силикагеля.

Модифицирование силикагеля эремомицином по методике 6 оказалось неудачным. Содержание эремомицина на поверхности оказалось столь мало, что с

помощью элементного анализа оценить его надежно не удалось. Эти данные подтвердились в дальнейшем хроматографическом исследовании такого сорбента, который не обладал ярко выраженной энантиоразделяющей способностью.

### Спектрофотометрия

Контроль полноты иммобилизации эремомицина на поверхности силикагеля осуществляли фотометрически по уменьшению оптической плотности реакционной смеси при 280 нм, которая соответствует максимуму поглощения антибиотика в растворе.

Для оценки количества белка, адсорбированного на сорбентах (*методики 3, 7*), также использовали метод спектрофотометрии. В зависимости от концентрации белка в маточном растворе использовали один из способов количественного определения белка (*методика 8 или 9*), а также *методику 10*.

Содержание БСА на смешанном хиральном сорбенте с эремомицином и БСА (*методика 3*) составило 68 мг/г SiO<sub>2</sub>, содержание на силикагеле, модифицированном БСА (*методика 7*), составило 276 мг/г SiO<sub>2</sub>.

Поскольку молекула БСА имеет размер 140\*40 Å [128], поры матрицы сорбента 100 Å, а поверхность силикагеля покрыта эремомицином, то молекулы белка не могут попасть в поры силикагеля и занимают только поверхностное пространство, которое составляет у таких силикагелей 1 % площади поверхности, т.е. 3 м<sup>2</sup>/г или 3\*10<sup>20</sup> Å<sup>2</sup>/г.

Рассчитаем площадь молекулы БСА, которую она занимает на поверхности сорбента, как площадь эллипса  $S=\pi*a*b$ , т.е.  $S_{\text{молекулы БСА}}=3.14*70*20=4396 \text{ \AA}^2$ .

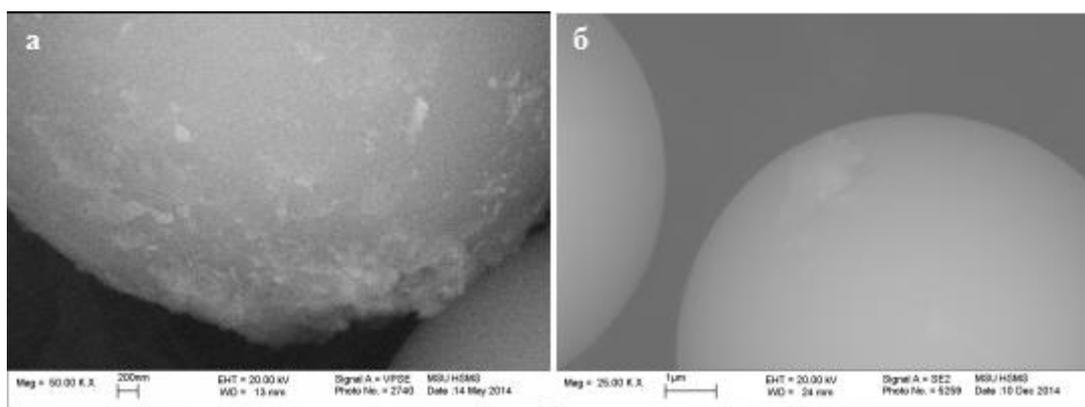
На 1 % поверхности силикагеля сможет поместиться  $N=3*10^{20}/4396=68*10^{15}$  молекул БСА. Количество этих молекул составляет  $n=N/N_a=68*10^{15}/(6*10^{23})=11.3*10^{-8}$  моль. Масса такого количества БСА  $m=n*M=11.3*10^{-8}*66210=7.5*10^{-3}$  г=7.5 мг. Таким образом, на поверхность 1 г силикагеля с диаметром пор 100 Å может поместиться 68\*10<sup>15</sup> молекул БСА или 7.5 мг.

Полученные спектрофотометрические данные о количестве адсорбированного белка на сорбентах в разы превышают теоретическое значение, что дает нам право предполагать, что БСА адсорбируется на поверхности

силикагеля в виде полислоев или агломератов и в случае смешанного сорбента, и в случае сорбента, содержащего только БСА в качестве хирального селектора.

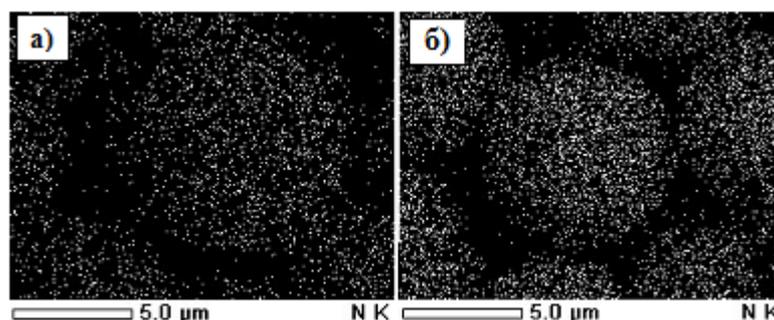
### Сканирующая электронная микроскопия

Наличие молекул белка на поверхности силикагеля в сорбентах, синтезированных по *методикам* 3 и 7, подтверждается и методом сканирующей электронной микроскопии. На микрофотографиях сорбента с эремомицином и БСА (рис. 13, а) и сорбента только с БСА (рис. 13, б) визуально видно присутствие БСА в виде неких агрегатов.



**Рис. 13.** Микрофотографии хиральных сорбентов: а – силикагель/эремомицин – БСА, б – силикагель/БСА.

БСА также можно идентифицировать на сорбенте и по увеличению количества атомов азота на картах распределения образцов. Например, возьмем карты распределения азота для сорбента с эремомицином (*методика* 2) и сорбента с эремомицином и БСА (*методика* 3). На карте распределения азота, соответствующей сорбенту только с эремомицином (рис. 14), значительно меньше атомов азота, нежели на карте сорбента с эремомицином и БСА, что объясняется появлением дополнительных атомов азота из молекул белка, привитых на сорбент.



**Рис. 14.** Карты распределения атомов азота на поверхности сорбентов: а – силикагель/эремомицин, б – силикагель/эремомицин – БСА.

## Метод низкотемпературной адсорбции азота

Оценку параметров поверхности сорбента, модифицированного только эремомицином, и сорбента, модифицированного эремомицином и БСА проводили методом низкотемпературной адсорбции азота, построением соответствующих изотерм сорбции/десорбции азота. Исследование сорбции проводится при температуре кипения жидкого азота в диапазоне давлений от минимально возможного до давления насыщенных паров при данной температуре. Исходя из данных табл. 6, видно, что при переходе от немодифицированного силикагеля к модифицированному происходит уменьшение площади поверхности, что связано с частичным закрыванием пор силикагеля молекулами эремомицина.

**Таблица 6.** Исследование поверхности синтезированных хиральных сорбентов методом низкотемпературной адсорбции азота.

Сорбент	Площадь поверхности, м <sup>2</sup> /г	Объем пор, см <sup>3</sup> /г	Диаметр пор, Å
Силикагель	300	0.90	100
Силикагель/эремомицин	219	0.42	76
Силикагель/эремомицин-БСА	230	0.43	76

Уменьшение объема и диаметра пор в модифицированном силикагеле по сравнению с немодифицированным силикагелем происходит за счет частичного попадания антибиотика в поры силикагеля.

Некоторое увеличение площади поверхности сорбента с эремомицином и БСА по сравнению с сорбентом только с эремомицином происходит за счет образования белком полислоев и различного рода агломератов на поверхности сорбента, а также за счет самого объема молекулы белка. Одинаковые значения объема и размера пор таких сорбентов еще раз подтверждают тот факт, что молекулы белка не попадают в поры сорбента, а адсорбируются только на его поверхности.

## **Рентгенофлуоресцентный анализ с полным внешним отражением**

Применение метода РФА ПВО для исследования поверхности и поверхностных слоев твердого тела основано на измерении угловой зависимости интенсивности рентгеновской флуоресценции вблизи критического угла ПВО. Методом РФА ПВО проводят анализ малых количеств вещества (от мкг до нг) с низкими пределами обнаружения элементов (от мкл/мл до нг/мл и ниже). При проведении такого анализа образец помещается на поверхность подложки-рефлектора в виде тонкого слоя. Пробоподготовка зависит от типа анализируемого образца и его агрегатного состояния [129]. В нашем случае 10 мг сорбента суспендировали в 1 мл воды. В аликвоту суспензии 500 мкл, вносили 5 мкл раствора внутреннего стандарта нитрида галлия с концентрацией 10 мг/л. Смесь наносили на подложку, высушивали и определяли содержание серы методом РФА ПВО. Такой метод анализа использовали для сорбентов, содержащих БСА, поскольку только БСА из всех использованных хиральных селекторов содержит в своей структуре серу.

Исходя из полученных данных по содержанию серы в образцах, количество БСА на поверхности смешанного сорбента силикагель/эремомицин-БСА составляет 36 мг/г, а на сорбенте силикагель/БСА – 286 мг/г.

Полученные результаты для сорбента силикагель/БСА хорошо согласуются с результатами, полученными методом спектрофотометрии, а для сорбента силикагель/эремомицин-БСА результаты РФА ПВО немного ниже результатов, полученных методом спектрофотометрии. Метод РФА ПВО является более селективным по сравнению со спектрофотометрией, поэтому результаты, полученные методом РФА ПВО более достоверны.

## **Спектроскопия диффузного отражения**

В спектроскопии диффузного отражения измеряют количество света, отраженного твердым образцом:

$$R=I/I_0,$$

где: R - коэффициент диффузного отражения,  $I_0$  - интенсивность падающего на образец света, I – интенсивность отраженного света.

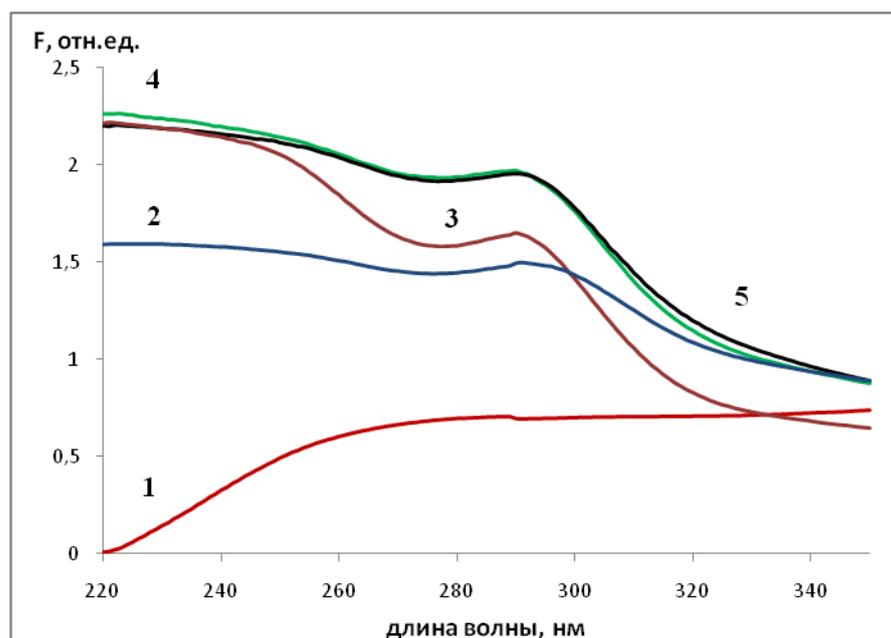
Наиболее общая теория изложена Кубелкой и Мунком [130, 131] и получила дальнейшее развитие в работах профессора Рунова [132, 133].

После упрощений и преобразований уравнение Кубелки-Мунка:

$$F \equiv (1-R)^2/2R = 2,3\varepsilon \cdot C/S,$$

где:  $F$  – функция Кубелки-Мунка,  $R$  – отношение абсолютного диффузного отражения образца в бесконечно толстом, непрозрачном слое к абсолютному диффузному отражению стандарта (чаще  $MgO$ ,  $BaSO_4$ ),  $\varepsilon$  – молярный коэффициент поглощения,  $C$  – концентрация сорбата,  $S$  – коэффициент рассеяния света. Из уравнения следует, что функция Кубелки-Мунка линейно связана с концентрацией сорбата, зависимость  $F=f(\lambda)$  совпадает со спектром его поглощения в растворе. Первое условие выполняется только для толстого слоя мелкодисперсных слабопоглощающих образцов, а второе – при условии, что  $S$  не зависит от длины волны. На диффузное отражение влияние оказывает размер частиц образца и его влажность. С уменьшением размера частиц  $F$  увеличивается из-за уменьшения коэффициента рассеяния света  $S$ , по этой же причине диффузное отражение сухих образцов больше, чем влажных [134].

Из рис. 15 видно, что в отличие от немодифицированного силикагеля, сорбенты с селекторами имеют явно выраженный максимум в районе 280 нм, что является характерным максимумом в спектрах поглощения как эремомицина, так и ванкомицина и БСА. Данный факт подтверждает наличие хиральных селекторов на каждом из синтезированных сорбентов.



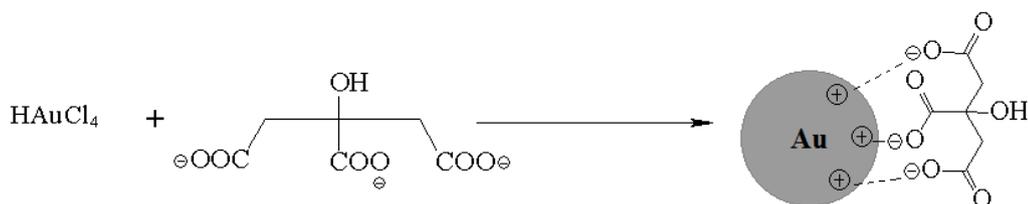
**Рис. 15.** Спектры ДО синтезированных сорбентов: 1 – силикагель, 2 – силикагель/БСА, 3 – силикагель/эремомицин-ванкомицин, 4 – силикагель/эремомицин, 5 – силикагель/эремомицин-БСА.

## Сорбент с наночастицами золота

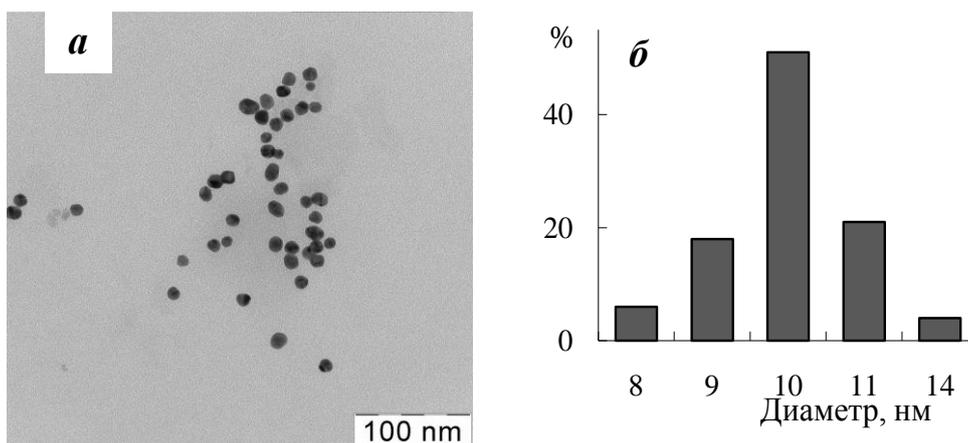
### Синтез наночастиц золота

Для синтеза наночастиц золота использовали метод Туркевича как наиболее простой, не требующий дополнительного оборудования и позволяющий получать моодисперсные наночастицы со средним размером от 10 до 100 нм, варьируя концентрации исходных реагентов. Синтезированы наночастицы золота диаметром 10 нм. Выбор сделан исходя из работы [135], в которой показана целесообразность использования для модифицирования силикагеля частиц именно этого размера за счет их равномерной адсорбции на поверхности силикагеля, невозможность проникновения в поры сорбента, минимальной агрегации на поверхности силикагеля и, следовательно, увеличения эффективности хроматографических колонок на основе такого модифицированного силикагеля.

Частицы размером 10 нм синтезировали стандартным методом Туркевича, используя соотношение  $\text{HAuCl}_4$ /цитрат натрия 1/3.9 (*методика 12*). Цитрат натрия выступает одновременно в качестве восстановителя и стабилизатора образующихся наночастиц по схеме [135]:

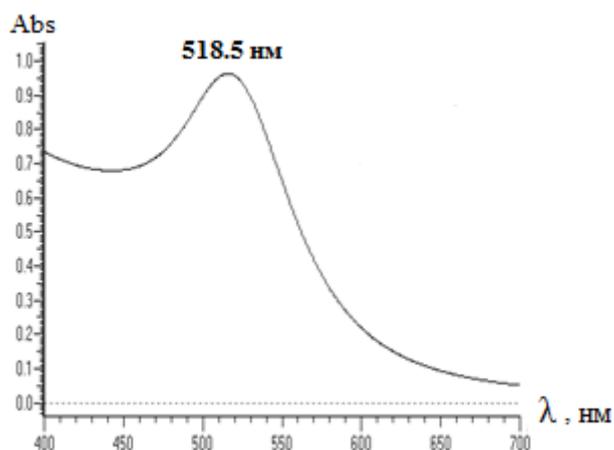


При помощи просвечивающего электронного микроскопа были получены фотографии коллоидных НЧЗ (рис. 16, а), и на их основе построены гистограммы распределения частиц по размерам (рис. 16, б). Из рис. 16, б также видно, что методом Туркевича при использовании заданного соотношения  $\text{HAuCl}_4$ /цитрат образовались сферические однородные по размеру частицы нужного размера: 51 % частиц имеют размер 10 нм.



**Рис. 16.** Фотография (ПЭМ) наночастиц золота размером 10 нм (а), диаграмма распределения НЧЗ по размерам ( $N = 100$ ).

Наличие характерного максимума в районе 520 нм на электронном спектре поглощения НЧЗ подтверждает факт их получения (рис. 17).



**Рис. 17.** Электронный спектр поглощения раствора НЧЗ размером 10 нм.

Таким образом, использованный подход, позволяет синтезировать сферические монодисперсные НЧЗ заданного размера простым, удобным способом из доступных реагентов. При этом наночастицы не агрегируют при хранении в течение месяца при температуре 0 – 4 °С.

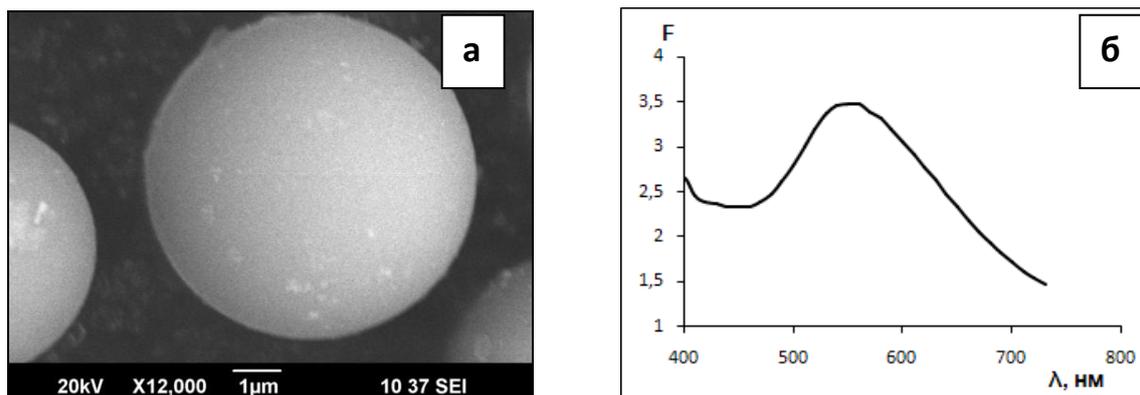
### **Модифицирование силикагеля наночастицами золота**

В целях увеличения количества наночастиц золота на поверхности силикагеля сорбент был предварительно функционализирован 3-меркаптопропилтриметоксисиланом (методика 13). После обработки силаном на поверхность  $\text{SiO}_2$  вводятся SH-группы, которые взаимодействуют с НЧЗ, стабилизированными цитрат-ионами (методика 14), с образованием координационной связи Au-S.

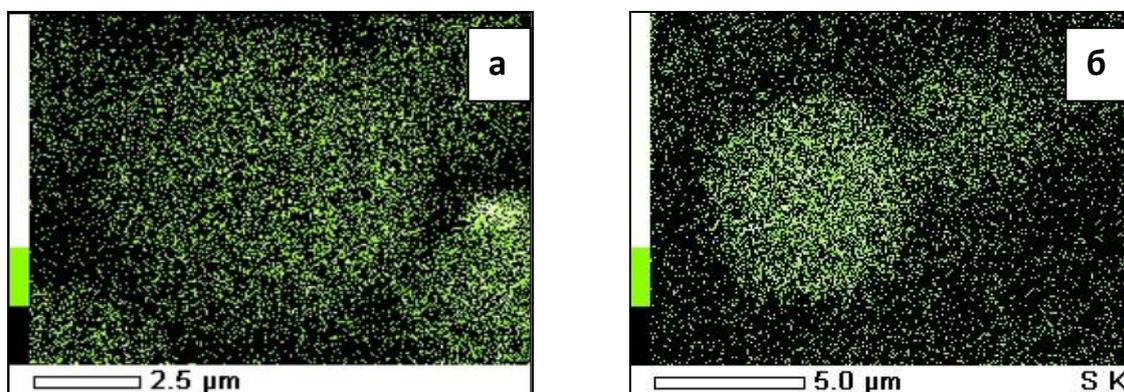
## Иммобилизация антибиотиков на силикагель

Синтез сорбента с эремомицином проводили на основе меркапто-силикагеля и НЧЗ, модифицированных МПК (методика 15). Иммобилизацию антибиотика на сорбент проводили после его активации посредством образования связи между -COOH группой кислоты и -NH<sub>2</sub> и другими полярными группами антибиотика (методика 16).

Микрофотография сорбента SiO<sub>2</sub>-S-Au-S-C(O)-NH-эремомицин приведена на рис. 18, а. Поверхность силикагеля покрыта золотом, при этом имеются небольшое количество золотых агрегатов на поверхности, а также определенное количество золота распределено по объему. В спектре ДО наблюдается явно выраженный интенсивный максимум при 540 нм (рис. 18, б). Эти данные также подтверждаются картами распределения золота по поверхности силикагеля (рис. 19, а). На карте распределения серы (рис. 19, б) также отчетливо видно, что максимальная концентрация серы наблюдается на самих сферах силикагеля.



**Рис. 18.** Микрофотография, полученная методом СЭМ (а), и спектр ДО (б) сорбента SiO<sub>2</sub>-S-Au-S-C(O)-NH-эремомицин.



**Рис. 19.** Карты распределения золота (а) и серы (б) на поверхности сорбента SiO<sub>2</sub>-S-Au-S-C(O)-NH-эремомицин, полученные методом СЭМ.

## Глава 5. Расширение энантиоселективных возможностей хирального сорбента с эремомицином

Литературный обзор показал перспективность использования хиральных сорбентов с антибиотиком эремомицином для разделения изомеров таких классов веществ, как профены, аминокислоты, дансил-производные аминокислот. Интересно оценить его возможности по отношению к неизученным классам хиральных соединений, то есть понять, можно ли расширить область применения таких сорбентов.

Расширение энантиоселективных возможностей хирального сорбента с эремомицином в качестве селектора проведено в работе двумя путями: поиск новых классов веществ, энантиомеры которых до этого не разделяли на таком сорбенте, и разработка методик по определению энантиомерной чистоты лекарственных препаратов. Также на основе сорбента с эремомицином синтезированы новые бинарные хиральные сорбенты. Перспективность смешанных хиральных сорбентов также видна из литературного обзора.

### 5.1. Разделение оптических изомеров производных аминокислот

Из данных обзора литературы [24 – 27] известно, что сорбент с эремомицином в качестве хирального селектора (коммерческая колонка Nautilus-E) позволяет разделять нативные и дансил-производные аминокислот.

Для расширения области применения хирального сорбента с эремомицином в данной работе исследовали разделение энантиомеров бензилоксикарбонил-, бензоил-, трет-бутоксикарбонил- производных аминокислот на экспериментальном сорбенте (*методика 2*, длина колонки 100\*4.6 мм) в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ. Структуры таких производных аминокислот представлены на рис. 20.

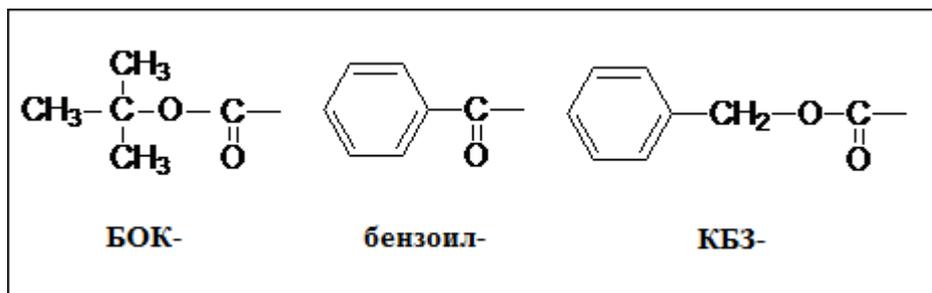


Рис. 20. Структуры производных аминокислот.

Изучены особенности удерживания производных на силикагеле, модифицированном эремомицином при элюировании смесями метанола или изопропанола и буферного раствора. Удерживание сорбатов и селективность разделения оптических изомеров определяются содержанием органического модификатора в подвижной фазе (ПФ), значением pH буферного раствора и его концентрацией. Для элюирования производных аминокислот использовали фосфатный буферный раствор с pH 7.0 и 8.0. Содержание метанола, изопропанола варьировали в интервале от 1 до 30 %. В результате исследований установлено, что для всех производных аминокислот L-изомер элюируется первым.

В табл. 7 представлены хроматографические параметры производных аминокислот, полученные при различном составе подвижной фазы.

**Таблица 7.** Хроматографические параметры разделения энантиомеров производных аминокислот на силикагеле, модифицированном эремомицином. Концентрация растворов производных аминокислот – 0.5 мг/мл.

Вещество	k'	R <sub>s</sub>	α	Подвижная фаза	
КБЗ- DL-валин	1.55	2.62	3.91	iPrOH/ФБ* (50 мМ, pH 8), 10/90, 0.5 мл/мин	
КБЗ- DL-аланин	1.67	3.81	4.17		
КБЗ- DL-метионин	1.90	2.31	3.15		
КБЗ- DL-лейцин	2.36	2.81	4.32		
КБЗ- DL-норлейцин	2.46	3.01	3.99		
КБЗ- DL-аспарагиновая кислота	1.18	0.39	1.25		
КБЗ- DL-аспарагин	1.58	2.63	2.69		
Бензоил- DL-аланин	1.13	3.63	2.98		
Бензоил- DL-валин	1.10	2.54	2.44		
Бензоил- DL-фенилаланин	3.80	4.54	4.82		
Бензоил- DL-метионин	1.46	2.69	2.57		
Бензоил- DL-аргинин	1.62	1.31	1.39		
БОК- DL-триптофан	7.15	2.02	2.88		
БОК- DL-серин	1.32	1.34	1.75		
КБЗ- DL-валин	1.31	2.40	4.11		iPrOH/ФБ (50 мМ, pH 7), 30/70, 0.5 мл/мин
КБЗ- DL-аланин	1.60	4.78	4.27		
КБЗ- DL-метионин	1.14	1.90	3.69		
КБЗ- DL-лейцин	1.55	3.57	4.89		
КБЗ- DL-норлейцин	1.30	3.55	4.61		
КБЗ- DL-аспарагиновая кислота	3.41	0.68	1.29		
КБЗ- DL-аспарагин	1.76	3.66	2.90		
КБЗ- DL-фенилаланин	2.75	4.80	8.44		
КБЗ- DL-триптофан	5.02	2.29	4.03		

Продолжение табл. 7

Бензоил- DL-аланин	2.41	4.80	3.21	iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 7), 10/90, 0.5 мл/мин
Бензоил- DL-валин	2.47	2.97	2.47	
Бензоил- DL-фенилаланин	8.55	6.58	5.28	
Бензоил- DL-метионин	3.30	3.20	2.51	
Бензоил- DL-аргинин	1.83	1.53	1.41	
БОК- DL-серин	0.92	4.01	6.51	
БОК- DL-валин	0.93	1.75	2.42	
КБЗ- DL-валин	0.94	2.27	3.74	MeOH/ФБ (50 мМ, рН 8), 30/70, 0.5 мл/мин
КБЗ- DL-аланин	0.92	3.90	4.12	
КБЗ- DL-лейцин	1.23	2.36	4.23	
КБЗ- DL-норлейцин	1.21	2.59	4.58	
КБЗ- DL-аспарагин	1.16	3.04	2.69	
КБЗ- DL-триптофан	6.33	2.33	4.72	
Бензоил- DL-аланин	1.19	3.57	2.75	MeOH/ФБ (50 мМ, рН 8), 10/90, 0.5 мл/мин
Бензоил- DL-валин	1.32	2.26	2.10	
Бензоил- DL-метионин	1.85	2.24	2.25	
Бензоил- DL-аргинин	2.05	1.13	1.30	
БОК- DL-триптофан	8.71	2.20	2.97	
БОК- DL-серин	1.73	1.00	1.74	

$k'$  - фактор удерживания первого элюируемого компонента

\* - ФБ = фосфатный буферный раствор

Анализ полученных данных (табл. 7) показал, что для одной и той же аминокислоты при усложнении структуры производного (в ряду БОК < бензоил- < КБЗ) происходит увеличение ее удерживания, а также увеличение разрешения и селективности. При этом, увеличение удерживания и разрешения пиков при переходе от бензоил- к КБЗ- производным незначительно по сравнению с увеличением тех же параметров при переходе от БОК-производных к бензоил-, что связано с более резким изменением структуры производного во втором случае при появлении ароматического кольца.

Среди всех исследованных производных аминокислот наиболее удерживаемыми в идентичных условиях являются КБЗ-производные, что связано с наличием в их структуре бензольного кольца и карбонильной группы, позволяющих реализовывать наиболее сильное взаимодействие сорбата с эремомицином. Ароматическая часть молекулы производных позволяет образовывать  $\pi$ - $\pi$ -комплексы между сорбатом и неподвижной фазой, а наличие группы  $>C=O$ , содержащей  $\pi$ -электроны и двойную связь, создает возможность

дополнительных  $\pi$ - $\pi$ , дипольных взаимодействий и образования водородных связей.

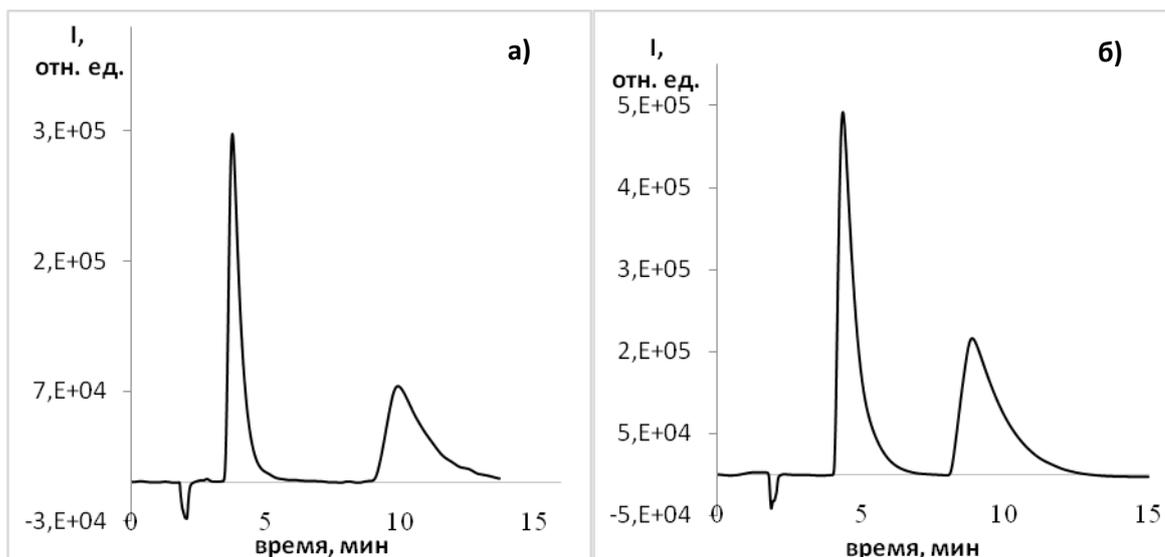
На примере КБЗ-производных было изучено влияние природы аминокислоты (табл. 8) на разделение энантиомеров. Установлено, что удерживание КБЗ-производных увеличивается в ряду (в скобках указаны значения коэффициентов емкости для первого энантиомера, подвижная фаза: *i*PrOH/ФБ (50 мМ, рН 8) 10/90): аспарагиновая кислота (1.18) < валин (1.55) < аспарагин (1.58) < аланин (1.67) < метионин (1.90) < лейцин (2.36) < норлейцин (2.46) < фенилаланин (4.91). На рис. 21 (а, б) показаны примеры разделения КБЗ-производных аминокислот. Анализ полученных данных (табл. 8) показывает, что внутри одного класса производных аминокислот увеличение удерживания энантиомеров на сорбенте происходит по мере усложнения структуры и увеличения молекулы самой аминокислоты, при этом разрешение пиков энантиомеров увеличивается по мере увеличения гидрофобности производных аминокислот. Сравнительно небольшое удерживание КБЗ-DL-метионина свидетельствует о том, что наличие дополнительного атома серы не вносит большого вклада в удерживание изомеров.

Установлено также, что замена изопропанола в подвижной фазе на метанол приводит к увеличению удерживания производных аминокислот, улучшению хроматографических параметров, однако при этом резко увеличивается время анализа. Из данных табл. 8 видно, что для всех изученных КБЗ-производных аминокислот увеличение объемной доли органического модификатора в подвижной фазе приводит к уменьшению удерживания веществ, а также уменьшению разрешения и селективности. Полученные закономерности соответствуют режиму ОФ хроматографии, следовательно, в удерживание сорбатов на макроциклических антибиотиках вносят вклад и гидрофобные взаимодействия.

**Таблица 8.** Хроматографические параметры разделения энантиомеров КБЗ-производных аминокислот на сорбенте силикагель/эремомицин при различном содержании органического модификатора в подвижной фазе: iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 8), 0.5 мл/мин. Концентрация растворов КБЗ-аминокислот – 0.5 мг/мл.

Вещество	Объемная доля изопропанола, %	$k'$	$R_s$	$\alpha$
КБЗ-DL-валин	10	1.55	2.62	3.91
	20	1.13	1.91	3.92
	30	0.58	1.91	3.60
КБЗ- DL-аланин	10	1.67	3.81	4.17
	20	1.22	3.42	4.01
	30	0.52	1.16	3.29
КБЗ- DL-метионин	10	1.90	2.31	3.15
	20	1.22	1.57	3.30
	30	0.52	1.16	3.29
КБЗ- DL-лейцин	10	2.36	2.81	4.32
	20	1.60	3.11	4.46
	30	0.71	2.51	4.33
КБЗ- DL-норлейцин	10	2.46	3.01	3.99
	20	1.57	2.85	4.30
	30	0.60	2.55	4.22
КБЗ- DL-аспарагиновая кислота	10	1.18	0.39	1.25
	20	1.07	0.10	1.15
	30	0.80	-	-
КБЗ- DL-аспарагин	10	1.58	2.63	2.69
	20	1.29	3.02	2.71
	30	0.83	2.51	2.69
КБЗ- DL-фенилаланин	10	4.91	7.31	7.26
	20	3.78	5.60	7.48
	30	1.46	3.20	7.46

$k'$ - фактор удерживания первого элюируемого компонента

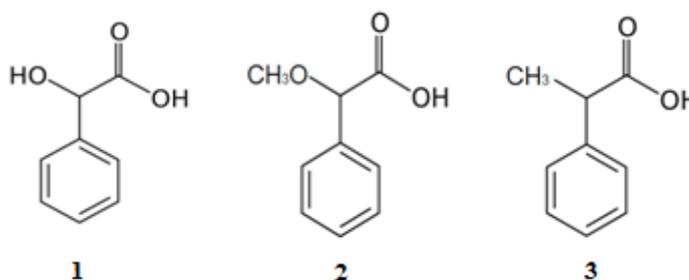


**Рис. 21.** Хроматограммы КБЗ-производных аминокислот ( $c=0.5$  мг/мл), полученные на сорбенте с эремомицином: а) КБЗ-DL-аланин. ПФ: *i*PrOH/ФБ (50 мМ, рН 8) 20/80, 0.5 мл/мин;  $\lambda=210$  нм; б) КБЗ-DL-аспарагин. ПФ: *i*PrOH/ФБ (50 мМ, рН 8) 10/90, 0.5 мл/мин;  $\lambda=210$  нм.

Сравнение полученных данных по разделению энантиомеров производных аминокислот на сорбенте с эремомицином с данными, полученными на сорбенте с антибиотиком ванкомицином, позволяет сделать вывод о возможности получения более полного разделения энантиомеров на эремомицине [136]. Разделение изомеров исследованных производных на ванкомициновой неподвижной фазе в большинстве случаев неполное. При высокой эффективности колонки (коммерческая колонка, длина которой больше в 2.5 раза) тем не менее, максимальные значения селективности получены только для бензоил-DL-аланина и КБЗ-DL-аланина (1.27 и 1.24 соответственно) и разрешение пиков энантиомеров – 1.20 и 1.34. Тогда как на неподвижной фазе с эремомицином максимальные значения селективности для этих же производных аланина составили 3.21 и 4.27 соответственно (разрешение пиков 4.80 и 4.78). Более полное разделение энантиомеров производных аминокислот на эремомициновой неподвижной фазе по сравнению с ванкомициновой можно объяснить наличием в структуре эремомицина дополнительного гидрофобного кольца, которое обеспечивает образование с сорбатами дополнительных гидрофобных взаимодействий, вносящих основной вклад в энантиораспознавание. Таким образом, выяснено, сорбент силикагель/эремомицин обладает способностью разделения энантиомеров бензоил-, БОК-, КБЗ-производных аминокислот.

## 5.2. Разделение энантимеров $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот

В литературном обзоре описано использование сорбента с эремомицином для разделения энантимеров такого класса соединений, как  $\alpha$ -фенилкарбоновые кислоты. Поскольку, одной из наших задач является унифицирование ХНФ с эремомицином, а авторы работы [28] в качестве органической составляющей ПФ использовали достаточно нетрадиционный этанол, мы решили провести разделение энантимеров данного класса соединений в более традиционных условиях, используя в качестве органического модификатора ПФ ацетонитрил. В качестве водной составляющей ПФ вместо ацетатного буферного раствора использовали фосфатный. Размер колонки с сорбентом (*методика 2*) составлял 100\*4.6 мм. В качестве аналитов использовали миндальную кислоту,  $\alpha$ -метоксифенилуксусную кислоту и  $\alpha$ -фенилпропионовую кислоту, структуры которых представлены на рис. 22.



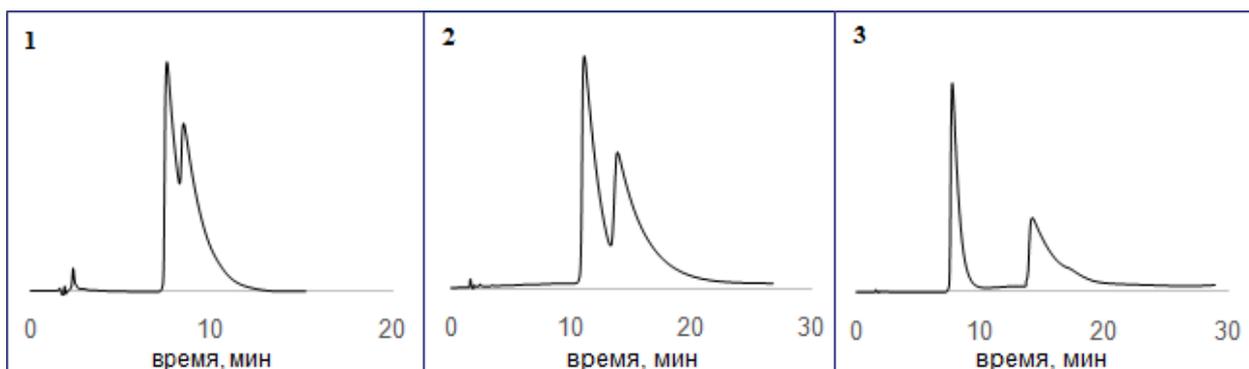
**Рис. 22.** Структуры  $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот: 1 – миндальная кислота, 2 –  $\alpha$ -метоксифенилуксусная кислота, 3 –  $\alpha$ -фенилпропионовая кислота.

Из данных по энантиоразделению, представленных в табл. 9, можно сделать вывод об уменьшении удерживания аналитов при увеличении доли органического модификатора в подвижной фазе, те же выводы делают и авторы работы [28].

**Таблица 9.** Хроматографические параметры  $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот, полученные на сорбенте силикагель/эремомицин. ПФ: ACN/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 мМ, рН 4.7), 0.5 мл/мин. Концентрация  $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот – 0.5 мг/мл.

Кислота	об. % ACN							
	40				30			
	$t'_{1, \text{мин}}$	$t'_{2, \text{мин}}$	$R_s$	$\alpha$	$t'_{1, \text{мин}}$	$t'_{2, \text{мин}}$	$R_s$	$\alpha$
Миндальная	3.24	3.74	0.50	1.16	3.98	4.61	0.55	1.16
$\alpha$ -Метоксифенилуксусная	2.03	4.25	3.34	2.09	2.66	5.63	3.06	2.12
2-Фенилпропионовая	1.26	1.47	0.42	1.17	2.45	2.85	0.60	1.17

Сравнение полученных данных с данными авторов работы [28, табл. 1], позволяет судить о сохранении общих закономерностей удерживания  $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот на сорбенте с эремомицином вне зависимости от состава ПФ. Удерживание исследуемых кислот на сорбенте увеличивается в ряду: 2-фенилпропионовая кислота <  $\alpha$ -метоксифенилуксусная кислота < миндальная кислота. Увеличение удерживания происходит по мере появления в структуре кислот полярных групп  $\text{CH}_3\text{O}$ - и  $\text{OH}$ - в  $\alpha$ -метоксифенилуксусной и миндальной кислотах соответственно, которые способны взаимодействовать с активными центрами антибиотика. Как и авторы [28], мы подтвердили, что наилучшие значения разрешения достигаются для изомеров  $\alpha$ -метоксифенилуксусной кислоты (рис. 23), что объясняется особенностями ее структуры, в которой каждый из заместителей ( $\text{C}_6\text{H}_5$ -,  $-\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{O}$ -) находится в своей плоскости по отношению к хиральному центру.



**Рис. 23.** Хроматограммы  $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот ( $c=0.5$  мг/мл):

1 –  $\alpha$ -фенилпропионовая кислота, 2 – миндальная кислота,  
3 –  $\alpha$ -метоксифенилуксусная кислота, ПФ:  $\text{ACN}/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 мМ, pH 4.7), 30/70,  
0.5 мл/мин, 254 нм.

Стоит отметить, что при одинаковом содержании органического модификатора в ПФ в нашем исследовании и в работе [28] значения селективности аналитов схожи, в то время как полученные нами значения коэффициентов разрешения значительно ниже. Это связано с рядом причин, в числе которых использование нами колонки длиной 100 мм, в то время как авторы работы [28] использовали колонку 250 мм, содержащую больше хирального селектора, а также уменьшенная в нашем случае концентрация буферного раствора в ПФ и отличная элюирующая способность ацетонитрила по сравнению с этанолом.

### 5.3. Определение энантиомерной чистоты гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутамината (экспериментального препарата X-15)

Актуальной проблемой современной медицины является создание и исследование новых нейротропных средств, способных эффективно защищать мозг. Важность этого связана с высокой долей летальных исходов при инсульте, а также с тем, что применяемые при нем препараты разных фармакологических групп не всегда эффективны и имеют серьезные побочные эффекты [137, 138]. В неврологии при острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения и связанных с ней заболеваниях, в том числе при инсульте и его последствиях, широко используется мексидол [139], который является производным 3-оксипиридина и обладает нейротропной, нейропротекторной и антиоксидантной активностью. Однако мексидол не всегда эффективен, например, он обладает недостаточной противогипоксической и ноотропной активностью [140]. В России разработан новый препарат на основе производного гидроксипиридиния-N-ацетил-L-глутамината (экспериментальный препарат X-15) [141], который является аналогом мексидола. Структурная формула представлена на рис. 24. Он обладает выраженным нейропротекторным действием в сочетании с антиоксидантной, противогипоксической, антиамнестической, противоукачивающей активностью и способностью улучшать когнитивные функции. Клинические испытания на животных показали, что экспериментальный препарат X-15 превосходит мексидол по противогипоксической активности, давая эффект в значительно меньших дозах (в 25 раз) [141]. Поскольку в растворе может происходить рацемизация аминокислот и их производных [142], то есть образование N-ацетил-D-глутамината при хранении или обработке экспериментального препарата X-15, необходим контроль содержания D-изомера в лекарственных формах.

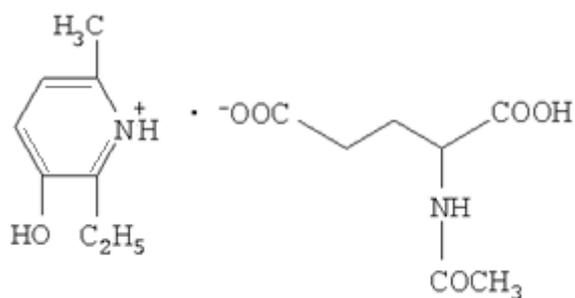
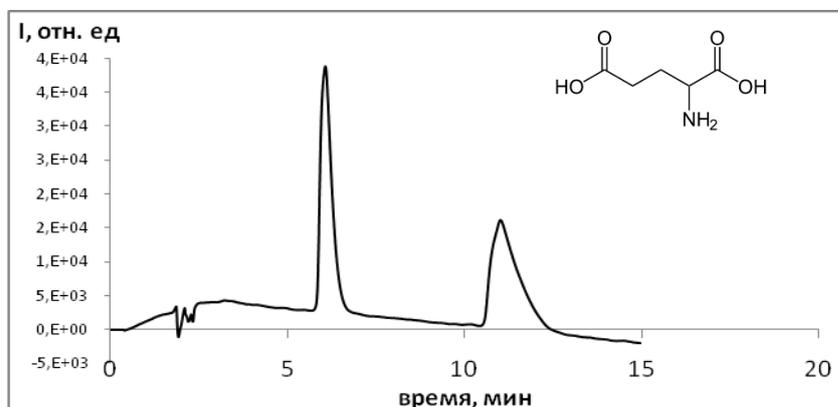


Рис. 24. Структурная формула экспериментального препарата X-15.

Ранее для разделения энантиомеров ацетил-D,L-глутаминовой кислоты использовали либо газовую хроматографию [142], либо капиллярный электрофорез при введении в фоновый электролит в качестве хирального селектора ванкомицин [143]. Данных по разделению энантиомеров гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутамината какими-либо способами в литературе не найдено.

Для решения задачи о наличии в лекарственных формах экспериментального препарата X-15 (в субстанции и водном растворе после стерилизации) D-формы, количество которой нормируется не больше 0.2 %, необходимо подобрать условия оптимального разделения энантиомеров препарата. Условия подбирали на коммерческой колонке с сорбентом с эремомицином Nautilus-E, размером 250\*4 мм (методика 2).

Поскольку фармпрепарат представляет собой производное D,L-глутаминовой кислоты, предварительно провели разделение энантиомеров D,L-глутаминовой кислоты в условиях, описанных в работе [26]. ПФ состояла из смеси MeOH/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.04 М, pH 4), 20/80, скорость подвижной фазы – 0.5 мл/мин. Разделение оптических изомеров в данных условиях занимает около 25 минут. Увеличение скорости подвижной фазы до 1 мл/мин позволило сократить время анализа. Полученная хроматограмма рацемической смеси D,L-глутаминовой кислоты (с=0.8 мг/мл) показана на рис. 25. Первым элюируется L-изомер, вторым – D-изомер, что подтверждено введением индивидуальных энантиомеров. Высокие значения разрешения пиков (R<sub>s</sub>=2.7) и селективности (α=1.8) при небольшой длительности анализа (15 мин) позволяют считать данную методику подходящей для разделения энантиомеров D,L-глутаминовой кислоты.



**Рис. 25.** Разделение энантиомеров D,L-глутаминовой кислоты (с=0.8 мг/мл) на сорбенте с эремомицином. ПФ: MeOH/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.04 М, pH 4), 20/80, 1 мл/мин, 210 нм.

Предположительно, N-ацетил-D,L-глутаминовая кислота удерживается на используемой колонке сильнее, чем D,L-глутаминовая кислота, использование такой же подвижной фазы заметно увеличит время анализа. Действительно, в данных условиях время удерживания N-ацетил-D,L-глутаминовой кислоты превышает 50 мин, зафиксировать пик D-изомера за приемлемое время анализа не удалось. Столь сильное удерживание N-ацетил-D,L-глутаминовой кислоты связано с образованием дополнительных водородных связей между кислородом ацетогруппы и amino- и гидроксильными группами в молекуле эремомицина.

Уменьшение удерживания соединения на сорбенте возможно при увеличении элюирующей способности подвижной фазы. Этому может способствовать увеличение концентрации  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  в элюенте, уменьшение его pH, а также увеличение доли органического растворителя в подвижной фазе и замена метанола на ацетонитрил. Для подбора подходящего состава подвижной фазы для энантиоразделения N-ацетил-D,L-глутаминовой кислоты за приемлемое время анализа варьировали концентрацию раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и его pH, а также природу органического растворителя и скорость потока подвижной фазы.

При введении L-изомера было установлено, что он элюируется со временем, характерным для первого пика на хроматограмме. Следовательно, первый пик на хроматограмме соответствует L-изомеру, а второй – D-изомеру.

Увеличение концентрации органического растворителя (метанола) в элюенте до 40 об. % привело лишь к небольшому уменьшению удерживания ацетил-D,L-глутаминовой кислоты, разделить энантиомеры при этом не удалось (табл. 10). Дальнейшее увеличение концентрации метанола нецелесообразно, так как в таком случае ацетил-L-глутаминовая кислота не удерживается на сорбенте и выходит одновременно с системным пиком.

Уменьшение pH раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.04 M) с 4 до 3, при содержании его в подвижной фазе 80 об. %, позволило разделить D- и L-изомеры N-ацетил-глутаминовой кислоты, однако пик D-формы очень размыт, и время анализа составляет более 30 минут. Более кислые подвижные фазы использованы не были из-за их негативного влияния на стабильность сорбента. Для дальнейших исследований использовали растворы  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  с pH 3.

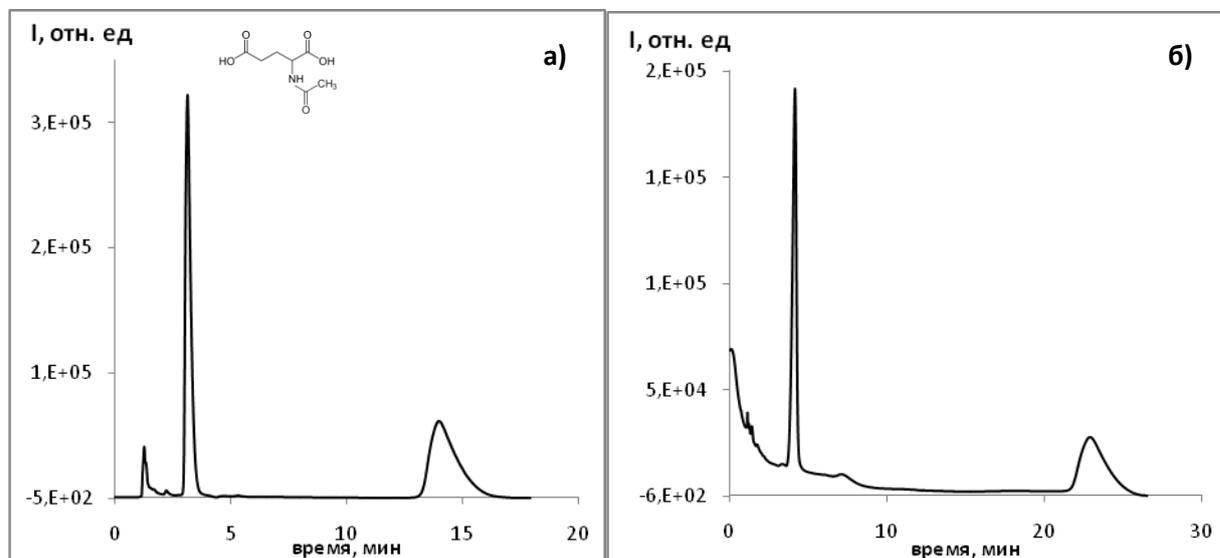
Замена органического модификатора подвижной фазы с метанола на ацетонитрил позволила уменьшить время удерживания N-ацетил-D,L-глутаминовой кислоты (табл. 10). Например, при элюировании рацемической смеси фазой ацетонитрил/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.04 М, рН 3), 20/80 оно составило 25 минут, при этом незначительно увеличились селективность и разрешение пиков D- и L-форм, однако пики, по-прежнему, очень размыты.

Увеличение содержания ацетонитрила в подвижной фазе до 30 об. % сократило время удерживания D-формы до 14 мин, но он очень размыт, что затрудняет определение этого компонента. Дальнейшее увеличение концентрации нецелесообразно, так как при этом пик первого изомера элюируется близко к мертвому времени колонки. Поэтому на следующем этапе выбора состава подвижной фазы варьировали концентрацию NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> в диапазоне от 0.04 М до 0.10 М. При увеличении концентрации NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> до 0.10 М время удерживания изомеров уменьшается. При этом селективность разделения растет, что позволяет разделять пики с хорошим разрешением (табл. 10).

**Таблица 10.** Хроматографические параметры N-ацетил-D,L-глутаминовой кислоты с использованием подвижных фаз различного состава. Скорость потока 1.5 мл/мин, 210 нм. Концентрация раствора – 1 мг/мл.

Подвижная фаза	t', мин		R <sub>s</sub>	α	N <sub>L</sub> , тг/м	N <sub>D</sub> , тг/м
	L	D				
MeOH/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 М, рН 4), 20/80	21.1	-	-	-	38100	-
MeOH/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 М, рН 4), 30/70	19.9	-	-	-	42400	-
MeOH/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 М, рН 4), 40/60	18.8	-	-	-	47400	-
MeOH/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 М, рН 3), 20/80	11.7	22.8	0.82	1.95	16000	55100
ACN/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 М, рН 3), 20/80	8.7	20.9	1.29	2.39	9500	46600
MeOH/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 М, рН 3), 30/70	7.5	21.2	1.42	2.83	3500	22500
ACN/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.04 М, рН 3), 30/70	4.8	14.1	1.72	2.94	7300	47800
MeOH/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.08 М, рН 3), 30/70	5.3	20.3	2.25	3.85	2300	30300
ACN/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.08 М, рН 3), 30/70	3.7	16.6	2.72	4.53	4100	44000
MeOH/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.10 М, рН 3), 30/70	2.7	19.4	4.71	7.19	1500	40700
ACN/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.10 М, рН 3), 30/70	1.9	12.7	4.12	6.82	1000	18500

Использование в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.10 М, рН 3), 30/70 позволило разделить энантиомеры N-ацетил-D,L-глутаминовой кислоты за 20 мин при скорости потока подвижной фазы 1.5 мл/мин (рис. 26).



**Рис. 26.** Разделение энантиомеров N-ацетил-D,L-глутаминовой кислоты ( $c=1$  мг/мл) на сорбенте с эремомицином. ПФ: а) АСN/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.10 М, рН 3), 30/70; б) MeOH/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.10 М, рН 3), 30/70; 1.5 мл/мин, 210 нм.

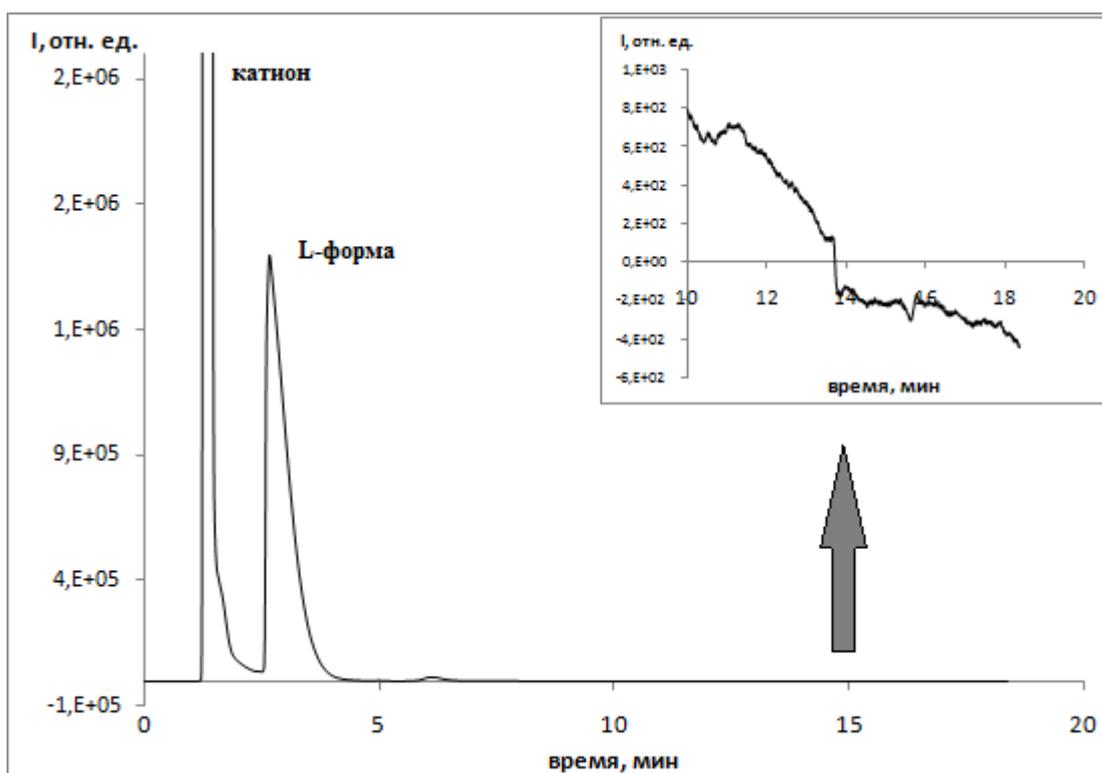
На основании полученных результатов для определения энантиомерной чистоты фармацевтического препарата на силикагеле, модифицированном эремомицином, выбрали подвижную фазу: АСN/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.10 М, рН 3), 30/70. В выбранных условиях получены хроматограммы ряда градуировочных растворов N-ацетил-глутаминовой кислоты, и построена градуировочная зависимость площади пика D-формы от ее концентрации в смеси энантиомеров (табл. 11). Предел детектирования составил 0.0003 мг/мл, рассчитанный по соотношению сигнал/шум 3/1, минимальная определяемая концентрация – 0.0005 мг/мл, что соответствует 0.14 % D-формы кислоты, рассчитанной методом внутренней нормализации по отношению к общему количеству в растворе L-формы с концентрацией 2 мг/мл. Полученные характеристики показывают, что возможно определение и разделение энантиомеров N-ацетил-глутаминовой кислоты с хорошей воспроизводимостью и чувствительностью. По требованиям регламента в препарате содержание D-формы кислоты не должно превышать 0.2 %.

**Таблица 11.** Метрологические характеристики хроматографического определения N-ацетил-D-глутаминовой кислоты ( $n = 3, P = 0.95$ ).

Диапазон определяемых конц. D-формы, мг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	$r$	$s_r$
0.0005-0.0100	$y = (60 \pm 1) \times 10^6 \times c + (5.6 \pm 0.1) \times 10^3$	0.999	0.08

Полученные результаты позволили оценить энантиомерную чистоту исходной субстанции (2 образца сухой соли N-ацетил-D,L-глутаминовой кислоты) и фармпрепарата, представляющего собой раствор этой соли в воде с концентрацией 50 мг/мл и стерилизованного при 120° С (2 образца).

Анализ водного раствора сухих препаратов, приготовленных в день анализа, показал, что образцы не содержат примеси N-ацетил-D-глутамината. Хроматограмма одного из образцов представлена на рис. 27.



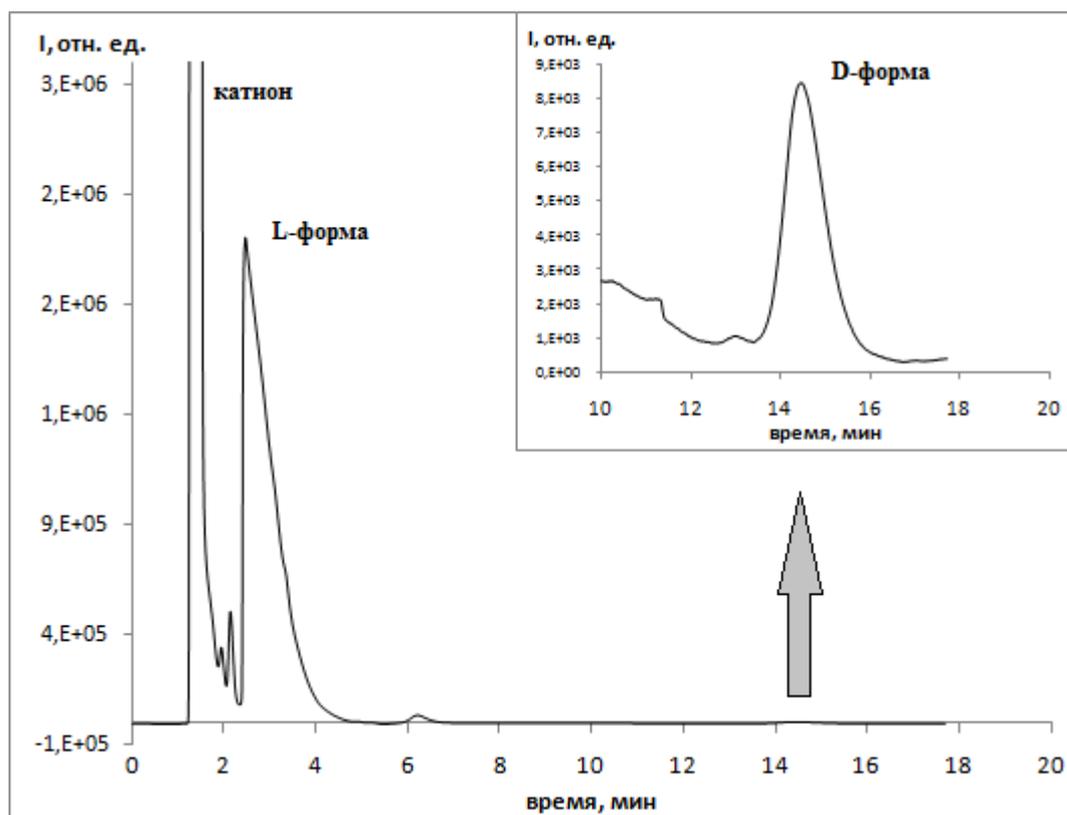
**Рис. 27.** Хроматограмма фармацевтической субстанции гидропиридиния N-ацетил-L-глутамината (25 мг/мл). ПФ: АСN/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.10 М, рН 3), 30/70; 1.5 мл/мин, 210 нм.

Стоит отметить, что катион представленной соли элюируется с мертвым временем колонки, влияя на удерживание аниона L-формы, уменьшая его. При больших концентрациях соли в растворе влияние становится более заметным,

вплоть до перекрывания пиков катиона и L-формы, что искажает результаты анализа. Приемлемые результаты анализа достигаются при концентрации соли не более 50 мг/мл. Низкая концентрация вводимой пробы (менее 10 мг/мл) приводит к тому, что площадь пика D-изомера становится сопоставимой с фоновым сигналом.

Для определения энантиомерной чистоты раствора соли после его стерилизации разбавлением исходного готовили растворы с концентрацией 10, 25 и 50 мг/мл.

Анализ этих образцов показал, что после стерилизации раствора гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутамината при 120°С происходит частичная рацемизация раствора, средняя найденная концентрация D-изомера составила  $0.47 \pm 0.04$  %. Правильность определения подтверждается постоянством найденной концентрации D-изомера в растворах соли N-ацетил-глутаминовой кислоты разной концентрации. Хроматограмма одного из образцов с концентрацией 25 мг/мл представлена на рис. 28.



**Рис. 28.** Хроматограмма образца раствора экспериментального препарата X-15 (25 мг/мл) после стерилизации: общий вид хроматограммы и увеличенный пик D-формы. ПФ:  $\text{ACN}/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.10 M, pH 3), 30/70; 1.5 мл/мин, 210 нм.

Усредненные хроматографические параметры трех параллельных измерений образцов представлены в табл. 12.

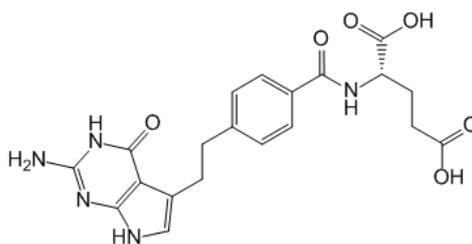
**Таблица 12.** Хроматографические параметры образцов экспериментального препарата X-15, n=3, P=0.95.

Образец	t', мин		R <sub>s</sub>	α	% D-формы
	L	D			
N-ацетил-D,L-глутаминовая кислота	1.9	12.7	4.12	6.82	49.05±0.12
Раствор после стерилизации, 10 мг/мл	1.6	13.7	6.37	8.72	0.49±0.04
Раствор после стерилизации, 25 мг/мл	1.4	13.4	6.26	9.90	0.44±0.05
Раствор после стерилизации, 50 мг/мл	1.2	13.1	4.99	11.36	0.48±0.30
Сухой образец, 25 мг/мл	1.4	-	-	-	-

Таким образом, на ХНФ с эремомицином в качестве хирального селектора проведен количественный анализ и определение энантиомерной чистоты экспериментального препарата X-15, причем анализ сухого препарата не выявил наличия примеси D-формы, однако после стерилизации его водного раствора при 120° С происходит частичная рацемизация.

#### 5.4. Определение энантиомерной чистоты препарата Пеметрексед

Пеметрексед – (N-[4-[2-(2-амино-4,7-дигидро-4-оксо-1H-пиррол[2,3-d]пиримидин-5-ил)этил]бензоил]-L-глутаминовая кислота) – препарат, который относится к фармакологической группе антиметаболитов, назначают при первичной злокачественной опухоли плевры, а также при немелкоклеточном раке лёгкого. Действующим веществом препарата является L-изомер пеметрекседа (рис. 29), поэтому необходимо отделять от него D-изомер.



**Рис. 29.** Структурная формула пеметрекседа.

Известны два подхода для оценки энантиомерного состава пеметрекседа – разделение изомеров в нормально-фазовом режиме с использованием хиральной полисахаридной неподвижной фазы, в частности на основе амилозы [144], разделение на гидрофобной неподвижной фазе – октадецилсиликагеле с использованием в качестве хиральной добавки β-циклодекстрина в подвижную фазу [145]. Предложенный авторами [144] метод определения энантиомерной

чистоты пеметрекседа методом нормально-фазовой хроматографии на неподвижной фазе на основе амилозы имеет существенный недостаток – предел обнаружения D-формы составлял 0.5 %, что не соответствует требованиям фармакопейной статьи - в препарате содержание D-формы не должно превышать 0.2 % [145].

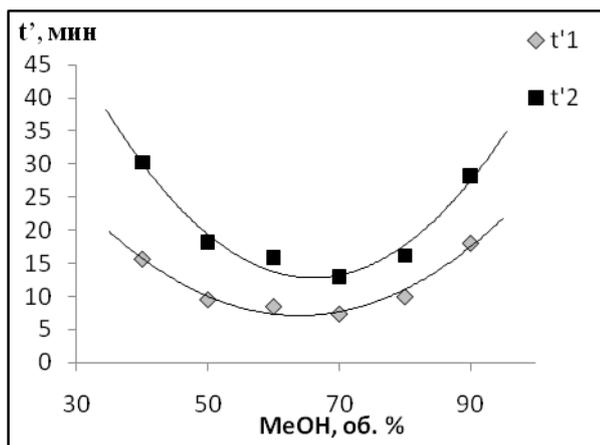
Для разделения энантиомеров пеметрекседа использовали сорбент с эремомицином (колонка Nautilus-E, 250\*4 мм). Разделение энантиомеров пеметрекседа проводили в полярно-органическом (ПО) и обращенно-фазовом (ОФ) режимах хроматографии. В ПО режиме в качестве подвижной фазы использовали органические растворители (метанол, ацетонитрил) с добавками кислот (ледяная уксусная кислота и муравьиная кислота) и оснований (триэтиламин и диэтиламин). ПО режим хроматографии не дал положительных результатов, разделить энантиомеры пеметрекседа не удалось: вещество практически не удерживалось на колонке ( $k' = 0.1 \div 0.3$ ) независимо от концентрации кислоты и амина в подвижной фазе.

Энантиоразделения данного препарата удалось добиться в ОФ режиме хроматографии. В качестве подвижной фазы использовали смесь дигидрофосфата аммония и органических растворителей (метанол, ацетонитрил).

В ОФ режиме исследовали влияние на энантиоразделение содержания метанола в составе подвижной фазы (табл. 13, рис. 30).

**Таблица 13.** Влияние содержания метанола в подвижной фазе на разделение D- и L-изомеров пеметрекседа (50 мМ  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH 2.5, 1 мл/мин) на сорбенте с эремомицином. Концентрация раствора пеметрекседа – 0.2 мг/мл.

Содержание метанола, %	$t'$ , мин		$\alpha$	$R_s$	$N_L$ , тг/м	$N_D$ , тг/м
	L	D				
40	15.6	30.2	1.94	3.3	4400	7200
50	9.6	18.2	1.90	3.0	6800	8700
60	8.5	15.9	1.87	2.9	5600	9600
70	7.4	12.9	1.74	2.8	7300	12400
80	10.0	16.1	1.61	2.7	4300	5400
90	18.1	28.9	1.60	2.7	4800	6400

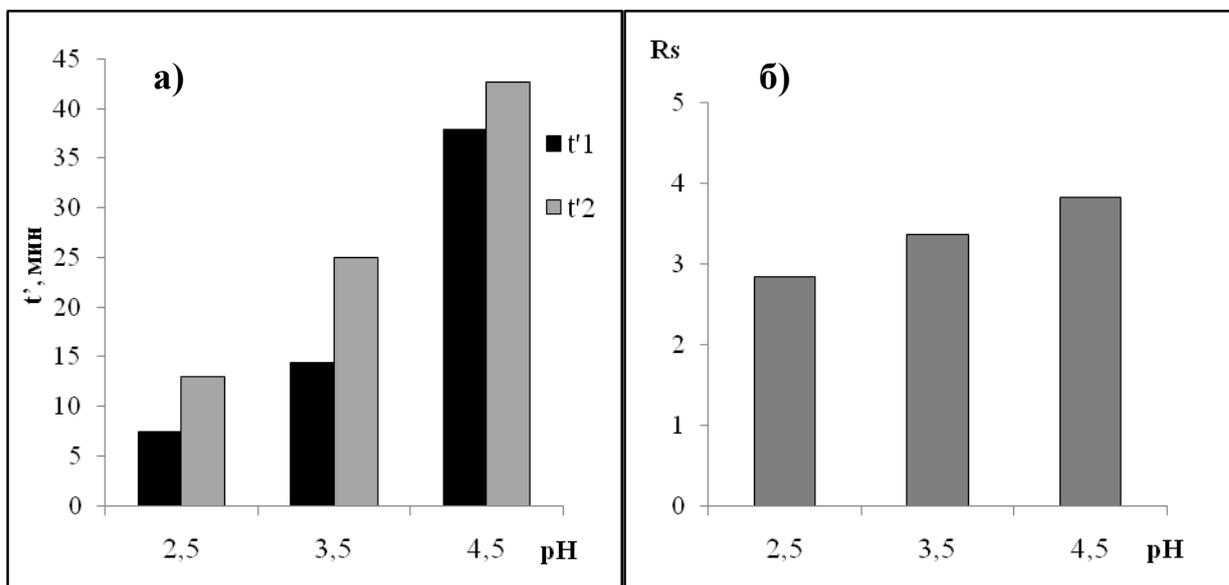


**Рис. 30.** Влияние содержания MeOH в ПФ (50 мМ  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH 2.5, 1 мл/мин, 230 нм) на времена удерживания энантиомеров пеметрекседа ( $c=0.2$  мг/мл) на сорбенте с эремомицином.

Как видно из табл. 13 и рис. 30, зависимость времени удерживания энантиомеров от содержания метанола проходит через минимум, который наблюдается при соотношении: метанол/ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (50 мМ), 70/30. Из литературы известно, что для многих антибиотиков наблюдается такой характер зависимости [146]. Это связано с тем, что при содержании органического модификатора в подвижной фазе до 80 % реализуется истинно обращенно-фазовый вариант хроматографии. Разделение энантиомеров в ОФ режиме определяется, в основном, гидрофобными взаимодействиями и образованием водородных связей между сорбатом и макроциклическим антибиотиком. При большем содержании органического модификатора изменяется состав неподвижной фазы, происходит заполнение им полостей хирального селектора. Хроматографическое поведение в этом случае определяется более сильными ионными взаимодействиями и образованием водородных связей. В случае с ионными соединениями (кислотой или основанием), большую роль играет близость и доступность функциональных групп вокруг хирального центра, усиливая ионные взаимодействия и, таким образом, управляя степенью селективности разделения.

Разрешение пиков энантиомеров при увеличении содержания органического модификатора в подвижной фазе незначительно увеличивается и всегда больше 2.5, чего достаточно для определения примеси одного энантиомера на фоне другого. Для повышения экспрессности анализа в дальнейшем использовали подвижную фазу, содержащую 70 об. % органического модификатора.

Из литературных данных [24, 25] известно, что энантиоселективность эремомицина выше при низких значениях pH, поэтому в качестве водного компонента подвижной фазы использовали раствор дигидрофосфата аммония с pH 2.5 – 4.5. Влияние pH подвижной фазы на время удерживания оптических изомеров и их разделение показано на рис. 31.



**Рис. 31.** Влияние pH подвижной фазы на а) времена удерживания и б) разрешение пиков энантиомеров пеметрекседа на сорбенте с эремомицином. ПФ: MeOH/NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 мМ), 70/30. Скорость потока 1 мл/мин, 230 нм.

При переходе pH подвижной фазы от 2.5 до 4.5 увеличиваются времена удерживания пиков и их разрешение, но при этом пики уширяются. Значительное влияние pH элюента на разделение энантиомеров обусловлено наличием ионизирующихся групп как у хирального селектора, так и у разделяемого вещества. В исследованном интервале pH эремомицин находится в форме катиона. С ростом pH уменьшается степень протонизации атомов азота, увеличивается степень диссоциации карбоксильных групп в структуре пеметрекседа, что приводит к увеличению удерживания пеметрекседа за счет электростатических взаимодействий между карбоксильными группами пеметрекседа и аминогруппами эремомицина (рис. 31, а). Энантиоразделение реализуется также за счет образования водородных связей и дипольных взаимодействий с амидными и гидроксильными группами эремомицина и за счет гидрофобных взаимодействий.

Длительный анализ нецелесообразен при использовании методики для контроля качества препарата, поэтому при дальнейших исследованиях

использовали буферные растворы с рН 2.5, т.к. при этом приемлемое значение фактора разрешения ( $\approx 2.5$ ) достигается меньше, чем за 15 мин.

Исследовали влияние природы органического растворителя подвижной фазы на параметры энантиоразделения пеметрекседа (табл. 14).

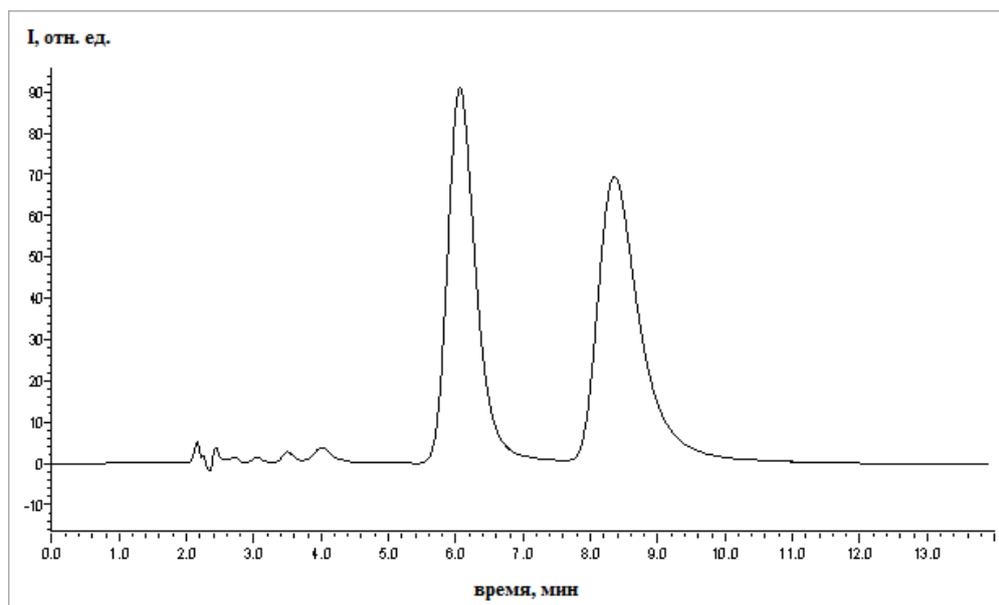
**Таблица 14.** Влияние соотношения ацетонитрила и метанола в подвижной фазе на хроматографические параметры D- и L- изомеров пеметрекседа ( $c=0.2$  мг/мл). ПФ: (ACN : MeOH)/NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 мМ, рН 2.5), 70/30, 1 мл/мин, 230 нм.

Соотношение ацетонитрил : метанол, %	t', мин		$\alpha$	R <sub>s</sub>	N <sub>L</sub> , тг/м	N <sub>D</sub> , тг/м
	L	D				
0 : 100	7.4	12.9	1.74	2.8	4300	3600
10 : 90	7.0	11.6	1.66	2.7	4800	3800
20 : 80	4.8	7.1	1.48	2.7	6000	4100
30 : 70	7.8	11.1	1.42	2.5	4600	3800
40 : 60	6.7	10.2	1.52	2.3	4400	3500
50 : 50	6.1	9.4	1.54	2.3	4500	3600
60 : 40	5.6	8.6	1.54	2.3	5000	4000
70 : 30	2.9	4.4	1.52	2.0	5300	4000
80 : 20	2.7	4.2	1.56	2.1	6000	4100
100 : 0	3.8	6.1	1.60	2.2	5300	4000

При варьировании природы органического растворителя выявили, что частичная или полная замена метанола на ацетонитрил в составе подвижной фазы в ОФ режиме приводит к незначительному уменьшению разрешения пиков. В то же время такая замена сильно влияет на удерживание веществ, что позволяет оптимизировать условия анализа по времени, получая при этом хроматограммы с хорошим разрешением пиков. В дальнейшем использовали соотношение ACN/MeOH 20/80, при этом значение разрешения пиков R<sub>s</sub> составило 2.7, исправленные времена удерживания 4.8 мин и 7.1 мин для L- и D-форм, соответственно.

На основании полученных результатов для определения энантиомерной чистоты фармацевтического препарата на сорбенте с эремомицином выбрали

подвижную фазу: MeOH/ACN/NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 мМ, рН 2.5), 55/15/30. Хроматограмма рацемической смеси пеметрекседа в данных условиях представлена на рис. 32.



**Рис. 32.** Хроматограмма разделения энантиомеров пеметрекседа ( $c=0.2$  мг/мл) на сорбенте с эремомицином. ПФ: MeOH/ACN/NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 мМ, рН 2.5), 55/15/30. Скорость потока 1 мл/мин, 230 нм.

В выбранных условиях получили хроматограммы ряда градуировочных растворов пеметрекседа и построили градуировочную зависимость площади пика D-формы от ее концентрации в смеси энантиомеров пеметрекседа (табл. 15).

**Таблица 15.** Метрологические характеристики хроматографического определения D-формы пеметрекседа ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ).

Диапазон определяемых концентраций D-изомера пеметрекседа, мг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	$r$	$s_r$
0.0005-0.0150	$Y = (21 \pm 1) \times 10^6 X + (11 \pm 5) \times 10^3$	0.998	0.06

Предел детектирования, рассчитанный по соотношению сигнал/фон 3/1, составил 0.0003 мг/мл. Минимальная определяемая концентрация – 0.0005 мг/мл, что соответствует 0.12 % D-формы, рассчитанной методом внутренней нормализации по отношению к общему количеству в растворе L-формы с концентрацией 2 мг/мл. Полученные характеристики показывают, что возможно определение и разделение энантиомеров фармпрепарата пеметрекседа с хорошей воспроизводимостью и чувствительностью.

Полученные результаты позволили определить энантиомерную чистоту субстанции пеметрексед. Анализ метанольного раствора субстанции пеметрексед, приготовленного в день анализа, показал, что вещество не содержит примеси D-изомера.

Для проверки правильности результатов провели анализ модельного раствора субстанции, с добавкой рацемической смеси пеметрекседа, так чтобы содержание D-энантиомера составляло 10 мкг/мл, используя градуировочную зависимость. Соотношение энантиомеров в рацемической смеси оценивали по соотношению площадей пиков на хроматограмме и проверили, используя стандарт L-энантиомера. Содержание D-энантиомера в рацемической смеси составляет  $(53.0 \pm 0.5) \%$  ( $n = 10, P = 0.95$ ). Определение повторили методом «введено-найденно», для этого получили хроматограммы модельного раствора с добавками рацемической смеси 5, 8, 10, 20, 30 мкг/мл. Результаты определения двумя методами сходны (табл. 16), что дает нам право говорить о правильности определения.

**Таблица 16.** Определение содержания D-формы пеметрекседа в субстанции методом градуировочного графика и методом добавок ( $n = 3, P = 0.95$ ).

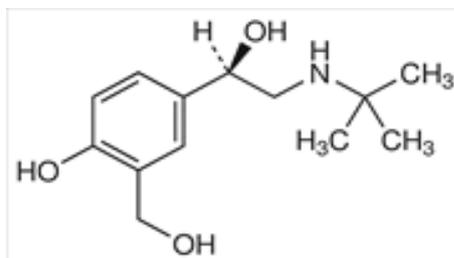
Введенная концентрация пеметрекседа, мкг/мл	Метод градуировочного графика		Метод «введено-найденно»	
	с, мкг/мл	$s_r$	с, мкг/мл	$s_r$
0	0	-	0	-
10	$9 \pm 1$	0.06	$10 \pm 2$	0.08

Таким образом, на ХНФ с эремомицином в качестве хирального селектора проведен количественный анализ и определение энантиомерной чистоты фармацевтической субстанции Пеметрексед, D-изомер обнаружен не был.

### 5.5. Определение энантиомерной чистоты препарата Левалбутерол

Еще одним препаратом, разработку методики определения энантиомерной чистоты которого проводили на сорбенте с эремомицином (колонка Nautilus-E 250\*4 мм), стал Левалбутерол (4-[(1R)-2-(*трет*-бутиламино)-1-гидроксиэтил]-2-(гидроксиметил)фенол). Препарат представляет собой R-изомер альбутерола (рис. 33) и используется как бронхолитическое средство. Применяется для

профилактики и купирования бронхоспазма при бронхиальной астме, симптоматического лечения бронхообструктивного синдрома (хронический бронхит, хроническая обструктивная болезнь легких и др.), ночной астмы и предупреждения преждевременных родов.



**Рис. 33.** Структура левалбутерола.

Разделение энантиомеров альбутерола на сорбенте с эремомицином исследовали в ПО и ОФ режимах. В ОФ режиме в качестве подвижной фазы использовали фосфатный (рН 5), цитратный (рН 6) буферные растворы и органические растворители (метанол, ацетонитрил). Разделение энантиомеров альбутерола в ОФ достигнуто не было, вещество слабо удерживалось на колонке ( $k' = 0.1 \div 0.4$ ), что не позволило разделить его энантиомеры.

Наличие сильных полярных групп в структуре макроциклических антибиотиков делает возможным использование подвижных фаз с содержанием метанола до 100 %. В этом случае, чтобы повлиять на энантиоселективность разделения, используют добавки в подвижную фазу – кислота/основание. Известно, что концентрация этой добавки влияет на удерживание полярных молекул и, кроме того, может увеличивать энантиоразделение слабо полярных молекул. Ключевым фактором для получения полного разделения является соотношение добавки кислота/основание. Каждая из антибиотиковых фаз имеет отличное от другой оптимальное соотношение состава добавки [147].

Энантиоразделения исследуемого препарата удалось добиться в ПО режиме хроматографии. В качестве подвижной фазы использовали органические растворители (метанол, ацетонитрил) с добавками кислот (уксусная кислота, муравьиная кислота, трифторуксусная кислота) и оснований (триэтиламин, трибутиламин, диэтиламин).

В ПО режиме исследовали влияние соотношения метанола и ацетонитрила в составе подвижной фазы на энантиоразделение (табл. 17).

**Таблица 17.** Влияние соотношения MeOH/ACN в подвижной фазе на хроматографические параметры для левалбутерола (1) и S-альбутерола (2). ПФ: MeOH/ACN/TEA/CH<sub>3</sub>COOH (0.05/0.05).

Соотношение ацетонитрил : метанол, об. %	t', мин		R <sub>s</sub>	α	N <sub>1</sub> , тт/м	N <sub>2</sub> , тт/м
	(1)	(2)				
0 : 100	2.6	3.1	1.10	1.2	10600	9100
5 : 95	2.9	3.4	1.09	1.2	7500	7000
10 : 90	5.5	6.0	1.15	1.1	11900	8600
20 : 80	3.0	4.3	1.18	1.4	9000	9100
30 : 70	2.6	5.1	1.08	2.0	11400	5900

Как видно из табл. 17, при варьировании природы органического растворителя выявили, что частичная замена метанола на ацетонитрил в составе подвижной фазы не влияет на разрешение пиков. В то же время такая замена влияет на удерживание веществ и селективность. Удерживание проходит через максимум, что позволяет оптимизировать условия анализа по времени, получая при этом хроматограммы с хорошим разрешением пиков. Максимальное разрешение пиков энантиомеров наблюдается при соотношении ACN : MeOH (20 : 80).

Исследовано влияние концентрации амина и кислоты (в интервале 0.05 – 0.30 об. %) на разрешение пиков энантиомеров (табл. 18).

**Таблица 18.** Влияние соотношения TEA и CH<sub>3</sub>COOH в подвижной фазе на хроматографические параметры левалбутерола (1) и S-альбутерола (2). ПФ: ACN/MeOH, 20/80.

Добавка в подвижную фазу (TEA : CH <sub>3</sub> COOH), об. %	t', мин		R <sub>s</sub>	α	N <sub>1</sub> , тт/м	N <sub>2</sub> , тт/м
	(1)	(2)				
0.05 : 0.05	3.4	4.3	1.2	1.3	9000	9100
0.10 : 0.10	6.2	6.8	1.1	1.1	7500	6800
0.10 : 0.20	6.2	6.8	0.9	1.1	6900	5800
0.10 : 0.30	6.3	6.8	0.6	1.1	5900	4100

Разрешение пиков энантиомеров увеличивается при уменьшении концентрации кислоты и амина в составе подвижной фазы. Поэтому в дальнейшем были использованы низкие концентрации добавок.

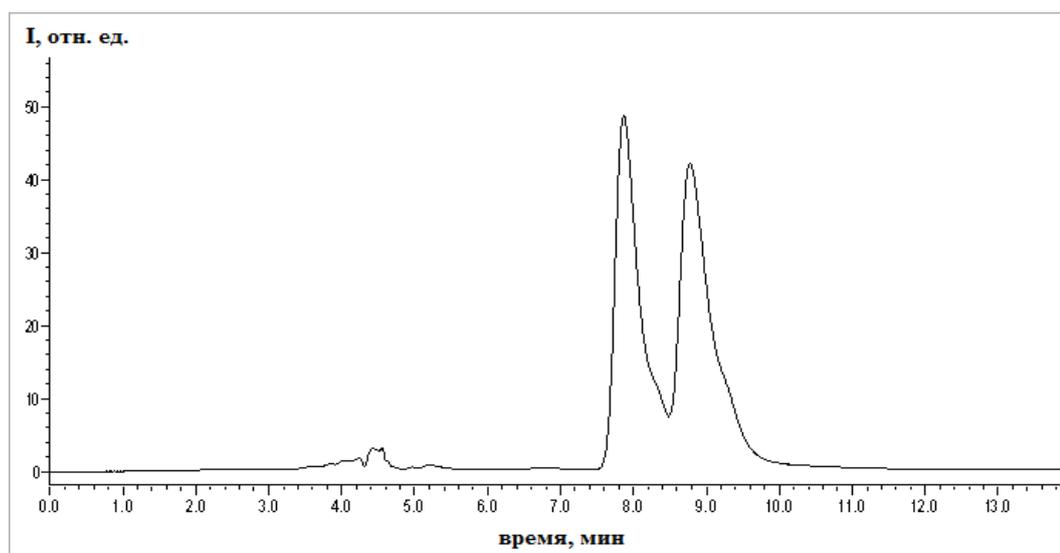
При варьировании природы кислоты и амина использовали следующие кислоты и амины: уксусная кислота, муравьиная кислота, трифторуксусная кислота, триэтиламин, трибутиламин, диэтиламин (табл. 19).

**Таблица 19.** Влияние природы кислоты и амина в составе ПФ: MeOH/ACN, 80/20, на разделение энантиомеров альбутерола (с=1 мг/мл) на сорбенте с эремомицином.

Добавка в подвижную фазу, об. %	t', мин		Rs
	1	2	
TEA/CF <sub>3</sub> COOH (0.025/0.025)	1.2	1.3	0.3
TEA/CF <sub>3</sub> COOH (0.075/0.025)	6.6	7.3	0.5
TEA/HCOOH (0.025/0.025)	1.4	1.5	0.3
TEA/HCOOH (0.075/0.025)	1.4	1.5	0.3
TEA/CH <sub>3</sub> COOH (0.025/0.025)	4.3	5.8	0.8
TEA/CH <sub>3</sub> COOH (0.075/0.025)	6.1	6.9	0.9
TBA/CH <sub>3</sub> COOH (0.025/0.025)	4.3	-	0
TBA/CH <sub>3</sub> COOH (0.075/0.025)	5.0	5.2	0.3
DEA/CH <sub>3</sub> COOH (0.025/0.025)	3.0	-	0
DEA/CH <sub>3</sub> COOH (0.075/0.025)	3.4	3.5	0.2

Исследование показало, что наилучшее разделение пиков энантиомеров достигается при использовании триэтиламина и уксусной кислоты в качестве добавки в подвижную фазу.

На основании проведенных исследований лучшее разрешение пиков энантиомеров альбутерола на сорбенте, содержащем эремомицин, получили для подвижной фазы MeOH/ACN/TEA/CH<sub>3</sub>COOH, 80/20/0.075/0.025 об. %. Для увеличения значения R<sub>s</sub> снизили скорость подачи подвижной фазы с 1 мл/мин до 0.5 мл/мин. Хроматограмма рацемической смеси представлена на рис. 34.



**Рис. 34.** Хроматограмма смеси энантиомеров альбутерола (с=1 мг/мл) на колонке Nautilus-E. Подвижная фаза: MeOH/ACN/TEA/CH<sub>3</sub>COOH, 80/20/0.075/0.025 об. %. Скорость потока 0.5 мл/мин, 270 нм.

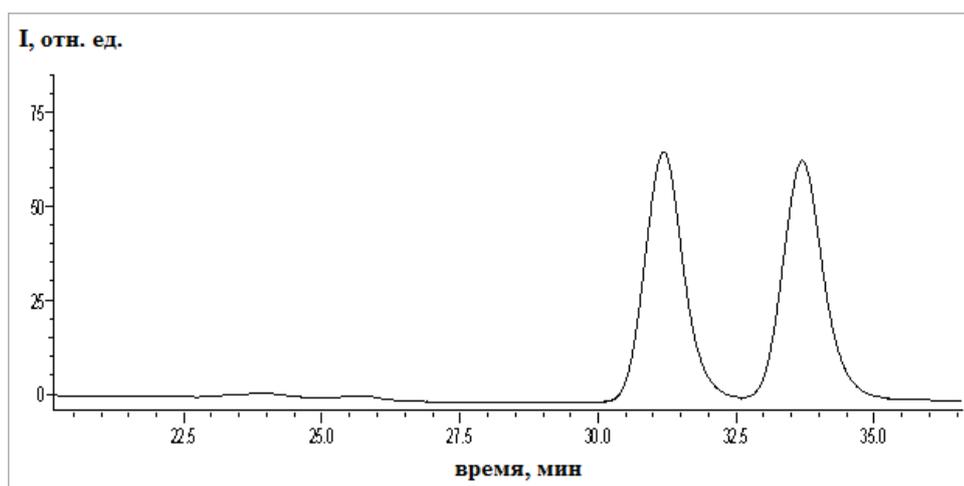
Сорбент, модифицированный эремомицином, не позволил добиться необходимого, согласно требованиям фармакопеи, разрешения пиков альбутерола ( $R_s \geq 1.5$ ), поэтому исследование продолжили на сорбенте с агликоном тейкопланина.

Для разделения энантиомеров альбутерола использовали коммерческую колонку Chirobiotic TAG (250 × 4.6 мм, диаметр зерна сорбента 5 мкм). Разделение энантиомеров альбутерола проводили в ПО и ОФ режимах. Как и в предыдущем случае, разделения энантиомеров исследуемого препарата удалось добиться только в ПО режиме хроматографии. В качестве подвижной фазы в ПО режиме использовали органические растворители (метанол, ацетонитрил) с добавками уксусной кислоты и триэтиламина.

Для альбутерола существует фармакопейная статья (USP), в которой энантиоразделение проводят на силикагеле, модифицированном агликоном тейкопланина [148]. Состав подвижной фазы, предлагаемый для определения энантиомерной чистоты альбутерола: MeOH/ACN/TEA/CH<sub>3</sub>COOH 500/500/1/3. Условия, прописанные в USP, не позволили нам добиться необходимого разрешения пиков энантиомеров ( $R_s = 1.1$ ), поэтому мы оптимизировали условия, уменьшив сначала содержание кислоты, а после и амина в ПФ до 0.05 об. %, чтобы разрешение пиков было достаточным  $R_s = 1.7$  (табл. 20, рис. 35).

**Таблица 20.** Влияние содержания кислоты и амина в составе подвижной фазы: MeOH/ACN, 90/10, на разделение энантиомеров альбутерола на сорбенте с агликоном тейкопланина.

Добавка в подвижную фазу (TEA : CH <sub>3</sub> COOH), об. %	t', мин		R <sub>s</sub>
	1	2	
0.10 : 0.30	31.9	32.8	1.1
0.10 : 0.20	32.1	33.0	1.1
0.10 : 0.10	32.1	33.1	1.3
0.10 : 0.05	32.1	33.3	1.6
0.05 : 0.05	29.1	31.6	1.7



**Рис. 35.** Хроматограмма разделения энантиомеров альбутерола ( $c=1$  мг/мл) на колонке Chirobiotic TAG. Подвижная фаза: MeOH/ACN/TEA/CH<sub>3</sub>COOH, 90/10/0.05/0.05 об. %, 1 мл/мин, 270 нм.

Разделение энантиомеров альбутерола достигнуто на колонках и с эремомицином, и с агликоном тейкопланина в полярно-органическом режиме. Состав подвижных фаз для двух селекторов, при которых наблюдалось наилучшее разрешение, очень похож. Это может объясняться тем, что и эремомицин и агликон тейкопланина содержат карбоксильные группы, первичные, вторичные амины и ароматические кольца, которые одинаково взаимодействуют с функциональными группами аналита. Более сильное удерживание и высокие значения разрешения энантиомеров альбутерола на колонке Chirobiotic TAG связаны с большей доступностью ароматических колец в его структуре, по сравнению с эремомицином, и возможностью дополнительных специфических  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействий. Достаточно простая структура молекулы альбутерола приводит к беспрепятственному взаимодействию между хиральными центрами антибиотика и анализируемого вещества, вероятно, поэтому небольшого количества хиральных центров на агликоне тейкопланина достаточно для энантиоразделения альбутерола, а ионизация аналита в ПО режиме усиливает энантиораспознавание.

На основании полученных результатов для определения энантиомерной чистоты фармацевтического препарата была выбрана колонка Chirobiotic TAG, содержащая в качестве хирального селектора агликон тейкопланина. Наиболее приемлемый состав подвижной фазы: MeOH/ACN/TEA/CH<sub>3</sub>COOH, 90/10/0.05/0.05 об. %, скорость потока 1 мл/мин, детектирование при 270 нм.

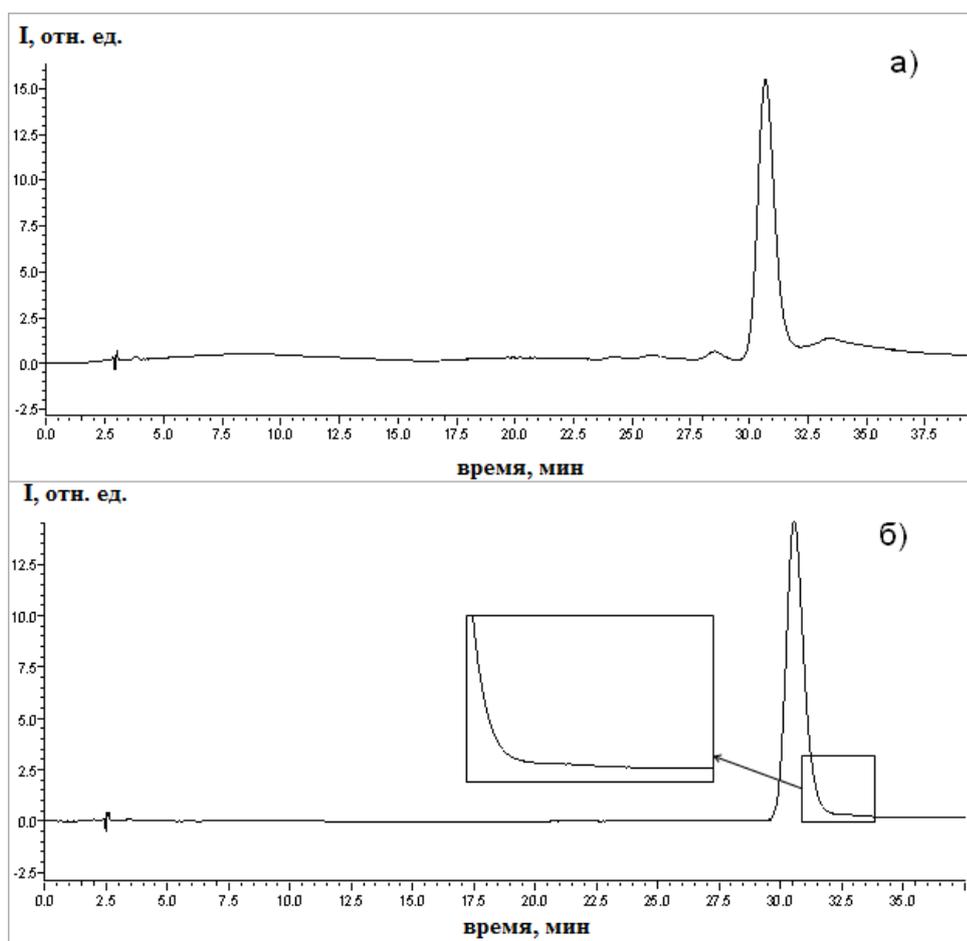
В выбранных условиях получили хроматограммы ряда градуировочных растворов альбутерола, и построили градуировочную зависимость площади пика левалбутерола от концентрации в смеси энантиомеров (табл. 21). Предел детектирования, рассчитанный по соотношению сигнал/шум 3/1, составил 0.0002 мг/мл. Минимальная определяемая концентрация – 0.0003 мг/мл, что соответствует 0.10 % S-формы, рассчитанной методом внутренней нормализации по отношению к общему количеству в растворе левалбутерола с концентрацией 1 мг/мл. Полученные характеристики показывают, что возможно определение и разделение энантиомеров альбутерола с хорошей воспроизводимостью и чувствительностью. По требованиям фармакопейной статьи в препарате содержание S-альбутерола не должно превышать 0.2 % [148].

**Таблица 21.** Метрологические характеристики хроматографического определения S-альбутерола ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ).

Диапазон определяемых концентраций S-альбутерола, мг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	$r$	$s_r$
0.0003 – 0.0100	$Y = (71 \pm 1) \times 10^5 X + (12 \pm 5) \times 10^4$	0.998	0.08

Полученные результаты позволили определить энантиомерную чистоту двух субстанций левалбутерол.

Анализ метанольных растворов двух субстанции левалбутерол показал, что первый образец (*субстанция 1*) содержит  $(5.0 \pm 0.1)$  % примеси S-альбутерола, что недопустимо по требованиям фармакопейной статьи. Хроматограмма образца представлена на рис. 36, а. Второй образец (*субстанция 2*) не содержит примеси S-альбутерола (рис. 36, б), что дает право использовать ее для производства лекарственных препаратов.



**Рис. 36.** Хроматограмма *субстанции 1* (а) и *субстанции 2* (б) левалбутерола ( $c=0.5$  мг/мл) на колонке Chirobiotic TAG. Подвижная фаза: MeOH/ACN/TEA/CH<sub>3</sub>COOH, 90/10/0.05/0.05 об. %, 1 мл/мин, 270 нм.

Для проверки правильности результатов повторили определение S-альбутерола методом добавок в тех же условиях. Для этого получены хроматограммы раствора препарата без добавок и с добавками S-альбутерола 5, 8, 10, 20, 30 мкг/мл. Результаты определения двумя методами показали одинаковые результаты (табл. 22), что дает нам право говорить о правильности количественного определения.

**Таблица 22.** Определение содержания S-альбутерола в *субстанции 2* методом градуировочного графика и методом добавок ( $n=3$ ,  $P=0.95$ ).

Вещество	Введенная концентрация, мкг/мл	Метод градуировочного графика		Метод добавок	
		$c$ , мкг/мл	$s_r$	$c$ , мкг/мл	$s_r$
S-альбутерол	0	0	0	-	-
	10	$10 \pm 1$	0.08	$9 \pm 2$	0.09

Показана возможность разделения энантимеров альбутерола на сорбенте, модифицированном эремомицином, состав подвижной фазы: MeOH/ACN/TEA/CH<sub>3</sub>COOH, 90/10/0.075/0.025 об. %. Выявлено, что разделение энантимеров альбутерола оптимально на сорбенте, модифицированном агликоном тейкопланина, состав подвижной фазы: MeOH/ACN/TEA/CH<sub>3</sub>COOH, 90/10/0.05/0.05 об. %. Определены метрологические характеристики методики определения левалбутерола. Проведена оценка энантиомерной чистоты двух субстанций левалбутерола. В одной из субстанций левалбутерола обнаружено 5 % S-энантиомера.

### 5.6. Изучение возможности энантиоразделения пиридотиадиазина на сорбенте с эремомицином

Пиридотиадиазин (8-(4-((4-хлорбензил)окси)фенил)-3-(2,4-диметоксифенил)-6-оксо-2,3,4,6,7,8-гексагидропиrido[2,1-b][1,3,5]тиадиазен-9-карбонитрил) - новый препарат против вируса клещевого энцефалита (рис. 37). Авторами статьи [149] было доказано ингибирование активности клещевых флавивирусов этим препаратом.

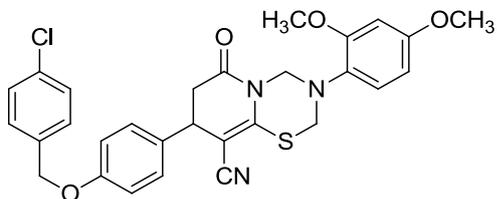


Рис. 37. Структура пиридотиадиазина.

Разделение энантимеров препарата проводили на колонке Nautilus-E в ПО и ОФ режимах. В качестве ПФ в ПО режиме использовали органические растворители (метанол, ацетонитрил) с добавками ледяной уксусной кислоты и триэтиламина. Слабое удерживание вещества на сорбенте в данном режиме хроматографии не позволило разделить энантимеры.

Энантиоразделения этого препарата достигли в ОФ режиме хроматографии. В качестве ПФ использовали смеси раствора дигидрофосфата аммония или уксусной кислоты с органическими растворителями (метанол, ацетонитрил и изопропанол).

Исследовано влияние содержания метанола в составе подвижной фазы на энантиоразделение. Хроматографические параметры, полученные при различном соотношении MeOH/NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, представлены в табл. 23.

**Таблица 23.** Хроматографические параметры для L- и D-энантиомеров пиридотиадиазина с использованием подвижных фаз с различным соотношением MeOH/NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 мМ, рН 2.5), полученные на сорбенте с эремомицином. Скорость потока 1 мл/мин.  $\lambda = 300$  нм.

Соотношение MeOH : NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	t', мин		R <sub>s</sub>	$\alpha$	N <sub>L</sub> , тт/м	N <sub>D</sub> , тт/м
	L	D				
90 : 10	0.6	-	0	-	9200	9400
80 : 20	1.1	-	0	-	7600	6800
70 : 30	0.7	1.1	0.62	1.50	6800	5600
60 : 40	1.4	-	0	-	5900	4700
50 : 50	3.7	-	0	-	8000	6600

Добиться частичного разделения энантиомеров удалось при соотношении метанола и раствора дигидрофосфата аммония 70/30.

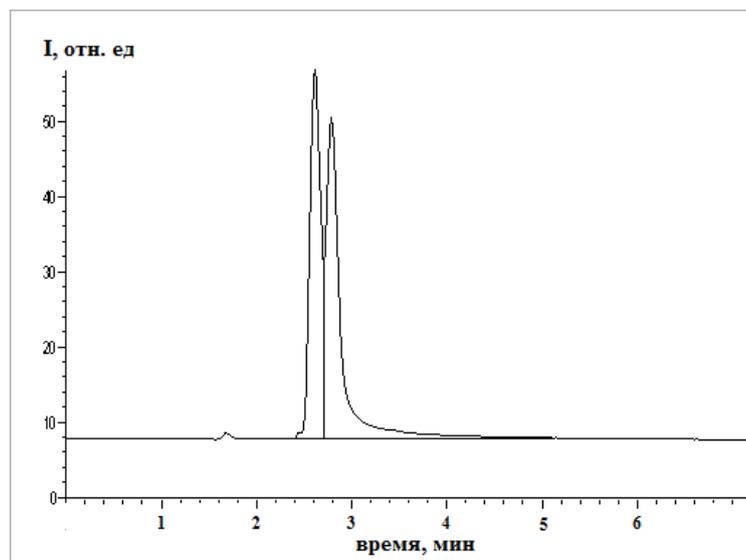
Замена раствора дигидрофосфата аммония на 0.5 М раствор уксусной кислоты (рН 2.5) в составе ПФ привела к улучшению разрешения пиков. Разрешение (R<sub>s</sub> = 0.53) получили при составе подвижной фазы: MeOH/CH<sub>3</sub>COOH (0.5 М, рН 2.5), 70/30. Дальнейшее увеличение рН до 3.5 позволило получить разрешение 0.73 (табл. 24). При рН 4.5 вещество не элюировалось с колонки. Частичное энантиоразделение, скорее всего, реализуется также за счет образования водородных связей и дипольных взаимодействий с амидными и гидроксильными группами эремомицина и за счет гидрофобных взаимодействий.

**Таблица 24.** Хроматографические параметры для L- и D-энантиомеров пиридотиадиазина ( $c=0.5$  мг/мл) с использованием подвижных фаз с различным соотношением MeOH/CH<sub>3</sub>COOH, полученные на сорбенте с эремомицином. Скорость потока 1 мл/мин.  $\lambda = 300$  нм.

Подвижная фаза	t', мин		R <sub>s</sub>	$\alpha$	N <sub>L</sub> , тг/м,	N <sub>D</sub> , тг/м,
	L	D				
(90 : 10) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (0.5 M, pH 2.5)	0.6	-	0	-	9900	9100
(80 : 20) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (0.5 M, pH 2.5)	1.0	-	0	-	7500	6800
(70 : 30) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (0.5 M, pH 2.5)	0.9	1.2	0.53	1.17	6900	5800
(60 : 40) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (0.5 M, pH 2.5)	1.6	-	0	-	5700	4100
(50 : 50) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (0.5 M, pH 2.5)	1.3	-	0	-	9000	9900
(90 : 10) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (5 mM, pH 3.5)	0.5	-	0	-	7800	7000
(80 : 20) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (5 mM, pH 3.5)	0.7	0.8	0.31	1.19	7000	5900
(70 : 30) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (5 mM, pH 3.5)	0.7	0.9	0.73	1.42	5900	4100
(60 : 40) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (5 mM, pH 3.5)	1.8	-	0		7500	6800
(50 : 50) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (5 mM, pH 3.5)	0.7	-	0		6900	5600
(40 : 60) MeOH : CH <sub>3</sub> COOH (5 mM, pH 3.5)	0.4	-	0		5700	4100

При замене метанола на другие органические растворители (ацетонитрил, изопропанол) пиридотиадиазин не удерживался на колонке и элюировался вместе с мертвым временем ( $k' = 0.1 \div 0.2$ ).

На основании полученных результатов для данного препарата на колонке Nautilus-E наилучшая подвижная фаза имеет состав: MeOH/CH<sub>3</sub>COOH (5 mM, pH 3.5), 70/30. Скорость потока 1 мл/мин, детектирование при 300 нм. Хроматограмма разделения в данных условиях представлена на рис. 38.



**Рис. 38.** Хроматограмма разделения энантиомеров пиридотиадиазина ( $c=0.5$  мг/мл) на колонке Nautilus-E. Подвижная фаза: MeOH/CH<sub>3</sub>COOH (5 мМ, pH 3.5), 70/30. Скорость потока 1 мл/мин.  $\lambda = 300$  нм.

Проведенные исследования энантиоразделения пиридотиадиазина на сорбенте с агликоном тейкопланина в ОФ и ПО режимах хроматографии показали невозможность разделения энантиомеров вещества на селекторе данной структуры. Пиридотиадиазин не удерживается на сорбенте и выходит из колонки вместе с мертвым временем. Энантиоразделение, скорее всего, реализуется также за счет образования водородных связей и дипольных взаимодействий с амидными и гидроксильными группами эремомицина и за счет гидрофобных взаимодействий. Также эремомицин содержит значительно больше хиральных центров по сравнению с агликоном тейкопланина.

Таким образом, энантиоразделяющие возможности хирального сорбента с эремомицином в качестве хирального селектора расширены благодаря возможности разделения на нем энантиомеров таких классов соединений, как БОК-, бензоил-, КБЗ-производные аминокислот,  $\alpha$ -фенилкарбоновые кислоты, а также благодаря разработке методик определения энантиомерной чистоты ряда фармпрепаратов и фармсубстанций, среди которых гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутаминат, пеметрексед, на сорбенте с эремомицином показана принципиальная возможность разделения энантиомеров левалбутерола, 8-(4-((4-хлоробензил)окси)фенил)-3-(2,4-диметоксифенил)-6-оксо-2,3,4,6,7,8-гексагидропиrido[2,1-b][1,3,5]тиадиазен-9-карбонитрила.

## **Глава 6. Хиральные сорбенты с несколькими селекторами, в том числе с эремомицином**

Поиск универсального сорбента, который можно использовать для энантиоразделения большинства классов оптических соединений стимулировал появление, так называемых, смешанных хиральных неподвижных фаз, которые содержат не один, а сразу несколько селекторов. В ВЭЖХ разработано ограниченное число таких фаз, главным образом с полисахаридами и низкомолекулярными селекторами [118 – 127]. Сочетание селекторов в неподвижной фазе определяется в значительной степени двумя факторами: способностью дополнять энантиоселективные свойства друг друга и схожесть их иммобилизации на матрицу (в нашей работе – силикагель). Поэтому при создании смешанных сорбентов, где первым селектором служит эремомицин, в качестве второго использовали макроциклический антибиотик ванкомицин (он проявляет энантиоселективность к другим классам соединений) и бычий сывороточный альбумин (большая белковая молекула, не проникающая в поры силикагеля). Модифицирование силикагеля для всех этих селекторов проводят в близких условиях.

### **6.1. Смешанный хиральный сорбент – силикагель/эремомицин-ванкомицин**

Из обзора литературы известно, что хиральный сорбент с эремомицином позволяет разделять энантиомеры недериватизированных аминокислот, но не селективен по отношению к такому классу веществ, как  $\beta$ -блокаторы. В то же время известно, хиральный сорбент с ванкомицином (коммерческая колонка Chiroboitic V) [136, 150] широко используется для разделения энантиомеров  $\beta$ -блокаторов, но не позволяет разделить изомеры аминокислот.

Работы, в которых описаны хиральные сорбенты с несколькими селекторами [118 – 127], дают нам право предположить, что наличие в одном хиральном сорбенте двух антибиотиков, обладающих энантиоселективностью к разным классам веществ, позволит расширить круг соединений, энантиоразделение которых возможно на одном сорбенте, что сделает его более универсальным. Можно предположить, что хиральный сорбент с двумя макроциклическими антибиотиками – ванкомицином и эремомицином позволит разделять энантиомеры

как  $\beta$ -блокаторов, так и аминокислот, не производя замену хроматографической колонки.

В рамках этого предположения был исследован синтезированный смешанный хиральный сорбент с ванкомицином и эремомицином (*методика 4*, колонка 100\*4.6 мм).

В качестве  $\beta$ -блокаторов использовали метопролол, пиндолол, альпренолол, окспренолол, лабетолол, атенолол, в качестве аминокислот: триптофан, фенилаланин, ДОФА, метионин.

В качестве компонентов подвижной фазы использовали ацетонитрил, метанол, изопропанол и буферный раствор, содержащий уксусную кислоту и триэтиламин.

#### **6.1.1. Разделение энантиомеров $\beta$ -блокаторов на смешанном сорбенте — силикагель/эремомицин-ванкомицин**

Ранее [136] на колонке Chirobiotic V, где хиральным селектором является ванкомицин, получено разделение энантиомеров  $\beta$ -блокаторов за 30 – 40 мин с хорошим разрешением при их элюировании метанолом с добавкой 0.01 % уксусной кислоты и триэтиламина. На смешанном сорбенте в этих условиях  $\beta$ -блокаторы удерживаются очень слабо (факторы удерживания составляют менее 0.1), что не позволяет разделить энантиомеры.

Для элюирования растворов  $\beta$ -блокаторов использовали смесь ацетонитрила, метанола и триэтиламинацетатного буферного раствора (ТЕАА). Объемную долю буферного раствора варьировали от 1 до 5 об. %, а его концентрацию в интервале 0.01 – 0.20 об. %, соотношение метанол/ацетонитрил в подвижной фазе – от 10/90 до 20/80.

Увеличение объемной доли метанола в смеси метанол/ацетонитрил в подвижной фазе приводит к заметному уменьшению удерживания  $\beta$ -блокаторов на сорбенте (табл. 25). При этом для большинства  $\beta$ -блокаторов селективность разделения и разрешение пиков энантиомеров практически не изменяются, и лишь для более удерживаемых блокаторов, таких как лабетолол, атенолол, уменьшаются селективность разделения и разрешение пиков энантиомеров. Это может свидетельствовать о том, что природа органического модификатора в подвижной

фазе влияет на неспецифические взаимодействия, определяющие удерживание веществ на поверхности сорбента, но не сказывается на энантиоселективности.

**Таблица 25.** Влияние соотношения метанола и ацетонитрила в подвижной фазе на разделение энантиомеров  $\beta$ -блокаторов на сорбенте силикагель/эремومیцин-ванкомицин. Подвижная фаза: MeOH/ACN : TEAA (0.1 %, pH 4.5), (95 : 5) об. %, скорость потока 1 мл/мин. Концентрация растворов – 0.3 мг/мл.

Вещество	Объемная доля метанола, %	$k'$	$R_s$	$\alpha$
Метопролол	10	4.68	0.74	1.12
	15	3.59	0.71	1.12
	20	3.08	0.65	1.12
Пиндолол	10	5.43	0.62	1.09
	15	4.04	0.59	1.11
	20	3.33	0.53	1.12
Альпренолол	10	3.71	0.60	1.13
	15	2.97	0.57	1.10
	20	2.66	0.62	1.11
Окспренолол	10	3.88	0.65	1.11
	15	3.06	0.63	1.10
	20	2.61	0.64	1.11
Лабетолол	10	6.61	1.10	1.32
	15	4.89	0.64	1.22
	20	4.84	0.68	1.20
Атенолол	10	12.18	0.71	1.28
	15	9.19	0.32	1.08
	20	7.56	0.26	1.10

$k'$  – фактор удерживания первого элюируемого энантиомера

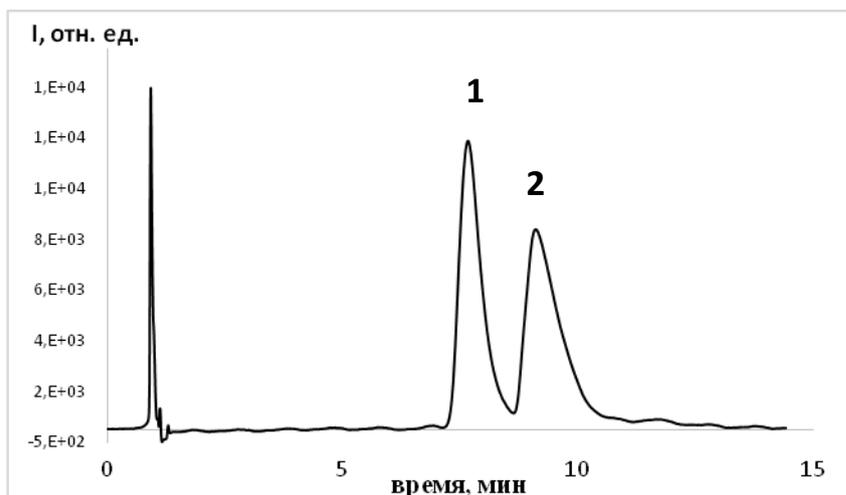
Уменьшение удерживания блокаторов на сорбенте наблюдается и при увеличении объемной доли буферного раствора в подвижной фазе (табл. 26), энантиоселективность при этом уменьшается, а лучшее разрешение пиков энантиомеров в зависимости от структуры блокаторов получено при различной объемной доле триэтиламинацетатного буферного раствора.

**Таблица 26.** Влияние содержания триэтиламинацетатного буферного раствора (ТЕАА) в подвижной фазе на разделение энантиомеров  $\beta$ -блокаторов на сорбенте силикагель/эремомицин-ванкомицин. Подвижная фаза: MeOH/ACN (20/80) : ТЕАА (0.1 %, рН 4.5), скорость потока 1 мл/мин.

Вещество	Объемная доля ТЕАА, %	$k'$	$R_s$	$\alpha$
Метопролол	1	7.71	0.84	1.19
	2	6.83	1.29	1.21
	3	5.06	0.93	1.16
	5	3.08	0.65	1.12
Пиндолол	1	9.71	1.14	1.26
	2	8.17	0.61	1.14
	3	6.12	0.91	1.15
	5	3.33	0.53	1.12
Альпренолол	1	5.41	1.51	1.31
	2	4.40	1.44	1.32
	3	3.87	1.46	1.28
	5	2.66	0.62	1.11
Окспренолол	1	5.55	0.84	1.10
	2	5.43	0.96	1.16
	3	3.87	1.53	1.25
	5	2.61	0.64	1.11
Лабетолол	1	10.94	0.91	1.39
	2	10.29	0.48	1.20
	3	8.72	0.44	1.17
	5	4.94	0.68	1.20
Атенолол	1	21.13	0.52	1.16
	2	18.21	0.49	1.19
	3	12.19	0.57	1.39
	5	7.56	0.26	1.10

$k'$  - фактор удерживания первого элюируемого энантиомера

Хроматограмма разделения энантиомеров метопролола на синтезированном сорбенте при составе подвижной фазы: MeOH/ACN (20/80) : ТЕАА (0.1 %, рН 4.5), (98 : 2) представлена на рис. 39.



**Рис. 39.** Хроматограмма энантимеров метопролола (1,2) ( $c=0.3$  мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомидин-ванкомицин. Подвижная фаза: MeOH/ACN (20/80) : TEAA (0.1 %, pH 4.5), (98 : 2), 1 мл/мин, 280 нм.

При увеличении концентрации триэтиламинацетатного буферного раствора подвижной фазы с 0.01 до 0.20 об. % факторы удерживания  $\beta$ -блокаторов уменьшаются (табл. 27).

**Таблица 27.** Влияние концентрации триэтиламинацетатного буферного раствора (TEAA) в подвижной фазе на разделение энантимеров  $\beta$ -блокаторов ( $c=0.3$  мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомидин-ванкомицин. Подвижная фаза: MeOH/ACN (20/80) : TEAA (pH 4.5), (95 : 5) об. %, скорость потока 1 мл/мин.

Вещество	Концентрация раствора TEAA, %	$k'$	$R_s$	$\alpha$
Метопролол	0.010	3.18	0.46	1.21
	0.025	2.68	0.59	1.17
	0.050	3.22	0.79	1.13
	0.100	3.08	0.65	1.12
	0.200	2.41	0.67	1.13
Пиндолол	0.010	4.03	0.49	1.15
	0.025	3.59	0.59	1.11
	0.050	3.79	0.65	1.12
	0.100	3.33	0.53	1.12
	0.200	2.65	0.41	1.10
Альпренолол	0.010	2.73	0.41	1.12
	0.025	2.50	0.33	1.11
	0.050	2.70	0.45	1.10
	0.100	2.66	0.62	1.11
	0.200	2.19	0.59	1.12
Окспренолол	0.010	2.73	0.39	1.13
	0.025	2.37	0.56	1.15
	0.050	2.62	0.61	1.11
	0.100	2.61	0.64	1.11
	0.200	2.04	0.56	1.12

Продолжение табл. 27				
Лабетолол	0.010	4.07	0.66	1.23
	0.025	3.99	0.80	1.29
	0.050	4.29	0.66	1.22
	0.100	4.84	0.68	1.20
Атенолол	0.010	7.17	0.50	1.22
	0.025	7.41	0.28	1.08
	0.050	7.67	0.31	1.09
	0.100	7.56	0.26	1.10
	0.200	6.34	0.12	1.01

$k'$  - фактор удерживания первого элюируемого энантиомера

Селективность разделения также уменьшается при увеличении концентрации буферного раствора до 0.1 об. %, а при дальнейшем увеличении концентрации не изменяется. Лучшее разрешение пиков энантиомеров  $\beta$ -блокаторов получено для концентрации буферного раствора 0.05 – 0.10 об. %. Таким образом, на энантиоселективность влияет содержание триэтиламинацетата в подвижной фазе. Вероятно, основную роль в энантиораспознавании играют электростатические взаимодействия между карбоксильными группами антибиотиков и протонированными атомами азота в структуре  $\beta$ -блокаторов. Ион триэтиламмония вступает в конкурирующие взаимодействия с карбоксильными группами селектора и влияет на энантиоселективность.

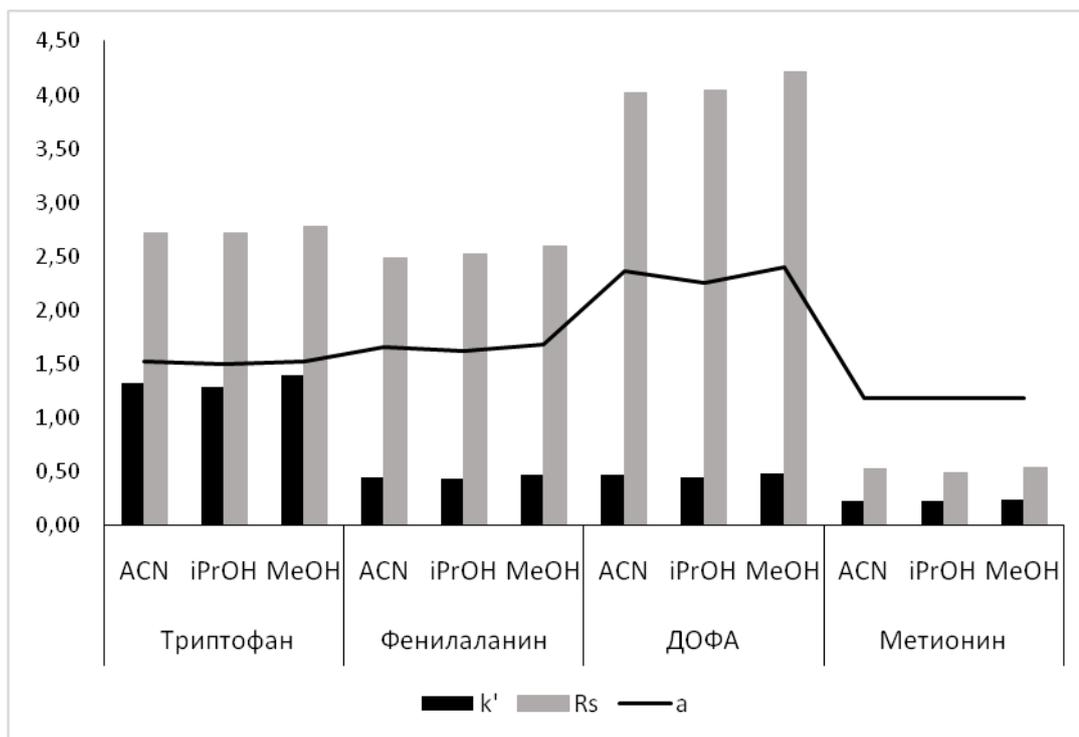
Сравнение данных по разделению энантиомеров  $\beta$ -блокаторов на синтезированном сорбенте с двумя антибиотиками эремомицином и ванкомицином с данными, полученными на коммерческой колонке Chirobiotic V (длина 25 см) только с ванкомицином [150, табл. 1 – 3], показывает, что для разделения энантиомеров и в том, и в другом случае в качестве подвижной фазы возможно использование смесей органических растворителей с триэтиламинацетатным буферным раствором. Однако использование чистого метанола в качестве органического модификатора подвижной фазы на колонке с двумя антибиотиками, в отличие от колонки Chirobiotic V, невозможно из-за отсутствия удерживания блокаторов в таких условиях. Это, вероятнее всего, связано с меньшим количеством ванкомицина на сорбенте с двумя селекторами по сравнению с коммерческой колонкой, а также с меньшей ее длиной. Наиболее близкой по составу к наиболее удачной фазе для разделения энантиомеров на смешанном сорбенте (MeOH/ACN (20/80) : ТЕАА (0.1 %, рН 4.5), (97 : 3) об. %) на коммерческой колонке оказалась подвижная фаза состава: MeOH/ТЕАА (0.1 %,

pH 5), 90/10. Сравнение хроматографических параметров для двух колонок в таких условиях свидетельствует о меньших значениях фактора удерживания аналитов для синтезированного сорбента, что уменьшает длительность анализа на сорбенте с двумя антибиотиками. Селективность и разрешение пиков при использовании в качестве подвижной фазы смеси органического модификатора и буферного раствора на синтезированном сорбенте выше, чем на сорбенте с ванкомицином. Это делает сорбент с двумя хиральными селекторами более перспективным для разделения энантиомеров  $\beta$ -блокаторов в этих условиях. Механизм разделения блокаторов на колонке со смешанным селектором имеет сложный характер, сочетающий гидрофобные, гидрофильные и электростатические взаимодействия, что характерно для гидрофильной хроматографии. В полярно-органическом режиме хроматографии разделение энантиомеров  $\beta$ -блокаторов возможно лишь на коммерческой колонке Chirobiotic V [150, табл. 4], при этом селективность разделения энантиомеров близка к энантиоселективности исследованного нами смешанного селектора. На колонке Chirobiotic V, благодаря большему размеру колонки и ее эффективности, разрешение пиков энантиомеров выше, однако время анализа больше в 3 – 4 раза.

#### **6.1.2. Разделение энантиомеров аминокислот на смешанном сорбенте — силикагель/эремомидин-ванкомицин**

Элюирование аминокислот проводили смесью органических модификаторов (ацетонитрил, метанол, изопропанол) и растворов уксусной кислоты или дигидрофосфата калия. Объемную долю органического модификатора варьировали от 0.5 до 10 об. % при использовании дигидрофосфата калия в качестве буферного раствора и от 1 до 20 об. % при использовании раствора уксусной кислоты.

На примере подвижной фазы состава органический модификатор/раствор уксусной кислоты 3/97 об. % установлено, что природа органического модификатора мало влияет на удерживание веществ на сорбенте, селективность и разрешение пиков энантиомеров (рис. 40). Это говорит о незначительной роли природы органического модификатора в энантиораспознавании аминокислот. В дальнейших исследованиях в качестве органической составляющей подвижной фазы использовали ацетонитрил.



**Рис. 40.** Влияние природы органического модификатора на разделение энантиомеров аминокислот на сорбенте с эремомицином и ванкомицином. Подвижная фаза: органический модификатор/раствор уксусной кислоты (0.1 %), 3/97, 0.5 мл/мин.

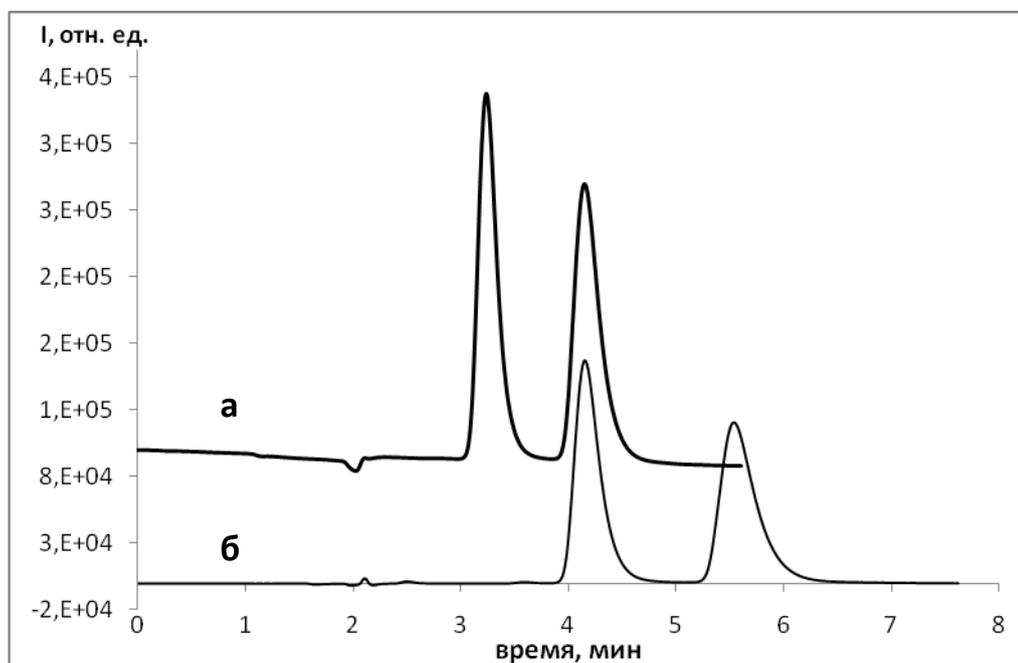
Увеличение концентрации раствора уксусной кислоты в подвижной фазе также незначительно уменьшает удерживание веществ на сорбенте, при этом разрешение пиков и селективность изменяются мало. Лучшее разделение энантиомеров получено при использовании раствора кислоты с концентрацией 0.10 об. % (табл. 28).

**Таблица 28.** Влияние концентрации уксусной кислоты в подвижной фазе на разделение энантиомеров аминокислот ( $c=1$  мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомицин-ванкомицин. Подвижная фаза: АСN/раствор уксусной кислоты, 3/97, скорость потока 0.5 мл/мин.

Вещество	Конц. раствора уксусной кислоты, об. %	$k'$	$R_s$	$\alpha$
Триптофан	0.05	1.26	2.65	1.48
	0.10	1.32	2.72	1.52
	0.20	1.17	2.65	1.49
Фенилаланин	0.05	0.45	2.40	1.57
	0.10	0.45	2.49	1.66
	0.20	0.41	2.53	1.56
ДОФА	0.05	0.47	3.83	2.22
	0.10	0.47	4.02	2.37
	0.20	0.42	3.81	2.16
Метионин	0.05	0.25	0.50	1.19
	0.10	0.23	0.53	1.19
	0.20	0.22	0.47	1.19

$k'$  - фактор удерживания первого элюируемого энантиомера

При замене в подвижной фазе уксусной кислоты (рН 3.5) на раствор дигидрофосфата калия (рН 4.7) удерживание аминокислот, коэффициент селективности и разрешение пиков энантиомеров растут (рис. 41, табл. 29).



**Рис. 41.** Хроматограмма энантиомеров триптофана ( $c=1$  мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомицин-ванкомицин. Подвижная фаза: а) АСN/УК (0.1 об. %, рН 3.5), 10/90, 0.5 мл/мин, 254 нм; б) АСN/КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (50 мМ, рН 4.7), 10/90, 0.5 мл/мин, 254 нм.

**Таблица 29.** Влияние концентрации органического модификатора в подвижной фазе на разделение энантиомеров аминокислот (с=1 мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомоцин-ванкомицин. Скорость потока подвижной фазы 0.5 мл/мин.

Вещество	Подвижная фаза							
	АСN : УК (0.1 %, рН 3.5)				АСN : КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (50 мМ, рН 4.7)			
	Объемная доля АСN, об. %	k'	R <sub>s</sub>	α	Объемная доля АСN, об. %	k'	R <sub>s</sub>	α
Триптофан	10	1.02	2.33	1.48	20	1.04	2.02	1.51
	5	1.17	2.42	1.47				
	3	1.32	2.72	1.52				
	1	1.36	2.68	1.52				
	0.5	1.38	2.64	1.51				
Фенилаланин	10	0.41	2.12	1.52	20	0.47	2.28	2.08
	5	0.43	2.33	1.58				
	3	0.45	2.49	1.66				
	1	0.46	2.44	1.63				
	0.5	0.48	2.41	1.62				
ДОФА	10	0.40	3.30	2.08	20	0.52	3.60	2.71
	5	0.44	3.71	2.21				
	3	0.47	4.02	2.37				
	1	0.47	4.01	2.34				
	0.5	0.47	4.02	2.35				
Метионин	10	0.22	0.44	1.01	20	0.43	0.69	1.39
	5	0.23	0.53	1.18				
	3	0.23	0.53	1.19				
	1	0.25	0.47	1.16				
	0.5	0.24	0.47	1.19				

k' - фактор удерживания первого элюируемого энантиомера

Из данных табл. 29 видно, что при одинаковом содержании ацетонитрила в подвижной фазе (10 об. %) разрешение пиков энантиомеров триптофана увеличивается в 1.1, фенилаланина - в 1.4, ДОФА - в 1.4 раза, а для метионина в 3.5 раза. Хроматографическое удерживание аминокислот и разделение их энантиомеров определяется совокупностью гидрофобных и ионообменных взаимодействий, а также вкладом водородных связей и диполь-дипольных взаимодействий. При увеличении рН происходит изменение ионного состояния, как аминокислот, так и селекторов. С ростом рН в интервале 3.5 – 6.0 усиливается диссоциация карбоксильных групп аминокислот и селектора, но еще слабо выражена депротонизация аминогрупп, что способствует электростатическим

взаимодействиям между ними. С другой стороны, образование цвиттер-ионов аминокислот уменьшает их заряд, что усиливает гидрофобные взаимодействия сорбатов с селекторами.

При увеличении доли ацетонитрила в подвижной фазе с 1 до 10 об. %, независимо от состава водного компонента, время удерживания аминокислот, коэффициент селективности и разрешение пиков энантиомеров уменьшаются. Причем, уменьшение этих параметров более заметно, если водный компонент подвижной фазы – раствор дигидрофосфата калия.

Полученные закономерности соответствуют режиму обращенно-фазовой хроматографии и подтверждают, что в удерживание и разделение энантиомеров сорбатов на силикагеле, модифицированном ванкомицином и эремомицином, вносят вклад и гидрофобные взаимодействия.

Сравнение разделения энантиомеров аминокислот на синтезированном сорбенте с двумя антибиотиками с данными, полученными на колонке с эремомицином Diaspher-Chirasel-E (длина 10 см) [151] показывает, что на смешанном хиральном селекторе возможно разделение энантиомеров аминокислот более сложной структуры. Хорошее разрешение пиков (больше 2) получено для триптофана и фенилаланина, имеющих в своем составе индольное (бензольное) кольцо, а также для метионина, содержащего атом серы. В отличие от колонки, заполненной силикагелем, модифицированным только эремомицином, не удастся разделить энантиомеры аминокислот, не содержащих ароматические фрагменты, такие как аланин, валин, серин, лизин, аргинин, норвалин. Они практически не удерживаются на колонке, это может быть связано с меньшим вкладом в удерживание и разделение энантиомеров на сорбенте с двумя хиральными селекторами электростатических взаимодействий. На синтезированном сорбенте получено разделение энантиомеров четырех аминокислот с высокими значениями разрешения, что дает возможность использовать колонку с таким сорбентом в аналитических целях.

Таким образом, исследование хроматографических свойств синтезированного сорбента показало, что смешанный селектор сочетает свойства двух использованных макроциклических антибиотиков. Использование такой хиральной неподвижной фазы позволяет провести на одной колонке селективное

разделение энантиомеров двух важных классов соединений, используемых в медицине,  $\beta$ -блокаторов и аминокислот с высокими значениями разрешения пиков за достаточно короткое время (не более 10 мин). При этом для блокаторов сохраняется тенденция уменьшения удерживания как при увеличении объемной доли метанола в смеси метанол/ацетонитрил в подвижной фазе, так и при увеличении объемной доли буферного раствора подвижной фазы и его концентрации. Для аминокислот выявлено, что природа органического модификатора мало влияет на удерживание веществ на сорбенте, селективность и разрешение пиков энантиомеров, однако увеличение объемной доли органического модификатора в подвижной фазе приводит к ухудшению разделения энантиомеров. Стабильность колонки со смешанным сорбентом с эремомицином и ванкомицином, определенная путем ввода в качестве аналита фенилаланина через каждые 5 месяцев работы, составила около 10 месяцев, времена удерживания фенилаланина отклонялись не более, чем на 10 %.

## **6.2. Смешанный хиральный сорбент — силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин**

Обнаружено, что бинарный сорбент с селекторами одного класса эремомицином и ванкомицином сочетает в себе способности к энантиораспознаванию сразу от двух антибиотиков, поэтому интересно синтезировать бинарный сорбент, который будет содержать в своей структуре хиральные селекторы разных классов и изучить его свойства. В работе синтезирован бинарный сорбент, содержащий антибиотик эремомицин и белок бычий сывороточный альбумин по *методике 3*.

### **6.2.1. Разделение энантиомеров профенов на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин**

Из литературных данных известно, что и эремомицин [29 – 32], и БСА [76 – 78, 83, 90] обладают способностью разделять энантиомеры профенов, поэтому необходимо проверить имеет ли бинарный сорбент большую энантиоселективность к данному классу соединений по сравнению с сорбентами с одним селектором, обладает ли он какими-либо дополнительными свойствами.

Исследование свойств синтезированного сорбента на примере класса профенов проводили в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. В качестве элюента

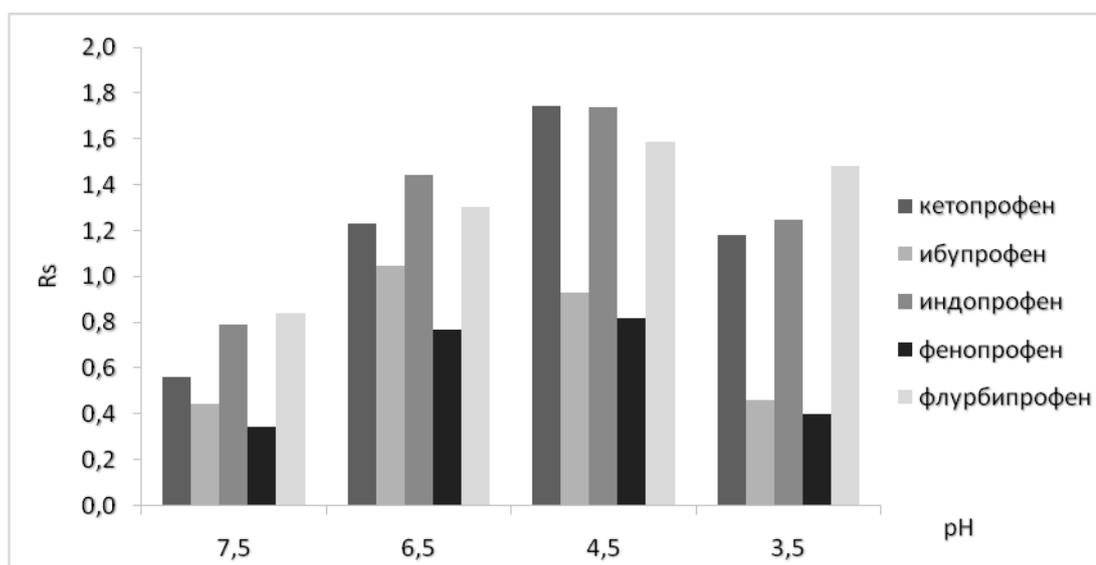
использовали смеси метанола с фосфатным буферным раствором. По режим хроматографии не использовали из-за возможности денатурации белка на поверхности сорбента в таких условиях. В процессе изучения хроматографических свойств сорбента варьировали рН, концентрацию фосфатного буферного раствора, объемную долю метанола в элюенте.

Увеличение концентрации фосфатного буферного раствора с 20 мМ до 100 мМ приводит к уменьшению удерживания профенов на сорбенте (табл. 30), что объясняется увеличением числа конкурирующих взаимодействий сорбента с фосфат-ионами подвижной фазы по сравнению с его взаимодействиями с аналитами. Большее удерживание веществ на сорбенте приводит к большему размыванию пиков, поэтому для дальнейших исследований использовали буферные растворы с концентрацией 100 мМ. Та же зависимость наблюдалась и у авторов работы [32] на сорбенте с эремомицином, однако в качестве буферного раствора использовали ацетат аммония.

**Таблица 30.** Хроматографические параметры энантиомеров профенов ( $c=0.5$  мг/мл) при различной концентрации буферного раствора, полученные на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА. Подвижная фаза: MeOH/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 4.5), 50/50, скорость потока 0.5 мл/мин.

Профен	0.02 М				0.04 М				0.10 М			
	$k_1'$	$k_2'$	$R_s$	$\alpha$	$k_1'$	$k_2'$	$R_s$	$\alpha$	$k_1'$	$k_2'$	$R_s$	$\alpha$
Кетопрофен	6.5	9.7	1.74	1.42	5.1	7.4	1.88	1.38	3.6	5.3	1.75	1.38
Ибупрофен	3.9	6.0	1.03	1.42	2.8	4.2	1.25	1.36	1.8	2.7	0.93	1.31
Индопрофен	8.6	14.1	2.14	1.58	4.7	7.5	1.71	1.50	4.3	6.7	1.74	1.46
Фенопрофен	7.1	9.1	0.79	1.24	4.9	6.2	1.08	1.22	3.2	4.0	0.82	1.19
Флурбипрофен	9.8	17.9	1.83	1.74	6.4	11.4	2.05	1.67	4.2	7.4	1.59	1.60

Зависимость селективности и разрешения пиков энантиомеров профенов от рН буферного раствора подвижной фазы для смешанного хирального сорбента с эремомицином и БСА носит тот же характер, что и для сорбента с эремомицином [32]. Эти зависимости представляют собой немонотонную функцию, имеющую максимум. Зависимость разрешения пиков от рН фосфатного буферного раствора элюента представлена на рис. 42.



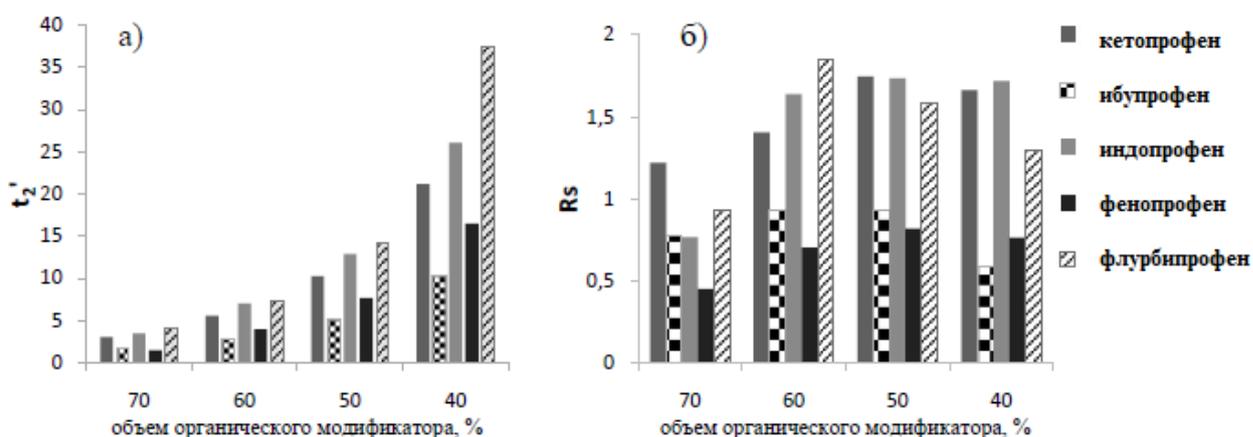
**Рис. 42.** Зависимость разрешения пиков профенов от рН буферного раствора подвижной фазы на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА. Подвижная фаза: MeOH/ФБ (0.10 M), 50/50, скорость потока: 0.5 мл/мин, 220 нм.

Уменьшение рН подвижной фазы от 7.5 до 4.5 приводит к увеличению времени удерживания и разрешения пиков энантиомеров профенов. Дальнейшее снижение рН до 3.5 приводит к резкому снижению времени удерживания, вероятно, из-за изменений в поверхностном заряде сорбента, так как помимо эремомицина на поверхности сорбента присутствует БСА. В отличие от работы [32], изменение разрешения пиков происходит в большей степени при увеличении рН подвижной фазы по сравнению с величиной, где получено лучшее разделение энантиомеров, чем при увеличении кислотности среды. Это можно объяснить тем, что в 0.10 M фосфатном буферном растворе изоэлектрическая точка эремомицина составляет 7.6 [53], а БСА 4.7 [152], то есть при рН раствора ниже 4.7 на поверхности сорбента присутствуют положительно заряженные антибиотик и белок, а при рН раствора от 4.7 до 7.6 эремомицин заряжен положительно, а белок отрицательно, суммарный заряд поверхности при  $\text{pH} < 4.7$  больше, чем при  $\text{pH} 4.7 - 7.6$ . Однако при низких рН среды ( $\text{pK}_a$  профенов находится в пределах от 4.4 до 5.8) диссоциация кислотной группы профенов подавлена, поэтому они адсорбируются в виде нейтральной молекулы. При более высоких значениях рН увеличивается доля диссоциированных молекул профенов, которые взаимодействуют с сорбентом по ионообменному механизму, вклад такого взаимодействия в удерживание гораздо сильнее межмолекулярного, что приводит к увеличению удерживания аналитов на сорбенте. С другой стороны, с увеличением

основности среды, уменьшается доля протонированных групп эремомицина и БСА, тем самым, уменьшается и доля ион-ионных взаимодействий, что уменьшает удерживание профенов на колонке.

Таким образом, как и на сорбенте, содержащем только эремомицин, разделение оптических изомеров профенов на сорбенте с эремомицином и БСА следует осуществлять при значениях pH, близких к  $pK_a$  аналита. Для дальнейших исследований использовали фосфатный буферный раствор с pH 4.5.

Уменьшение доли органического модификатора в подвижной фазе приводит к заметному увеличению удерживания профенов (рис. 43, а), за счет этого увеличивается разрешение пиков энантиомеров (рис. 43, б), однако для подвижной фазы содержащей менее 50 об. % метанола характерно небольшое уменьшение разрешения пиков по сравнению с фазой, содержащей 50 об. %, что связано с увеличением длительности анализа и, таким образом, увеличением размывания пиков.



**Рис. 43.** Зависимость времени удерживания второго элюируемого энантиомера профена (а) и разрешения пиков (б) от объема органического модификатора в подвижной фазе на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА. Элюент: MeOH/ $KH_2PO_4$  (0.1 M, pH 4.5), скорость потока: 0.5 мл/мин.

Для большинства профенов наиболее оптимальной для разделения оказалось подвижная фаза с 50 – 60 об. % метанола.

Для выяснения доминирующего влияния одного из селекторов на смешанном сорбенте с антибиотиком и белком проведено разделение энантиомеров профенов в одинаковых условиях на сорбенте силикагель/эремомицин (методика 2, колонка 100\*4.6 мм) и сорбенте

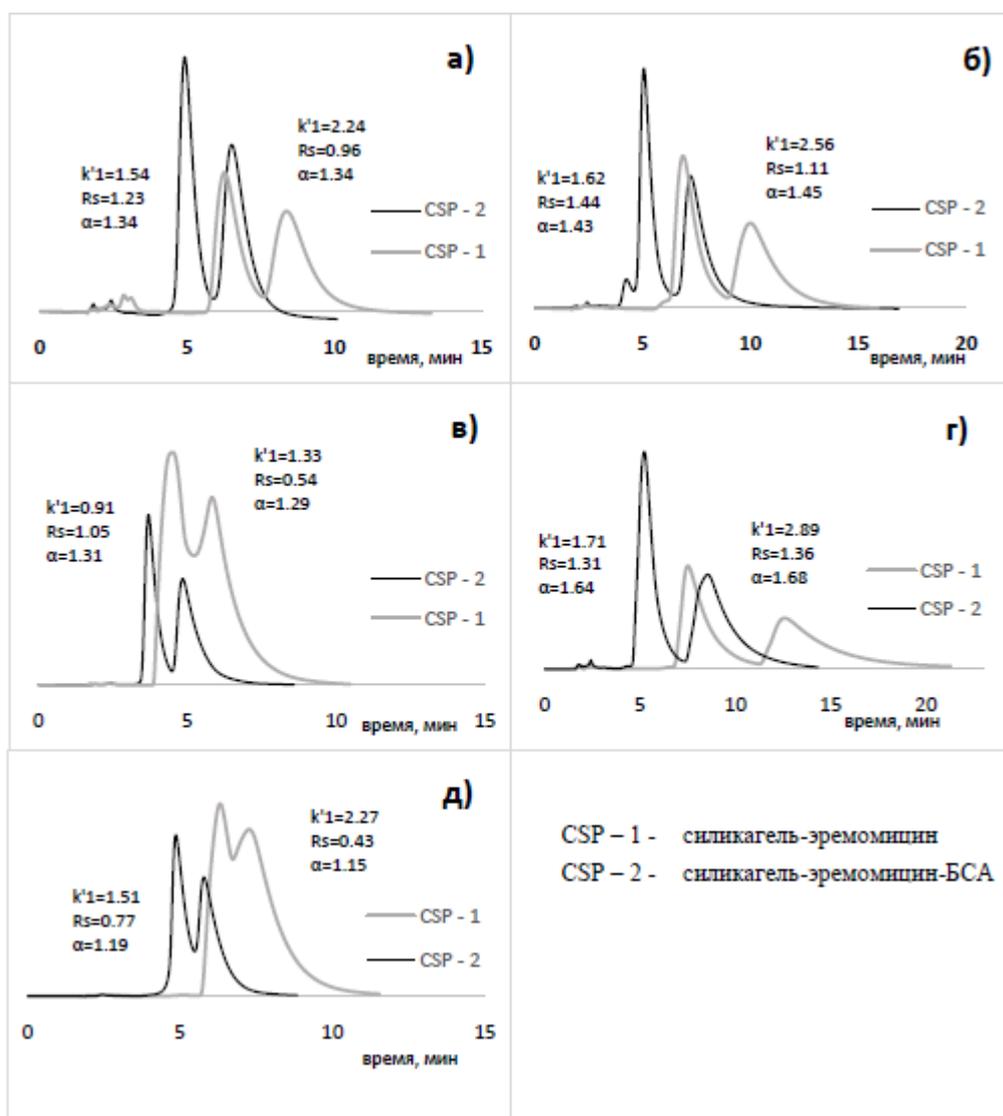
силикагель/эремомицин-БСА (методика 3, колонка 100\*4.6 мм). Анализ проведен в условиях: MeOH/ФБ (100 мМ, рН 6.5), 50/50 об. %, 0.5 мл/мин, 220 нм. Хроматографические параметры, полученные в эксперименте, отражены в табл. 31.

**Таблица 31.** Хроматографические параметры энантиоразделения профенов (с=0.5 мг/мл), полученные на сорбентах силикагель/эремомицин-БСА и силикагель/эремомицин. Подвижная фаза: MeOH/ФБ (100 мМ, рН 6.5), 50/50 об. %, 0.5 мл/мин, 220 нм.

Соединение	Силикагель/ эремомицин-БСА				Силикагель/ эремомицин			
	$k_1'$	$k_2'$	$R_s$	$\alpha$	$k_1'$	$k_2'$	$R_s$	$\alpha$
Кетопрофен	1.5	2.4	1.23	1.33	2.2	3.3	0.96	1.34
Ибупрофен	0.9	1.5	1.05	1.31	1.3	2.0	0.54	1.29
Индопрофен	1.6	2.7	1.44	1.43	2.6	4.2	1.11	1.45
Фенопрофен	1.5	2.0	0.77	1.19	2.3	2.8	0.43	1.15
Флурбипрофен	1.7	3.4	1.30	1.64	2.9	5.5	1.36	1.68

Хроматограммы рацемических смесей профенов, полученные в данных условиях, представлены на рис. 44.

Исходя из данных табл. 31 и рис. 44, наличие белка на поверхности смешанного сорбента, по сравнению с сорбентом только с эремомицином, приводит к уменьшению удерживания профенов. Это может быть связано с тем, что белок, находясь на поверхности силикагеля, закрывает часть протонированных амино-групп эремомицина, тем самым, уменьшая долю ион-ионных взаимодействий профена и антибиотика. В то же самое время разрешение пиков энантиомеров на смешанном сорбенте немного выше, а селективность практически не меняется. Величина разрешения зависит, главным образом, от двух факторов: селективности и эффективности колонки. Полученные хроматограммы свидетельствуют, что для колонок, заполненных в одинаковых условиях, пики энантиомеров уже и эффективность выше для колонки со смешанным сорбентом. Для колонки с эремомицином число теоретических тарелок достигает 2000 тт/м, а для смешанной колонки – 2500 тт/м. Стабильность колонки со смешанным сорбентом с эремомицином и БСА, определенная путем ввода в качестве анализа кетопрофена через каждые 5 месяцев работы, составила около 2 лет, времена удерживания кетопрофена отклонялись не более, чем на 10 %.



**Рис. 44.** Хроматограммы профенов ( $c=0.5$  мг/мл) (а - кетопрофен, б – индопрофен, в – ибупрофен, г – флурбипрофен, д – фенопрофен), полученные на сорбентах силикагель/эремомицин и силикагель/эремомицин-БСА. ПФ: МеОН/ФБ (100 мМ, рН 6.5), 50/50 об. %, 0.5 мл/мин, 220 нм.

### 6.2.2. Разделение энантиомеров бензоина на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин

Исходя из литературных данных [77 – 78, 84, 86, 90], бензоин – одно из самых популярных веществ, энантимеры которого делят на сорбентах с БСА, в то же время, возможность такого разделения на сорбентах с антибиотиком эремомицином в литературе не описана.

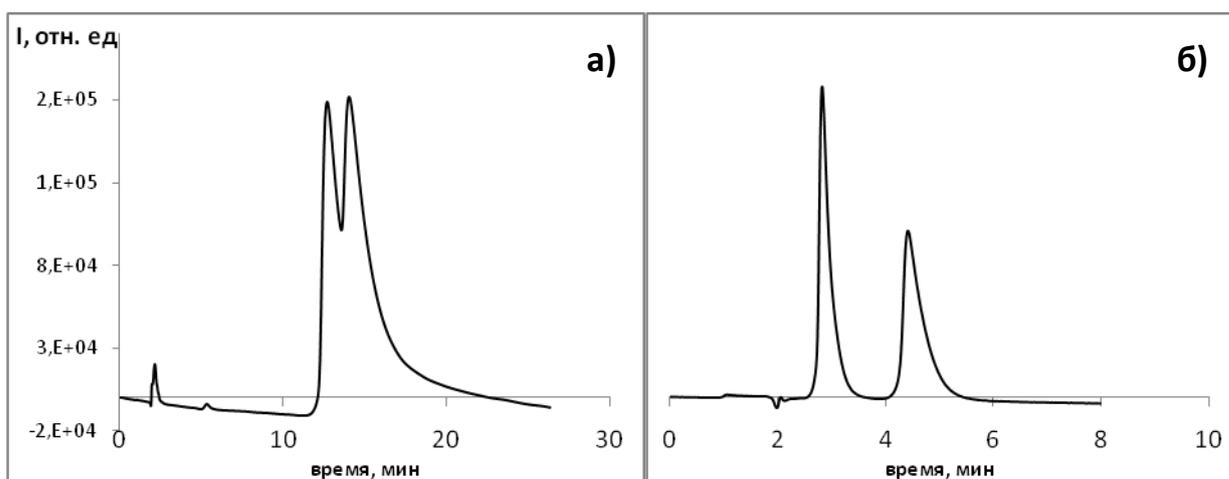
Для выявления поведения бензоина на смешанном сорбенте с эремомицином и БСА выбраны условия хроматографирования, характерные для разделения энантиомеров бензоина на сорбентах с БСА. В качестве элюента использовали

буферные растворы с рН 7 – 8 с добавками изопропанола (3 – 10 об. %). В процессе исследований выяснено, что использование фосфатного буферного раствора с более щелочным рН приводит к незначительному увеличению удерживания бензоина (около 8 %), однако сильно уменьшает разрешение пиков (около 30 %) (табл. 32).

**Таблица 32.** Хроматографические параметры энантимеров бензоина, полученные на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА. Подвижная фаза: iPrOH/буферный раствор (50 мМ), скорость потока 0.5 мл/мин.

Буферный раствор (рН, объемная доля)	$k'_1$	$k'_2$	$R_s$	$\alpha$
Фосфатный рН 7.2; 97 об. %	6.1	6.8	0.54	1.12
Фосфатный рН 8; 97 об. %	6.6	7.5	0.41	1.13
Фосфатный рН 8; 90 об. %	4.1	4.5	0.31	1.10
ТРИС рН 7.2; 97 об. %	0.6	1.5	3.28	2.57

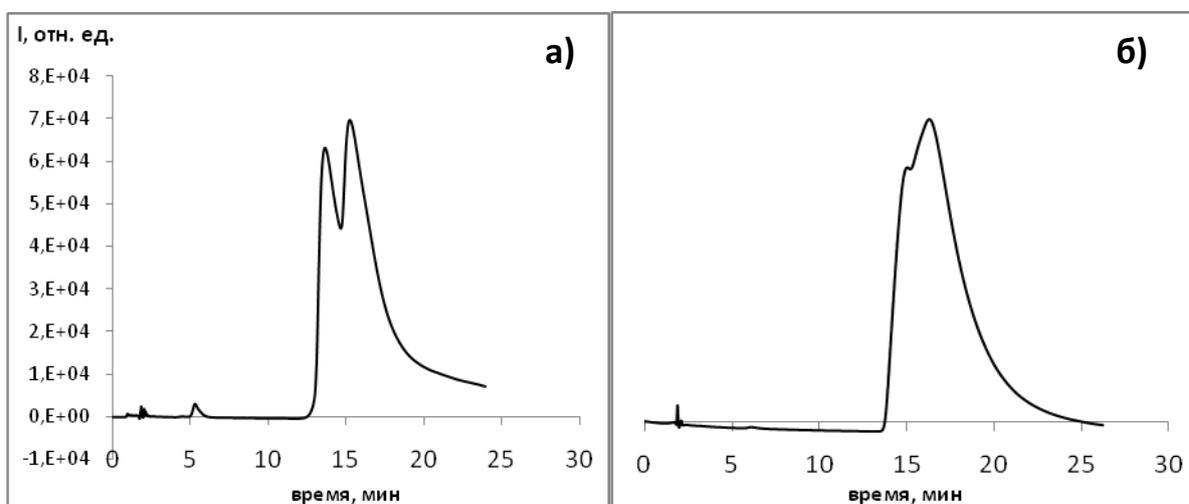
Из данных табл. 32 видно, что увеличение доли изопропанола в элюенте уменьшает удерживание бензоина и, тем самым, разрешение пиков. На разделение энантимеров наибольшее влияние оказывает природа буферного раствора элюента. Замена фосфатного буферного раствора на раствор ТРИС той же концентрации и рН кардинально изменяет удерживание энантимеров, разрешение пиков и селективность. Сравнительные хроматограммы энантимеров бензоина в условиях использования фосфатного буферного раствора и ТРИС представлены на рис. 45.



**Рис. 45.** Хроматограммы энантимеров бензоина ( $c=1$  мг/мл), полученные на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА. Подвижная фаза: а) iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 7.2), 3/97; б) iPrOH/ТРИС (50 мМ, рН 7.2), 3/97; 0.5 мл/мин, 254 нм.

Такая разница в разделении, вероятно, обусловлена большим объемом молекулы трис(гидроксиметил)-аминометана по сравнению с фосфат-ионом и наличием, помимо атомов кислорода, амино-группы, доступной к протонированию, а значит, ионы ТРИС обеспечивают большее конкурирующее взаимодействие с БСА, чем фосфат-ионы.

Сравнение смешанного сорбента (*методика 3*, колонка 100\*4.6 мм) с сорбентом только с эремомицином (*методика 2*, колонка 100\*4.6 мм) на примере бензоина проведено в условиях: iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 8), 3/97, 0.5 мл/мин, 254 нм. Полученные хроматограммы представлены на рис. 46.



**Рис. 46.** Хроматограммы бензоина ( $c=0.5$  мг/мл), полученные на сорбентах силикагель/эремомицин-БСА (а) и силикагель/эремомицин (б). Подвижная фаза: iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 8), 3/97 об. %, 0.5 мл/мин, 254 нм.

Из хроматограмм видно, что частичное разделение энантиомеров бензоина возможно только на смешанном сорбенте с эремомицином и БСА, что дает право предположить, что за разделение изомеров бензоина отвечает БСА.

### **6.2.3. Разделение энантиомеров производных аминокислот на смешанном сорбенте — силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин**

Разделение энантиомеров бензоил-, БОК-, КБЗ-производных аминокислот на сорбенте с эремомицином описано нами в Главе 5.1. На сорбентах с БСА из литературных данных [77, 83 – 84, 92 – 93] известна возможность разделения лишь бензоил-производных аминокислот. Стоит отметить, что состав элюента для каждого из сорбентов близок, подвижная фаза представляет собой смеси

фосфатного буферного раствора (рН 7 – 8) с небольшими объемами изопропанола или метанола.

Поведение бензоил-, БОК-, КБЗ-производных аминокислот на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-БСА сравнивали с их поведением на сорбенте силикагель/эремомицин. Аналиты элюировали ПФ: iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 8), объемная доля изопропанола составляла 3 и 10 % при скорости потока 0.5 мл/мин. Полученные данные представлены в табл. 33.

**Таблица 33.** Хроматографические параметры производных аминокислот (с=0.5 мг/мл), полученные на сорбентах силикагель/эремомицин и силикагель/эремомицин-БСА Подвижная фаза: iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 8), 0.5 мл/мин.

Вещество	iPr OH %	Силикагель/ эремомицин				Силикагель/ эремомицин-БСА			
		k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	R <sub>s</sub>	α	k' <sub>1</sub>	k' <sub>2</sub>	R <sub>s</sub>	α
Бензоил-метионин	3	2.0	3.8	2.12	1.91	1.9	3.4	1.64	1.81
Бензоил-валин		1.4	2.4	1.56	1.80	1.3	2.2	1.22	1.72
КБЗ-лейцин	10	2.5	10.5	2.81	4.28	2.1	8.7	3.03	4.13
КБЗ-аспарагиновая кислота		1.1	1.4	0.12	1.23	0.8	1.0	0.12	1.28
КБЗ-аспарагин		1.6	4.4	2.63	2.67	1.4	3.8	2.41	2.66
КБЗ-норлейцин		2.5	10.1	3.00	3.96	2.2	8.5	3.05	3.83
КБЗ-аланин		1.7	7.1	3.81	4.12	1.4	5.9	3.46	4.14
КБЗ-валин		1.6	6.3	2.62	3.86	1.4	5.2	1.96	3.75
БОК-триптофан		7.0	20.3	2.24	2.92	8.0	20.1	1.76	2.50
БОК-серин		1.2	1.9	0.77	1.55	1.1	1.7	0.73	1.55

Практически для всех изученных производных аминокислот при переходе от колонки с эремомицином к смешанной колонке происходит уменьшение удерживания энантиомеров веществ, как и при сравнительном элюировании профенов (п. 6.2.1), однако, в отличие от профенов, разрешение пиков и селективность разделения энантиомеров производных аминокислот на смешанной колонке ниже. Можно предположить, что основную роль в разделении

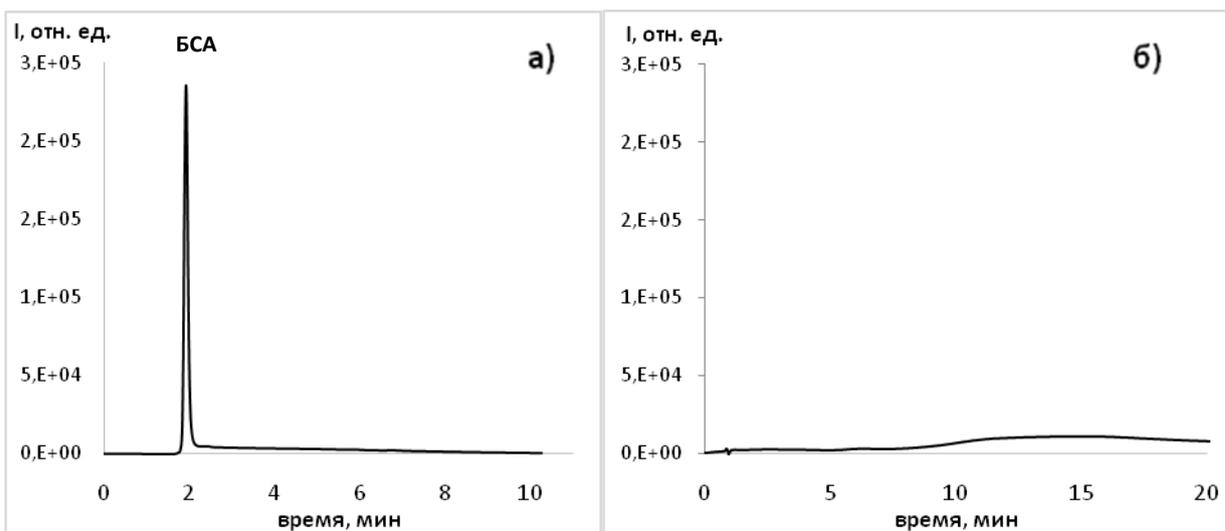
производных аминокислот играет хиральный селектор эремомицин, а БСА, находясь на поверхности, закрывает часть его центров распознавания.

Таким образом, исходя из тех фактов, что разделение энантиомеров профенов и производных аминокислот на бинарном хиральном сорбенте с эремомицином и БСА возможно в тех же условиях, что и на сорбенте силикагель/эремомицин, характер полученных зависимостей хроматографических параметров от состава подвижной фазы для бинарного и простого сорбента схож, наличие белка на поверхности смешанного сорбента в случае профенов увеличивает разрешение пиков, а в случае производных аминокислот уменьшает, причем и для профенов, и для производных аминокислот наблюдается уменьшение удерживания, все это дает нам право полагать, что ключевую роль на смешанном сорбенте в качестве селектора играет эремомицин. БСА, как селектор на бинарном сорбенте, позволяет разделять энантиомеры таких веществ, как бензоин, тогда как на сорбенте с эремомицином такое энантиоразделение невозможно. БСА несет меньшую часть «центров распознавания» всего сорбента, возможно, это связано с тем, что, в отличие, от эремомицина, белок закреплен на поверхности сорбента методом физической адсорбции и его содержание меньше. Однако БСА играет важную роль при определении энантиомеров в биологических жидкостях, что обсуждается в следующей главе.

#### ***6.2.4. Разделение энантиомеров профенов на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин в присутствии белка в анализируемом растворе***

Размер молекул БСА превышает размер пор силикагеля, что делает их недоступными для проникновения белка. БСА покрывает поверхность смешанного хирального сорбента, тем самым защищая его поры от проникновения других крупных молекул. Можно предположить, что большие молекулы (например, другие белки), находящиеся в анализируемом растворе, не будут мешать определению энантиомеров при использовании такого сорбента.

Проверку этого предположения провели, используя раствор БСА в качестве аналита. Хроматограммы, полученные на колонке, заполненной силикагелем, модифицированным только эремомицином (б) или смешанным сорбентом (а), представлены на рис. 47.



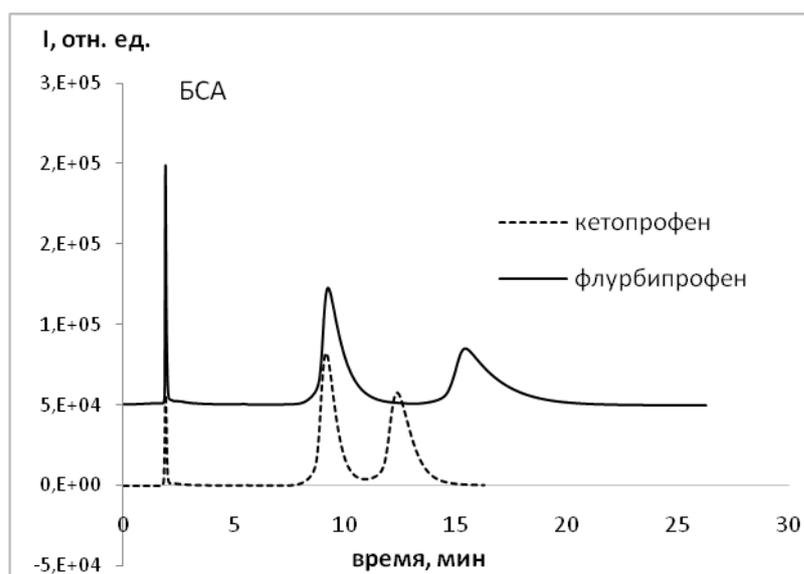
**Рис. 47.** Хроматограммы раствора БСА ( $c=5$  мг/мл) на сорбенте а) силикагель/эритромицин-БСА; б) силикагель/эритромицин. Подвижная фаза:  $\text{MeOH}/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (40 мМ, рН 4.5), 50/50, 0.5 мл/мин, 280 нм.

БСА в качестве анализата не удерживается на смешанном хиральном сорбенте силикагель/эритромицин-БСА и выходит с мертвым временем колонки. На хроматограмме, полученной на колонке, заполненной сорбентом силикагель/эритромицин, пик БСА отсутствует, т.к. белок необратимо сорбируется на таком сорбенте, тем самым, модифицируя его и делая непригодным для дальнейшего использования.

Такое преимущество смешанного сорбента по сравнению с сорбентом с эритромицином использовали для проверки гипотезы о возможности разделения энантиомеров веществ в присутствии белка в анализируемом растворе. К исследуемым растворам профенов добавляли раствор БСА в воде, их хроматограммы представлены на рис. 48.

Наличие на хроматограммах пика БСА, выходящего с мертвым временем колонки, не мешает разделению энантиомеров профенов на смешанном сорбенте.

Существование в природе огромного множества белков различной молекулярной массы требует проверить, удерживаются ли другие белки, помимо БСА, на сорбенте силикагель/эритромицин-БСА. Для этого в колонку со смешанным хиральным сорбентом в качестве анализатов вводили растворы маркерных белков различной молекулярной массы с различной концентрацией (табл. 34) и растворы, содержащие кетопрофен и маркерный белок.

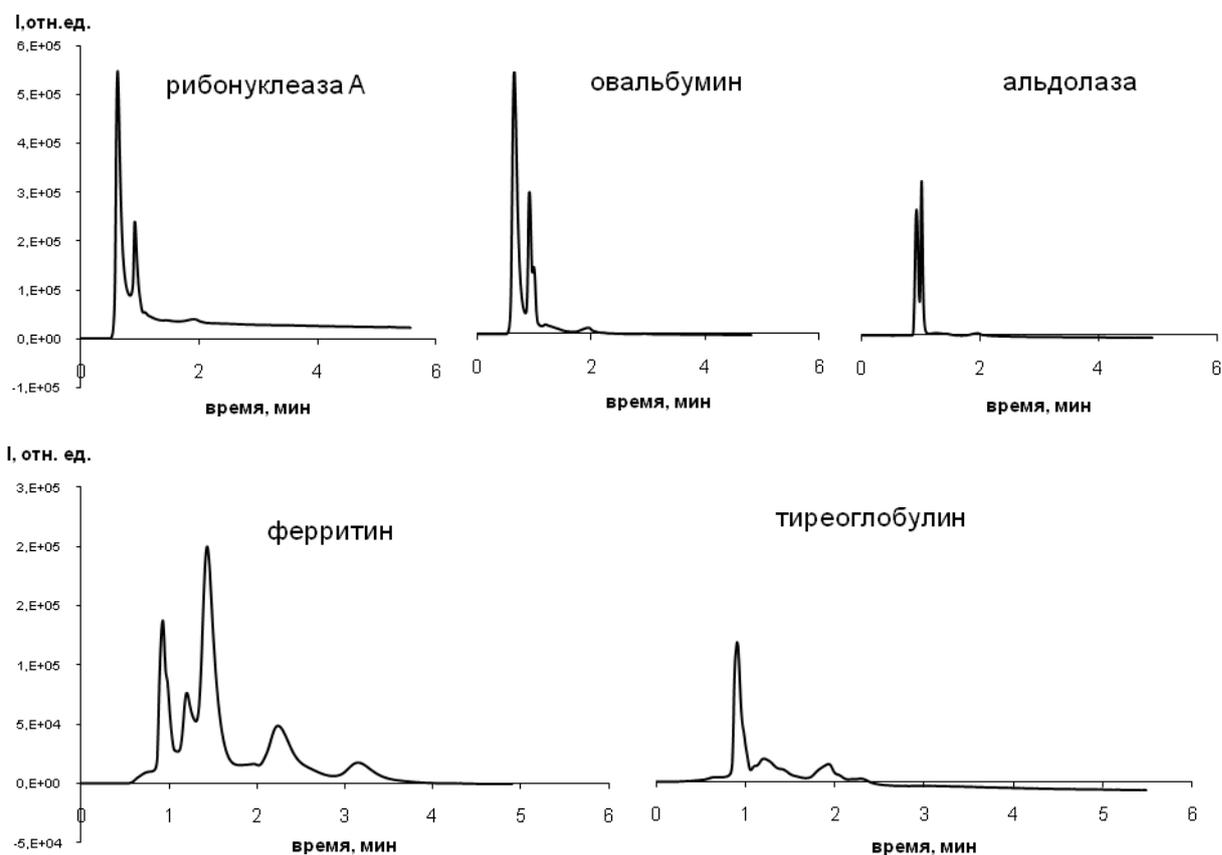


**Рис. 48.** Хроматограммы кетопрофена и флурбипрофена в присутствии БСА в исследуемом растворе. Сорбент: силикагель/эремоницин-БСА. Подвижная фаза: MeOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (40 мМ, рН 4.5), 60/40, 0.5 мл/мин, 280 нм. Концентрация растворов профенов – 1 мг/мл.

**Таблица 34.** Белки, использованные в качестве аналитов.

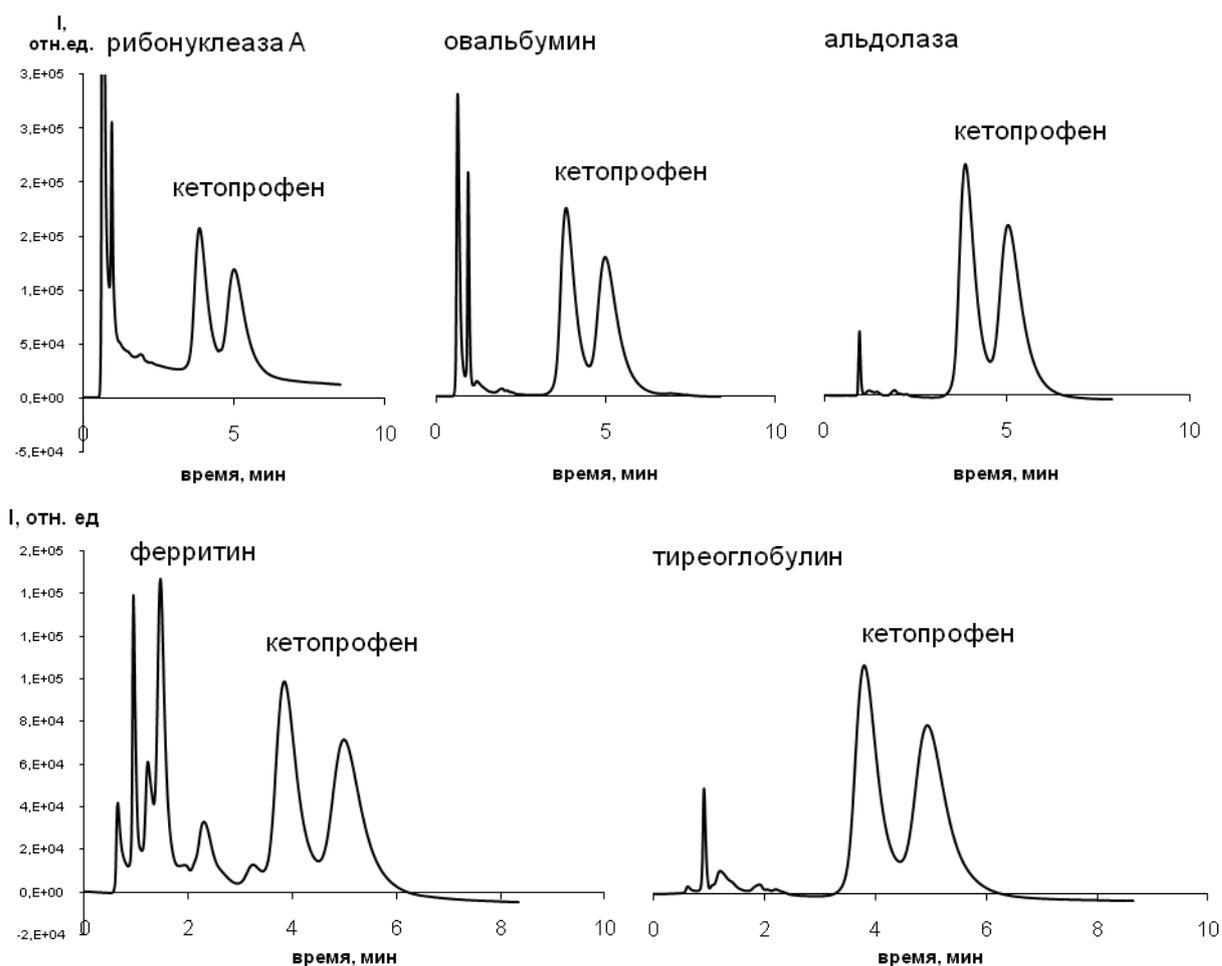
Белок	Молекулярная масса, кДа	Концентрация, мг/мл
Рибонуклеаза А	13.7	2.0
Овальбумин	43	2.8
Альдолаза	158	3.2
Ферритин	440	6.7
Тиреоглобулин	669	1.9

Все используемые белки слабо удерживаются на колонке (рис. 49), заполненной бинарным сорбентом, и выходят близко к мертвому времени. В зависимости от структуры и ионного состояния белка количество пиков на хроматограмме различно, однако время выхода каждого из них остается вблизи времени выхода неудерживаемых компонентов.



**Рис. 49.** Хроматограммы белков, полученные на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-БСА. Подвижная фаза: MeOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100 мМ, рН 4.5), 50/50, 1 мл/мин, 280 нм.

Полученные хроматограммы растворов кетопрофена ( $c=0.5$  мг/мл), содержащих каждый из маркерных белков (рис. 50), позволяют говорить о возможности разделения энантиомеров кетопрофена на смешанном хиральном сорбенте с эремомицином и БСА в присутствии маркерных белков с диапазоном молекулярных масс 13.7 — 669 кДа.



**Рис. 50.** Хроматограммы растворов кетопрофена, содержащих маркерные белки. Сорбент: силикагель/эремомидин-БСА. Подвижная фаза: MeOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100 мМ, рН 4.5), 50/50, 1 мл/мин, 210 нм.

Полученные результаты позволили перейти к следующему этапу работы со смешанным сорбентом – проверке возможности разделения и определения энантиомеров профенов на таком сорбенте непосредственно в биологических жидкостях.

### **Применение смешанного хирального сорбента — силикагель/эремомидин-БСА для определения энантиомеров веществ в моче**

Методы определения химических соединений в биоматериалах должны отличаться высокой селективностью, низким пределом обнаружения и высокой информативностью и надежностью получаемых результатов при идентификации и количественном определении химических соединений различных классов.

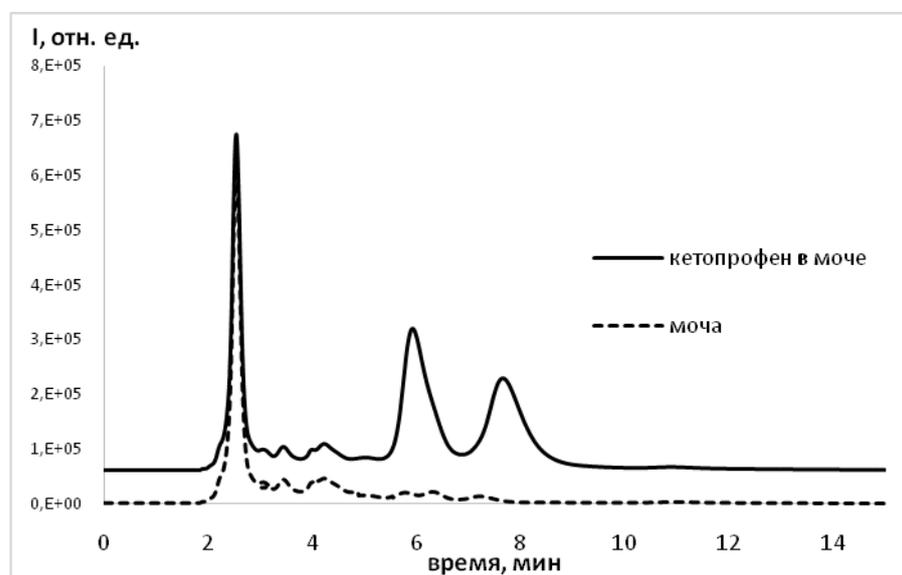
Особое значение в анализе биологических сред имеет пробоподготовка, в процессе которой анализируемое соединение максимально изолируется от сложного состава матрицы биологической среды. Специальные приемы

пробоподготовки основаны на различных способах концентрирования анализируемых соединений. Используют такие общепринятые способы концентрирования, как отгонка, дистилляция, экстракция в системе жидкость-жидкость, сорбция, дериватизация, твердофазная экстракция и т. д. [153].

В целом, анализ биологических сред требует специальной сложной и зачастую довольно длительной пробоподготовки образцов, что неудобно при рутинном контроле и проведении скрининга.

Результаты определения энантимеров кетопрофена в присутствии маркерных белков различной молекулярной массы на смешанном хиральном сорбенте с эремомицином и БСА дают право предполагать возможность беспрепятственного определения кетопрофена и в биологических жидкостях, в частности, в наиболее простой – моче.

Для решения этой задачи приготовили растворы кетопрофена различной концентрации в смеси моча : вода (1:4). Типичная хроматограмма раствора кетопрофена в смеси моча : вода представлена на рис. 51. Эффективность составила 2300 тт/м и 2000 тт/м для первого и второго изомеров кетопрофена соответственно.



**Рис. 51.** Хроматограммы мочи и раствора кетопрофена в моче ( $c=0.4$  мг/мл), полученные на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА. Подвижная фаза:  $\text{MeOH}/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 мМ, pH 4.5), 60/40, 0.5 мл/мин, 254 нм.

Построена градуировочная зависимость площади пиков энантимеров кетопрофена от его содержания в моче. Предел детектирования, рассчитанный по

соотношению сигнал/шум 3/1, составил 0.0085 мг/мл, минимальная определяемая концентрация каждого из энантиомеров – 0.0142 мг/мл (табл. 35).

**Таблица 35.** Метрологические характеристики хроматографического определения изомеров кетопрофена в моче ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ) на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА.

Диапазон определяемого содержания одного из энантиомеров кетопрофена, мг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	$r$	$s_r$
0.0142-0.4165	$Y = (2.17 + 0.12) \cdot 10^6 \cdot x$	0.990	0.02

Для проверки правильности методики провели определение кетопрофена в модельном растворе мочи (введено 0.067 мг/мл), методом градуировочного графика найдено  $(0.07 \pm 0.01)$  мг/мл ( $n=3$ ,  $P=0.95$ ) кетопрофена.

Таким образом, сорбент силикагель/эремомицин-БСА представляет собой смешанный сорбент, где более заметно выражены хиральные свойства эремомицина. Это подтверждается характером зависимостей хроматографических параметров от состава подвижной фазы, они аналогичны сорбентам с эремомицином. Наличие БСА (его на поверхности меньше, чем эремомицина) на смешанном сорбенте мало влияет на энантиоразделяющую способность сорбента. Основным преимуществом такого сорбента по сравнению с сорбентами с одним селектором является возможность разделения и определения энантиомеров веществ в присутствии белков в анализируемом растворе, в частности, в моче.

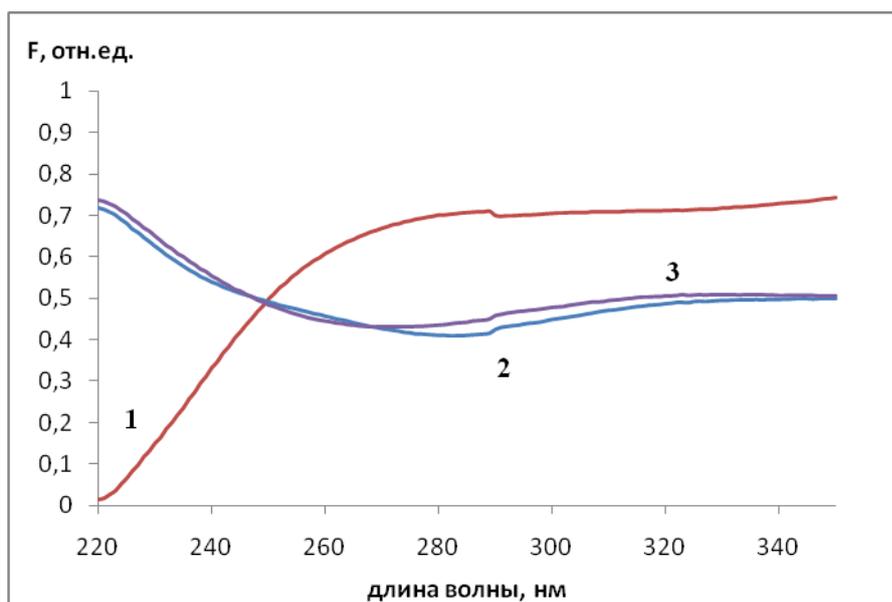
### 6.3. Синтез и исследование свойств сорбента силикагель/БСА

Для полного понимания, какой именно селектор и в каких случаях работает на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА, помимо сорбента только с эремомицином в работе синтезировали и сорбент силикагель/БСА (методика 7).

Для выбора наиболее подходящего способа синтеза модифицирование силикагеля белком проводили несколькими различными способами:

1. Пришивка БСА к эпоксиактивированному силикагелю в щелочной среде (в растворе гидроксида калия (рН 8.56) и в 0.1 М боратном буферном растворе в смеси с 0.2 М раствором хлорида натрия) аналогично способу синтеза сорбента силикагель/эремомицин с образованием связи  $-C(OH)-CH_2-NH-$ . Выявлено, что

данный способ не приводит к получению сорбента с большим количеством белка на поверхности, поскольку максимально возможное количество БСА, помещающееся на поверхности силикагеля (5 мкм, 100 Å, 300 м<sup>2</sup>/г) составляет всего 7.5 мг, а возможность образования полислоев белка при таком способе отсутствует. Спектры диффузного отражения (рис. 52) таких сорбентов не имели характерного максимума в районе 280 нм и совпадали со спектрами эпоксиактивированного силикагеля. Метод РФА ПВО не позволил обнаружить БСА на таких сорбентах.



**Рис. 52.** Спектры ДО сорбентов: 1 – силикагель, 2 – эпокси-силикагель, 3 – эпокси-силикагель-БСА.

2. Закрепление БСА на поверхности аминосилкагеля через спейсер – глутаровый альдегид. Сначала получали аминосилкагель с закрепленным глутаровым альдегидом, для этого к аминосилкагелю добавляли глутаровый альдегид в 0.1 М фосфатном буферном растворе с рН 7 и перемешивали 1 час при комнатной температуре. К полученному сорбенту добавляли раствор БСА в фосфатном буферном растворе, оставляли на час или двое суток при комнатной температуре [92]. Содержание БСА на сорбенте, выдержанном один час, полученное методом РФА ПВО, составило 4,8 мг/г SiO<sub>2</sub>, выдержанном двое суток – 9.5 мг/г SiO<sub>2</sub>. Такого содержания, как показали хроматографические исследования, недостаточно для разделения энантиомеров.

3. Физическая адсорбция белка на силикагеле и закреплении его глутаровым альдегидом [методика 7 и [77] позволила закрепить большее количество БСА на поверхности, этот сорбент обладал энантиоселективными свойствами.

Изучение энантиоселективности силикагеля, физически модифицированного БСА, проводили на примере бензоина, так как разделение энантиомеров этого соединения обычно используют для тестирования хиральных сорбентов с БСА. В качестве подвижной фазы использовали фосфатный буферный раствор с pH 7 – 8 с небольшими добавками органических модификаторов (изопропанол, метанол, ацетонитрил).

Исследовано влияние концентрации используемого фосфатного буферного раствора в элюенте (табл. 36) на удерживание энантиомеров.

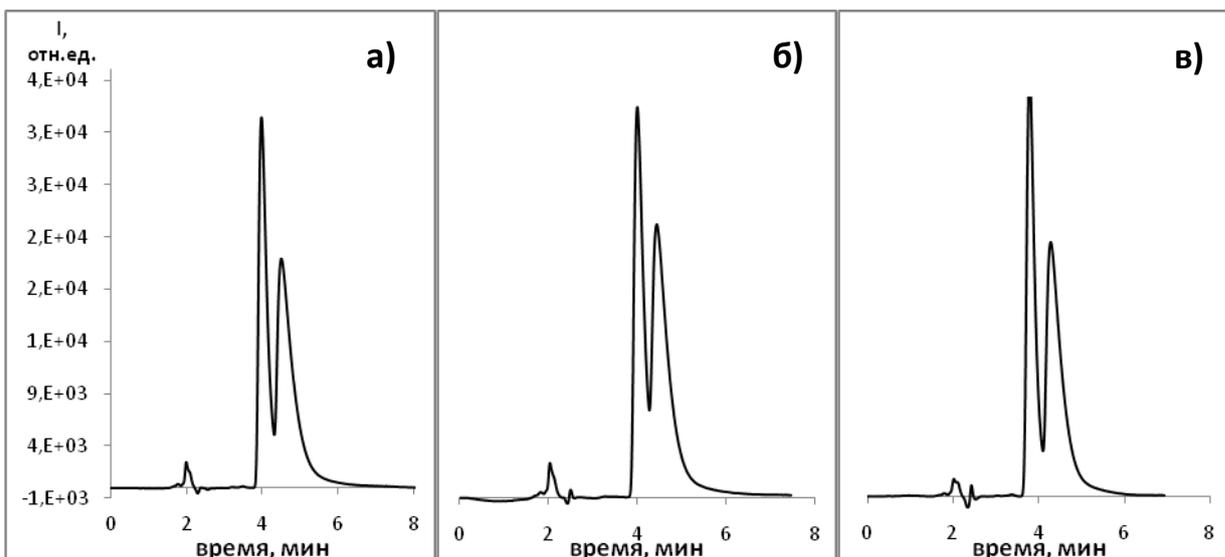
**Таблица 36.** Хроматографические параметры энантиомеров бензоина с использованием подвижных фаз различной концентрации фосфатного буферного раствора, полученные на сорбенте силикагель/БСА. ПФ: iPrOH/ФБ (pH 7), 1/99 об. %, скорость потока – 0.5 мл/мин, 247 нм.

Вещество	Концентрация ФБ, мМ	$t_1'$ , мин	$t_2'$ , мин	$R_s$	$\alpha$
Бензоин	50	5.4	6.5	0.7	1.2
	25	3.1	3.4	0.5	1.1

Уменьшение концентрации используемого фосфатного буферного раствора с 50 до 25 мМ приводит к значительному уменьшению удерживания вещества на сорбенте и, как следствие, ухудшению разрешения пиков энантиомеров.

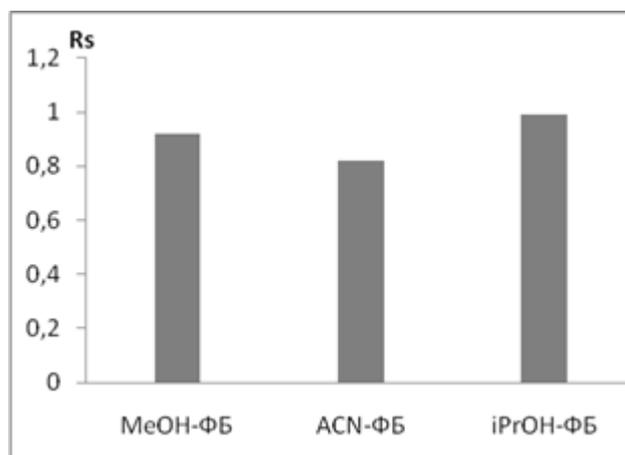
Влияние природы органического модификатора ПФ на разрешение бензоина исследовано на примере трех органических растворителей: изопропилового спирта (iPrOH), метилового спирта (MeOH) и ацетонитрила (ACN).

Хроматограммы разделения энантиомеров бензоина при использовании различных органических модификаторов в ПФ представлены на рис. 53.



**Рис. 53.** Хроматограммы энантимеров бензоина ( $c=0.3$  мг/мл) на силикагеле, модифицированном БСА. ПФ: а) MeOH/ФБ (50 мМ, рН 7), 2/98 об. %, 0.5 мл/мин, 247 нм; б) ACN/ФБ (50 мМ, рН 7), 2/98 об. %, 0.5 мл/мин, 247 нм в) iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 7), 2/98 об. %, 0.5 мл/мин, 247 нм.

Времена удерживания энантимеров бензоина при использовании метанола или ацетонитрила практически одинаковы и становятся меньше примерно на 6 % при использовании в качестве органического модификатора изопропанола. Лучшее разрешение пиков получено, если в подвижной фазе содержится изопропанол (рис. 54).



**Рис. 54.** Влияние природы органического модификатора на разрешение энантимеров бензоина на сорбенте силикагель/БСА. ПФ: органический модификатор/ФБ (50 мМ, рН 8), 2/98 об. %, скорость потока: 0.5 мл/мин, 247 нм.

При увеличении концентрации изопропанола (в интервале 0.5 – 5 %) в подвижной фазе времена удерживания веществ и разрешение пиков энантимеров

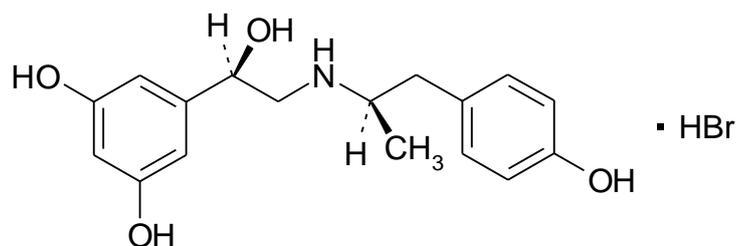
уменьшаются. Лучшее разрешение пиков достигнуто при объемной доле органического модификатора 2 об. %.

Стоит отметить, что белок в процессе использования колонки постепенно смывается с сорбента, что выражается в уменьшении времен удерживания бензоина и потери селективности сорбента. Например, через месяц непрерывной работы время удерживания бензоина в условиях  $iPrOH/ФБ$  (50 мМ, pH 7), 2/98 об. %, 0.5 мл/мин уменьшилось практически в два раза. В отличие от сорбента силикагель/эремомицин-БСА (срок службы более 2 лет), сорбент силикагель/БСА не долговечен, быстро теряет энантиоселективность из-за смывания белка с поверхности подвижной фазой.

## **Глава 7. Альтернативный способ закрепления эремомицина на силикагеле через наночастицы золота**

В предыдущих главах антибиотик эремомицин закрепляли на силикагеле путем его химической пришивки к эпокси-группам с образованием связи  $-CH(OH)-CH_2-NH-$ . Одним из альтернативных способов пришивки антибиотика на силикагель является прививка на остаток меркаптопропионовой кислоты, закрепленной на силикагеле через атомы золота посредством образования координационной связи с атомами серы.

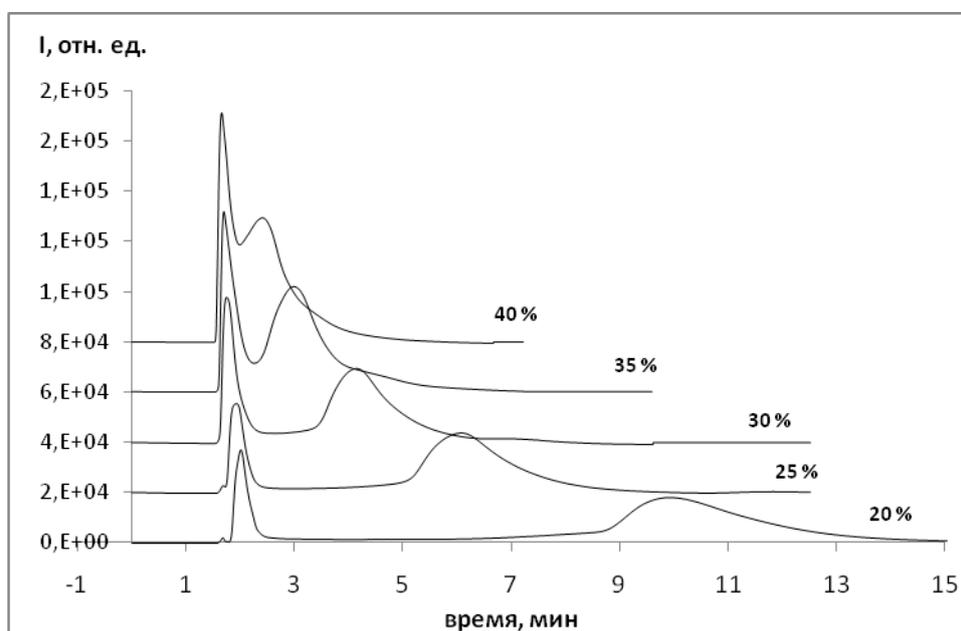
Сорбент  $SiO_2-S-Au-S-C(O)-NH$ -эремомицин исследовали на примере ряда соединений, таких как профены,  $\beta$ -блокаторы, дансильные производные аминокислот, в ОФ и ПО режимах. К сожалению, эти вещества слабо удерживаются на колонке, и не удалось разделить их энантиомеры. Особое поведение проявила фармацевтическая субстанция — (1*RS*)-2-[[[(1*RS*)-2-(4-гидроксифенил)-1-метил-этил]амино]-1-(3,5-дигидроксифенил)этанола гидробромид (Фенотерола гидробромид) — действующее вещество препаратов для лечения бронхиальной астмы. Вещество содержит два хиральных центра (рис. 55), поэтому существует четыре энантиомера, но исследованная субстанция, как заявлено производителем, содержит только два энантиомера (RR, SS).



**Рис. 55.** Структура фенотерола гидробромида.

На синтезированном сорбенте удалось разделить эти изомеры фенотерола в ОФ режиме ВЭЖХ с использованием в качестве элюента смесей метанола и 0.5 об. % раствора фосфорной кислоты.

Исследовано влияние концентрации органического растворителя (метанола) в подвижной фазе на времена удерживания и разрешение пиков разделения энантиомеров. При увеличении концентрации метанола времена удерживания и разрешение пиков уменьшаются. Хороших результатов разрешения и селективности удалось добиться при содержании органического растворителя 30 % и менее, но уменьшение концентрации метанола до 20 об. % и ниже нецелесообразно из-за увеличения времени анализа (рис. 56, табл. 37).



**Рис. 56.** Разделение оптических изомеров фенотерола гидробромида (0.3 мг/мл) на сорбенте SiO<sub>2</sub>-S-Au-S-C(O)-NH-эремомицин. Подвижная фаза: MeOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.5 об.%, pH 3.8). Содержание метанола (%) указано на хроматограмме. Скорость потока подвижной фазы 0.5 мл/мин. λ = 280 нм.

**Таблица 37.** Влияние концентрации органического модификатора в подвижной фазе на разделение оптических изомеров фенотерола гидробромида на сорбенте SiO<sub>2</sub>-S-Au-S-C(O)-NH-эремомицин. Подвижная фаза: MeOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.5 об.%, pH 3.8), 0.5 мл/мин.

Концентрация метанола, об. %	t', мин		R <sub>s</sub>	α
	1	2		
20	1.2	9.4	2.50	6.40
25	1.1	5.3	1.83	3.83
30	0.9	3.3	1.43	2.90
35	0.9	2.2	0.50	2.06
40	0.9	1.6	0.43	1.64

Интересно отметить, что на силикагеле, модифицированном эремомицином через эпокси-группы, эти энантиомеры не разделяются. Можно предположить, что в разделение изомеров вносят вклад взаимодействия между НЧЗ и аналитом.

\*\*\*

Подводя итог, можно сказать, что в рамках работы расширены возможности хирального сорбента с эремомицином в качестве селектора на такие классы соединений, как бензоил-, БОК-, КБЗ-производные аминокислот, производные α-фенилкарбоновых кислот, а также на ряд фармацевтических препаратов, в числе которых экспериментальный препарат X-15, пеметрексед, левалбутерол. На основе сорбента с эремомицином впервые синтезированы бинарные хиральные сорбенты. В одном случае в качестве селектора использован антибиотик схожей структуры ванкомицин, в другом – белок БСА. Синтезированные сорбенты обладают хорошей воспроизводимостью и стабильностью при непрерывной работе в течение более 10 месяцев. Такие сорбенты обладают энантиоразделяющей способностью каждого из селекторов, закрепленных на сорбенте. Одним из основных достоинств сорбентов, одновременно содержащих два хиральных селектора, является возможность расширить круг соединений, разделение энантиомеров которых возможно на сорбенте. Достаточно простой синтез приводит к получению более универсального хирального сорбента. Что касается бинарного сорбента с эремомицином и БСА, то основное его преимущество заключается в потенциальной возможности определять и разделять энантиомеры лекарственных средств в биологических жидкостях человека. Еще одним перспективным, по нашему мнению, направлением в работе

стал синтез хирального сорбента с эремомицином, пришитого к силикагелю через спейсер с наночастицами золота. Такой сорбент, благодаря наличию длинного спейсера, делает центры хирального распознавания сорбента более доступными для аналитов.

На наш взгляд, улучшить разделение энантиомеров исследованных соединений на синтезированных сорбентах можно путем усовершенствования способов заполнения хроматографических колонок и методик синтеза. Эффективность полученных колонок не превышала 4000 тт/м, однако полученные результаты уже сейчас говорят о перспективности применения бинарных сорбентов в хиральной ВЭЖХ.

## ВЫВОДЫ

1. Проведено систематическое изучение удерживания и разделения энантиомеров бензилоксикарбонил- ( $R_s$  до 7.3), бензоил- ( $R_s$  до 6.6), трет-бутоксикарбонил- ( $R_s$  до 4.0) производных аминокислот на сорбенте с эремомицином в условиях ОФ ВЭЖХ. Увеличение удерживания, разрешения пиков и селективности происходит по мере усложнения структуры производного в ряду трет-бутоксикарбонил- < бензоил- < бензилоксикарбонил-, внутри одного типа производных – по мере усложнения структуры и увеличения молекулы аминокислоты.

2. Предложены методики определения энантиомерной чистоты ряда лекарственных средств (пеметрексед, экспериментальный препарат X-15 гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутаминат) на сорбенте с эремомицином. Определена возможность разделения энантиомеров левалбутерола ( $R_s=1.2$ ) и экспериментального препарата пиридотиодиазин ( $R_s=0.7$ ) на сорбенте с эремомицином.

3. Разработаны новые смешанные хиральные сорбенты: силикагель, модифицированный одновременно антибиотиками эремомицином и ванкомицином и силикагель, модифицированный эремомицином и бычьим сывороточным альбумином. Модифицирование поверхности подтверждено рядом методов: элементного анализа, сканирующей электронной микроскопии, низкотемпературной адсорбции азота, спектроскопии диффузного отражения,

спектрофотометрии, рентгено-флуоресцентного анализа с полным внешним отражением. Предположено, что макроциклические антибиотики закреплены на поверхности силикагеля ковалентно, а бычий сывороточный альбумин в результате физической адсорбции.

4. Выбраны условия разделения энантиомеров класса  $\beta$ -блокаторов ( $R_s$  до 1.5) и аминокислот ( $R_s$  до 5.8) в обращенно-фазовом режиме на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-ванкомицин. Выявлены особенности удерживания, из которых следует, что за разделение энантиомеров  $\beta$ -блокаторов отвечает ванкомицин, за разделение энантиомеров аминокислот – эремомицин.

5. Исследовано влияние состава подвижной фазы на разделение различных по природе соединений и выбраны условия разделения профенов ( $R_s$  до 2.1), бензилоксикарбонил- ( $R_s$  до 3.5), бензоил- ( $R_s$  до 1.6), трет-бутоксикарбонил- ( $R_s$  до 1.8) производных аминокислот, бензоина ( $R_s$  до 3.3), на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин. Удерживание веществ на смешанном сорбенте меньше по сравнению с силикагелем, модифицированным эремомицином, но разрешение энантиомеров профенов выше, и только на нем разделяются с высоким разрешением изомеры бензоина.

6. Показано, что на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-БСА в отличие от сорбента силикагель/эремомицин не удерживаются маркерные белки (рибонуклеаза А, овальбумин, бычий сывороточный альбумин, альдолаза, ферритин, тиреоглобулин) с диапазоном молекулярных масс 13.7 – 669 кДа, и их наличие в биологических жидкостях не мешает энантиоразделению профенов на сорбенте в условиях ОФ ВЭЖХ.

7. Предложена методика определения энантиомеров кетопрофена в модельных растворах мочи на сорбенте с эремомицином и бычьим сывороточным альбумином с пределом обнаружения 8.5 мкг/мл для каждого из изомеров без предварительной пробоподготовки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаузе Г.Ф., Бражникова М.Г., Лайко А.В., Свешникова М.А., Преображенская Т.П., Федорова Г.Б., Борисова В.Н., Толстых И.В., Юрина М.С., Покрас Л.С., Гольдберг Л.Е., Малкова И.В., Степанова Э.С. Эремомицин – новый антибиотик из группы циклических гликопептидов. // Антибиотики и мед. биотехнология. 1987. Т. 32. № 3. С. 571–576.
2. Павлов А.Ю., Преображенская М.Н. Химическая модификация гликопептидных антибиотиков. // Биоорг. Хим. 1998. Т. 24. № 9. С. 644–662.
3. Gause G.F., Brazhnikova M.G., Lomakina N.N., Berdnikova T.F., Fedorova G.B., Tokareva N.L., Borisova V.N., Batta G.Y. Eremomycin – new glycopeptide antibiotic: chemical properties and structure. // J. Antibiotics. 1989. V. 42. № 12. P. 1790–1799.
4. Гаузе Г.Ф., Бражникова М.Г., Ломакина Н.Н., Гольдберг Л.Е., Лайко А.В., Федорова Г.Б., Бердникова Т.Ф. Эремомицин – новый антибиотик группы полициклических гликопептидов. // Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т. 34. № 5. С. 348–352.
5. Павлов А.Ю., Олсуфьева Е.Н., Мирошникова О.В., Резникова М.И., Лажко Э.И., Малабарба А., Чабатти Р., Преображенская М.Н. Неприродные агликоны гликопептидных антибиотиков ванкомициновой группы. Синтез и изучение антибактериальной активности. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23, № 5, С.410–421.
6. Berthod A. Chromatographic Separations and Analysis: Macrocyclic Glycopeptide Chiral Stationary Phases. // Comprehensive Chirality. 2012. V. 8. P. 227–262.
7. Павлов А.Ю., Олсуфьева Е.Н., Мирошникова О.В., Резникова М.И., Лажко Э.И., Малабарба А., Чабатти Р., Преображенская М.Н. Неприродные агликоны гликопептидных антибиотиков ванкомициновой группы. Синтез и изучение антибактериальной активности. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23, № 5, С.410–421.
8. Бердникова Т.Ф., Ломакина Н.Н., Олсуфьева Е.Н., Александрова Л.И., Потапова Н.П., Розынов Б.В., Малкова И.В., Орлова Г.И. Структура и антимикробная активность продуктов частичной деградации антибиотика эремомицина. // Антибиотики и химиотерапия. 1991. Т. 36. № 6. С. 28–31.

9. *Ломакина Н.Н., Токарева Н.Л., Потапова Н.П.* Структура эремозамина – аминсахара из антибиотика эремомицина. // Антибиотики и химиотерапия. 1988. Т. 33. № 10. С. 726–729.
10. *Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Лайко А.В., Селезнева Т.И., Свешникова М.А., Бражникова М.Г., Федорова Г.Б., Борисова В.Н., Толстых И.В., Прошлякова В.В., Гольдберг Л.Е., Шаповалова С.П., Степанова Э.С.* Антибиотик «эремомицин» и способ его получения. // Авторское свидетельство РФ. № 1475150. Опубликовано 27.05.1997. С12N1/00.
11. *Ilisz I., Berkecz R., Peter A.* Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases. // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. P. 1845–1860.
12. *Asnin L.* Review: Adsorption models in chiral chromatography. // J. Chromatogr. A. 2012. V. 1269. P. 3–25.
13. *Armstrong D.W., Tang Y.B., Chen S.S., Zhou Y.W., Bagwill C., Chen J.R.* Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 1473–1484.
14. *Armstrong D.W., Rundlett U., Chen J.R.* Evaluation of the macrocyclic antibiotic vancomycin as a chiral selector for capillary electrophoresis. // Chirality. 1994. V. 6. P. 496-509.
15. *Lammerhofer M.* Review: Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. P. 814–856.
16. *Ribeiro A.R., Maia A.S., Cass Q.B., Tiritan M.E.* Enantioseparation of chiral pharmaceuticals in biomedical and environmental analyses by liquid chromatography: An overview. // J. Chromatogr. B. 2014. V. 968. P. 8–21.
17. *Ilisz I., Berkecz R., Peter A.* Review: Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases. // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. P. 1845–1860.
18. *Scriba G.K.E.* Chiral recognition in separation science – an update. // J. Chromatogr. A. 2016. V. 1467. P. 56–78.
19. *Berthod A.* Chromatographic Separations and Analysis: Macrocyclic Glycopeptide Chiral Stationary Phases. // Comprehensive Chirality. 2012. V. 8. P. 227–262.

20. *Scriba G.K.E., Schiller F.* Chiral Separations in Capillary Electrophoresis // Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. 2015. P. 1–9.
21. *Ilisz I., Aranyi A., Pataj Z., Peter A.* Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review. // *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2012. V. 69. P. 28–41.
22. *Ilisz I., Aranyi A., Pataj Z., Peter A.* Review: Enantiomeric separation of nonproteinogenic amino acids by high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1269. P. 94–121.
23. *Ghassempour A., Aboul-Enein H.Y.* Review: Vancomycin degradation products as potential chiral selectors in enantiomeric separation of racemic compounds. // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1191. P. 182–187.
24. *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. Chrom. A.* 2006. V. 1108. P. 263–267.
25. *Кузнецов М.А., Нестеренко П.Н., Васяров Г.Г., Староверов С.М.* Высокоэффективная жидкостная хроматография энантиомеров  $\alpha$ -аминокислот на силикагеле с иммобилизованным эремомицином. // *Журн. аналит. химии.* 2008. Т. 63. № 1. С. 64–72.
26. *Натыкан А.А., Сычева К.Ю., Чернобровкин М.Г., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А.* Хроматографическое определение аминокислот и их оптических изомеров с применением колонки Nautilus-E. // *Зав. Лаб. Диагностика материалов.* 2011. Т. 77. № 3. С. 18–21.
27. *Кузнецов М.А.* Энантиоселективные сорбенты с иммобилизованными макроциклическими гликопептидными антибиотиками. // *Дисс. канд. хим. наук.* Москва. 2008. 130 с.
28. *Блинов А.С., Решетова Е.Н.* Влияние концентрации органического модификатора водно-этанольной подвижной фазы на хроматографическое удерживание и термодинамические характеристики адсорбции энантиомеров  $\alpha$ -фенилкарбоновых кислот на силикагеле с привитым антибиотиком эремомицином. // *Журн. физ. химии.* 2014. Т. 88. № 10. С. 1591–1597.

29. Кузнецов М.А., Нестеренко П.Н., Васяров Г.Г., Староверов С.М. Сорбенты с иммобилизованными гликопептидными антибиотиками для разделения оптических изомеров методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Прикл. биохим. микробиол. 2006. Т. 42. № 6. С. 615–623.
30. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Хроматографическое поведение и термодинамика адсорбции энантиомеров профенов на силикагеле с привитым антибиотиком эремомиицином. // Журн. физ. химии. 2009. Т. 83. № 4. С. 643–648.
31. Решетова Е.Н. Закономерности удерживания и разделения энантиомеров профенов на хиральных неподвижных фазах. // Автореферат дисс. канд. хим. наук. Пермь. 2011.
32. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Влияние ионного состава подвижной фазы на хроматографическое удерживание энантиомеров профенов на хиральном адсорбенте с привитым антибиотиком эремомиицином. // Журн. физ. химии. 2011. Т. 85. № 8. С. 1552–1557.
33. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Адсорбция энантиомеров ибупрофена на хиральной неподвижной фазе с привитым антибиотиком эремомиицином. // Журн. физ. химии. 2015. Т. 89. № 2. С. 298–305.
34. Asnin L., Kaczmarek 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. V. 1217. P. 7055–7064.
35. Asnin L., Gritti F., Kaczmarek K., Guiochon G. Features of the adsorption of Naproxen on the chiral stationary phase (S,S)-Whelk-O1 under reversed-phase conditions. // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. P. 264–275.
36. Arnell R., Forssen P., Tuneable Peak Deformations in Chiral Liquid Chromatography. // Anal. Chem. 2007. V. 79. P. 5838–5847.
37. Forssen P., Arnell R., Kaspereit M., Seidel-Morgenstern A., Fornstedt T. Effects of a strongly adsorbed additive on process performance in chiral preparative chromatography. // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1212. P. 89–97.
38. Zhang L., Gedicke K., Kuznetsov M.A., Staroverov S.M., Seidel-Morgenstern A. Application of an eremomycin-chiral stationary phase for the separation of DL-methionine using simulated moving bed technology. // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1162. P. 90–96.

39. *Ali I., Al-Othman Z.A., Al-Warthan A., Asnin L., Chudinov A.* Review: Advances in chiral separations of small peptides by capillary electrophoresis and chromatography. // *J. Sep. Sci.* 2014. V. 00. P. 1–20 .
40. *Armstrong D.W., Rundlett K.L., Reid III G.L.* Use of a macrocyclic antibiotic, rifamycin B, and indirect detection for the resolution of racemic amino alcohols by CE. // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 1690–1695.
41. *Armstrong D.W., Gasper M.P., Rundlett K.L.* Highly enantioselective capillary electrophoretic separations with dilute solutions of the macrocyclic antibiotic ristocetin A. // *J. Chromatogr. A.* 1995. V. 689. P. 285–304.
42. *Rundlett K.L., Armstrong D.W.* Effect of micelles and mixed micelles on efficiency and selectivity of antibiotic-based capillary electrophoretic enantioseparations. // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 2088–2095.
43. *Vespalec R., Billiet H.A.H., Frank J., Luyben K.Ch.A.M.* Fast electrophoretic separation of sulfur- and selenium-containing amino acid enantiomers with vancomycin as a chiral selector in coated capillaries. // *J. High Resol. Chromatogr.* 1996. V. 19. P. 137–142.
44. *Kang J.-W., Yang Y.-T., You J.-M., Ou Q.-Y.* Fast chiral separation of amino acid derivatives and acidic drugs by co-electroosmotic flow capillary electrophoresis with vancomycin as chiral selector. // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 825. P. 81–87.
45. *Fanali F., Crucianelli M., De Angelis F., Presutti C.* Enantioseparation of amino acid derivatives by capillary zone electrophoresis using vancomycin as chiral selector. // *Electrophoresis.* 2002. V. 23. P. 3035–3040.
46. *Prokhorova A.F., Shapovalova E.N., Shpigun O.A.* Review: Chiral analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selectors. // *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2010. V. 53. P. 1170–1179.
47. *Prokhorova A.F., Shapovalova E.N., Shpak A.V., Staroverov S.M., Shpigun O.A.* Enantio-recognition of profens by capillary electrophoresis using a novel chiral selector eremomycin. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 3674–3677.
48. *Prokhorova A.F., Kuznetsov M.A., Shapovalova E.N., Staroverov S.M., Shpigun O.A.* Enantioseparations of aromatic carboxylic acid by capillary electrophoresis using eremomycin as a chiral selector in a chitosan-modified capillary. // *Procedia Chemistry* 2. 2010. P. 9–13. 5th Conference by Nordic Separation Science Society.

49. *Sun P., Landman A., Hartwick R.A.* Chitosan Coated Capillary with Reversed Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis for the Separation of Basic Drugs and Proteins. // *J. Microcol. Sep.* 1994. V. 6. P. 403-407.
50. *Huang X., Wang Q., Huang B.* Preparation and evaluation of stable coating for capillary electrophoresis using coupled chitosan as coated modifier. // *Talanta.* 2006. V. 69.P. 463-468.
51. *Лебедева М.В., Прохорова А.Ф., Шаповалова Е.Н., Шнигун О.А., Староверов С.М., Кузнецов М.А.* Адсорбция эремомидина на стенках кварцевого и модифицированных капилляров при электрофоретическом разделении энантиомеров ароматических кислот. // *Сорбц. хромат. процессы.* 2011. Т. 11. № 5. С. 589–599.
52. *Лебедева М.В., Прохорова А.Ф., Шаповалова Е.Н., Шнигун О.А.* Электрофоретическое энантиоразделение профенов в водно-метанольных растворах с использованием эремомидина в качестве хирального селектора. // *Вестн. Моск. ун-та Серия 2: Химия.* 2013. Т. 54. № 5. С 247–251.
53. *Прохорова А.Ф., Кузнецов М.А., Шаповалова Е.Н., Староверов С.М., Шнигун О.А.* Разделение энантиомеров N-производных аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием макроциклических антибиотиков. // *Вестн. Моск. ун-та Серия 2: Химия.* 2010. Т. 51. № 5. С. 359–363.
54. *Weinberger R.* Practical Capillary Electrophoresis. 2nd ed. 2000. N.Y
55. *Horvath J., Dolnik V.* Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. // *Electrophoresis.* 2001. V. 22. P. 644–655.
56. *Karush F.* The Interaction of Optically Isomeric Dyes with Human Serum Albumin. // *J. Am. Chem. Soc.* 1954. V. 76. № 21. P. 5536–5542.
57. *Aboul-Enein H.Y., Ali I.* Chiral separation by liquid chromatography and related technologies. 2003. New York: Marcel Dekker Inc.
58. *McMenamy R.H., Oncley J.L.* The Specific Binding of L-Tryptophan to Serum Albumin. // *J. Biol. Chem.* 1958. V. 233. P. 1436–1447.
59. *Varsano-Aharon N., Ulick S.* Differences in Antipodal Specificity in the Binding of Steroids to Serum Proteins. // *J. Biol Chem.* 1972. V. 247. P. 4939–4943.

60. *Stewart K.K., Doherty R.F.* Resolution of DL-Tryptophan by Affinity Chromatography on Bovine-Serum Albumin-Agarose Columns. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1973. V. 70. № 10. P. 2850–2852.
61. *Haginaka J.* Chromatographic Separations and Analysis: Protein and Glycoprotein Stationary Phases. // *Comprehensive Chirality*. 2012. V. 8. P. 153–176.
62. *Millot M.C.* Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. // *J. Chromatogr. B*. 2003. V. 797. P. 131–159.
63. *Haginaka J.* Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations. // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 906. P. 253–273.
64. *Haginaka J.* Recent progresses in protein-based chiral stationary phases for enantioseparations in liquid chromatography. // *J. Chromatogr. B*. 2008. V. 875. P. 12–19.
65. *Zheng Y., Wang X., Ji Y.* Monoliths with proteins as chiral selectors for enantiomer separation. // *Talanta*. 2012. V. 91. P. 7–17.
66. *Haginaka J.* Enantiomer separation of drugs by capillary electrophoresis using proteins as chiral selectors. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 875. P. 235–254.
67. *Hage D.S.* High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding. // *J. Chromatogr. B*. 2002. V. 768. P. 3–30.
68. *Allenmark S., Andersson S.* Chromatographic Resolution of Chiral Compounds by Means of Immobilized Proteins. // *Molecular Interactions in Bioseparations Part II*. 1993. P. 179–187.
69. *Wallworth D.M., Lee J.T.* Chiral bioanalysis. // *Handbook of Analytical Separations*. 2003. V. 4. P. 129–184.
70. *Squire P. G., Moser P., O’Konski C. T.* The Hydrodynamic Properties of Bovine Serum Albumin Monomer and Dimer. // *Biochemistry*. 1968. V. 7. P. 4261–4272.
71. *Allenmark S., Bomgren B.* Direct resolution of enantiomers by liquid affinity chromatography on albumin-agarose under isocratic conditions. // *J. Chromatogr. A*. 1982. V. 237. № 3. P. 473–477.
72. *Allenmark S., Bomgren B., Boren H.* Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases : III. Optical resolution of a series

of N-acyl D,L-amino acids by high-performance liquid chromatography on bovine serum albumin covalently bound to silica. // *J. Chromatogr.* 1983. V. 264. P. 63–68.

73. *Allenmark S., Bomgren B., Boren H.* Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases : IV. Molecular interaction forces and retention behaviour in chromatography on bovine serum albumin as a stationary phase. // *J. Chromatogr. A.* 1984. V. 316. P. 617–624.

74. *Allenmark S., Andersson S.* Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases : V. Optical resolution of T-(2,4-dinitrophenyl)- and dansyl D,L-amino acids. // *J. Chromatogr. A.* 1986. V. 351. P. 231–238.

75. *Allenmark S., Andersson S., Bojarski J.* Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases : VI. Optical resolution of a series of racemic barbiturates: studies of substituent and mobile phase effects. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 436. P. 479–483.

76. *Allenmark S., Andersson S.* Optical Resolution of Some Biologically Active Compounds by Chiral Liquid Chromatography on BSA-Silica (Resolvosil) Columns. // *Chirality.* 1989. V. 1. P. 154–160.

77. *Thompson R.A., Andersson S., Allenmark S.* Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases : VII. Sorbents obtained by entrapment of cross-linked bovine serum albumin in silica. // *J. Chromatogr.* 1989. V. 465. P. 263–270.

78. *Andersson S., Allenmark S.* Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases : VIII A comparison of a series of sorbents based on bovine serum albumin and its fragments. // *J. Chromatogr.* 1990. V. 498. P. 81–91.

79. *Andersson S., Thompson R.A., Allenmark S.G.* Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases: IX Influence of the cross-linking reagent on the retentive and enantioselective properties of chiral sorbents based on bovine serum albumin. // *J. Chromatogr.* 1992. V. 591. P. 65–73.

80. *Allenmark S., Andersson S.* Some Mechanistic Aspects on Chiral Discrimination of Organic Acids by Immobilized Bovine Serum Albumin (BSA). // *Chirality.* 1992. V. 4. P. 24–29.

81. *Allenmark S., Andersson S.* Chiral amino acid microanalysis by direct optical resolution of fluorescent derivatives on BSA-based (resolvosil) columns. // *Chromatographia*. 1991. V. 31. № 9. P. 429–433.
82. *Allenmark S., Bomgren B., Andersson S.* Some Applications of Chiral Liquid Affinity Chromatography Using Bovine Serum Albumin as a Stationary Phase. // *Prep. Biochem.* 1984. V. 14. № 2. P. 139–147.
83. *Andersson S., Allenmark S.* Influence of amphiphilic mobile phase additives upon the direct liquid chromatographic optical resolution chiral sorbents by means of BSA-based. // *J. Liq. Chromatogr.* 1989. V. 12. № 3. P. 345–357.
84. *Wainer I.W., Chu Y.-Q.* Use of mobile phase modifiers to alter retention and stereoselectivity on a bovine serum albumin high-performance liquid chromatographic chiral stationary phase. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 455. P. 316–322.
85. *Cairns A.M., Chiou R.H.-Y., Rogers J.D., Demetriades J.L.* Enantioselective high-performance liquid chromatographic determination of omeprazole in human plasma. // *J. Chromatogr. B*. 1995. V. 666. P. 323–328.
86. *Erlandsson P., Hansson L.* Direct analytical and preparative resolution of enantiomers using albumin adsorbed to silica as a stationary phase. // *J. Chromatogr.* 1986. V. 370. P. 475–483.
87. *Erlandsson P., Nilsson S.* Use of fragment of bovine serum albumin as a chiral stationary phase in liquid chromatography. // *J. Chromatogr.* 1989. V. 482. P. 35–51.
88. *Haginaka J., Kanasugi N.* Enantioselectivity of bovine serum albumin-bonded columns produced with isolated protein fragments. // *J. Chromatogr. A*. 1995. V. 694. № 1. P. 71–80.
89. *Haginaka J., Kanasugi N.* Enantioselectivity of bovine serum albumin-bonded columns produced with isolated protein fragments II. Characterization of protein fragments and chiral binding sites. // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 769. P. 215–223.
90. *Zhang Q., Zou H., Wang H., Ni J.* Synthesis of a silica-bonded bovine serum albumin s-triazine chiral stationary phase for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 866. P. 173–181.
91. *Simek Z., Vespalec R.* Chromatographic properties of chemically bonded bovine serum albumin working as a chiral selector in alkaline mobile phases. // *J. Chromatogr. A*. 1993. V. 629. P. 153–160.

92. *Harada K., Yuan Q., Nakayama M., Sugii A.* Effects of organic modifiers on the chiral recognition by different types of silica-immobilized bovine serum albumin. // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 740. P. 207–213.
93. *Jacobson S.C., Guiochon G.* Contribution of ionically immobilized bovine serum albumin to the retention of enantiomers. // *J. Chromatogr. A.* 1992. V. 600. P. 37–42.
94. *Jacobson S.C., Guiochon G.* Enantiomeric separations using bovine serum albumin immobilized on ion-exchange stationary phases. // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. № 13. P. 1496–1498.
95. *Kiyohara S., Nakamura M., Saito K., Sugita K., Sugo T.* Binding of dl-tryptophan to BSA adsorbed in multilayers by polymer chains grafted onto a porous hollow-fiber membrane in a permeation mode. // *J. Membr. Sci.* 1999. V. 152. P. 143–149.
96. *Nakamura M., Kiyohara S., Saito K., Sugita K., Sugo T.* Chiral separation of dl-tryptophan using porous membranes containing multilayered bovine serum albumin crosslinked with glutaraldehyde. // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 822. P. 53–58.
97. *Gilpin R. K., Ehtesham S. E., Gregory R.B.* Liquid Chromatographic Studies of the Effect of Temperature on the Chiral Recognition of Tryptophan by Silica-Immobilized Bovine Albumin. // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 2825–2828.
98. *Garnier F., Randon J., Rocca J.L.* Comparison of tryptophan interactions to free and grafted BSA protein. // *Talanta.* 2000. V. 51. P. 1001–1007.
99. *Eriksson B.-M., Wallin A.* Evaluation of the liquid-chromatographic resolution of indenoindolic racemic compounds on three protein-based chiral stationary phases. // *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 1995. V. 13. № 4/5. P. 551–561.
100. *Abe Y., Fukui S., Koshiji Y., Kobayashi M., Shoji T., Sugata S., Nishizawa H., Suzuki H., Iwata K.* Enantioselective binding sites on bovine serum albumin to dansyl amino acids. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. № 1-2. V. 1433. P. 188–197.
101. *Fitos I., Visy J., Simonyi M.* Species-dependency in chiral-drug recognition of serum albumin studied by chromatographic methods. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2002. V. 54. P. 71–84.
102. *Eberlea D., Hummel R.P., Kuhn R.* Chiral resolution of pantoprazole sodium and related sulfoxides by complex formation with bovine serum albumin in capillary electrophoresis. // *J. Chromatogr. A.* 1997. V. 759. P. 185–192.

103. Zhang X.-X., Hong F., Chang W.-B., Ci Y.-X., Ye Y.-H. Enantiomeric separation of promethazine and D,L- $\alpha$ -amino-b-[4-(1,2-dihydro-2-oxo-quinoline)] propionic acid drugs by capillary zone electrophoresis using albumin as chiral selectors. // *Analyt. Chim. Acta*. 1999. V. 392. P. 175–181.
104. Hong T., Zheng Y., Hu W., Ji Y. Preparation and evaluation of bovine serum albumin immobilized chiral monolithic column for affinity capillary electrochromatography. // *Anal. Biochem*. 2014. V. 464. P. 43–50.
105. Fu Y., Huang T., Chen B., Shen J., Duan X., Zhang J., Li W. Enantioselective resolution of chiral drugs using BSA functionalized magnetic nanoparticles. // *Sep. Purif. Technol*. 2013. V. 107. P. 11–18.
106. Qi S., Ai P., Wang C., Yuan L., Zhang G. The characteristics of a mixed stationary phase containing Permethylated-CD and Perpentylated-CD in gas chromatography. // *Sep. Purif. Technol*. 2006. V. 48. P. 310–313.
107. Nie M.Y., Zhou L.M., Wang Q.H., Zhu D.Q. Gas Chromatographic Enantiomer Separation on Single and Mixed Cyclodextrin Derivative Chiral Stationary Phases. // *Chromatographia*. 2000. V. 51, №. 11/12. P. 736–740.
108. Tamogami S., Awano K., Amaike M., Takagi Y., Kitahara T. Development of an efficient GLC system with a mixed chiral stationary phase and its application to the separation of optical isomers. // *Flavour Fragr. J*. 2001. V. 16. P. 349–352.
109. Bayer M., Mosand A. Improved gas chromatographic stereodifferentiation of chiral main constituents from different essential oils using a mixture of chiral stationary phases. // *Flavour Fragr. J*. 2004. V. 19. P. 515–517.
110. Онуцак Л.А., Бурматнова Т.С., Спиряева Е.А., Кураева Ю.Г., Белоусова З.П. Сорбционные и селективные свойства бинарного жидкокристаллического сорбента на основе 4-метокси-4-этоксиязоксibenзола и ацетилированного  $\beta$ -циклодекстрина. // *Журн. физ. химии*. 2012. Т. 86. № 8. С. 1424–1434.
111. Stephany O., Dron F., Tisse S., Martinez A., Nuzillard J.-M., Peulon-Agasse V., Cardinaël P., Bouillon J.-P. (L)- or (D)-Valine tert-butylamide grafted on permethylated -cyclodextrin derivatives as new mixed binary chiral selectors Versatile tools for capillary gas chromatographic enantioseparation. // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. P. 4051–4062.

112. *Ruderisch A., Pfeiffer J., Schurig V.* Mixed chiral stationary phase containing modified resorcinarene and  $\beta$ -cyclodextrin selectors bonded to a polysiloxane for enantioselective gas chromatography. // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 994. P. 127–135.
113. *Levkin P.A., Ruderisch A., Schurig V.* Combining the Enantioselectivity of a Cyclodextrin and a Diamide Selector in a Mixed Binary Gas-Chromatographic Chiral Stationary Phase. // *Chirality.* 2006. V. 18. P. 49–63.
114. *Levkin P.A., Levkina A., Schurig V.* Combining the Enantioselectivities of L-Valine Diamide and Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin in One Gas Chromatographic Chiral Stationary Phase. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 5143–5148.
115. *Aubry A.-F., Markoglou N., Descorps V., Wainer I.W., Felix G.* Evaluation of a chiral stationary phase based on mixed immobilized proteins. // *J. Chromatogr. A.* 1994. V. 685. P. 1–6.
116. *Hyun M.H., Pirkle W.H.* Preparation and evaluation of chiral stationary phase bearing both  $\pi$ -acidic and  $\pi$ -basic sites. // *J. Chromatogr. A.* 1987. V. 393. P. 357–365.
117. *Tambute A., Siret L., Caude M., Begos A., Rosset R.* Synthesis and Evaluation of Two Novel “Mixed” Chiral Stationary Phases Deriving From Tyrosine: CSPs Designed for the Resolution of Either  $\pi$ -Acid or  $\pi$ -Basic Racemates. // *Chirality.* 1990. V. 2. P. 106–119.
118. *Oliveros L., Minguillon C., Desmazieres B., Desbene P.-L.* Preparation and evaluation of chiral high-performance liquid chromatographic stationary phases of mixed character ( $\pi$ -donor and  $\pi$ -acceptor) for the resolution of racemic compounds. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 543, P. 217–286.
119. *Iuliano A., Attolino E., Salvadori P.* Biselector enantioselective stationary phases for HPLC: dependence of the chiral discrimination properties on stereochemistry and chemical nature of each unit of the chiral auxiliary. // *Tetrahedron: Asymmetry.* 2002. V. 13. P. 1805–1815.
120. *Iuliano A., Lecci C., Salvadori P.* The *s*-triazine moiety as a scaffold for connecting different chiral auxiliaries: synthesis of new biselector CSPs for enantioselective chromatography. // *Tetrahedron: Asymmetry.* 2003. V. 14. P. 1345–1353.
121. *Iuliano A., Attolino E., Salvadori P.* (S)-Leucine and [(S)-1-(1-Naphthyl)ethyl]amine as Chiral Building Blocks for a Bifunctional System – Synthesis of

- a New Chiral Stationary Phase and Evaluation of Its Biselecter Properties in the HPLC Resolution of Racemic Compounds. // *Eur. J. Org. Chem.* 2001. P. 3523-3529.
122. *Zhang T., Francotte E.* Chromatographic Properties of Composite Chiral Stationary Phases Based on Cellulose Derivatives. // *Chirality*. 1995. V. 7. P. 425–433.
123. *Chen X., Zou H., Ni J., Feng S.* Synthesis and characteristics of composite chiral stationary phases based on cellulose derivatives. // *J. Sep. Sci.* 2003. V. 26. P. 29–36.
124. *Chen J., Duan R., Chen W., Zhang J., Luo X.-G., Liu J., Bai Z.-W.* Enantioseparation Properties of the Biselecter Chiral Stationary Phase Derived from Amylose Tris(phenylcarbamate) and Amylose Tris(benzoate). // *Curr. Analyt. Chem.* 2013. V. 9. № 1. P. 128–134.
125. *Wang Z.-Q., Liu J., Chen W., Bai Z.-W.* Enantioseparation characteristics of biselecter chiral stationary phases based on derivatives of cellulose and amylase. // *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1346. P. 57–68.
126. *Лурье Ю.Ю.* Справочник по аналитической химии. М.: Химия. 1979. 480 с.
127. *Семак И.В., Зырянова Т.Н, Губич О.И.* Бохимия белков. Практикум для студентов биологического факультета. Минск: БГУ. 2007. 49 с.
128. *Erlandsson P., Hansson L., Isaksson R.* Direct analytical and preparative resolution of enantiomers using albumin adsorbed to silica as a stationary phase. // *J. Chromatogr. A*. 1986. V. 370. P. 475-483.
129. *Алов Н.В.* Рентгенофлуоресцентный анализ с полным внешним отражением: физические основы и аналитическое применение. Обзор. // *Зав. Лаб. Диагностика материалов*. 2010. Т. 76. № 1. P. 4-14.
130. *Kubelka P.* Ein beitrage zur optic der farban striche. // *Z. Tech. Phys.* 1931. В. 12. S. 593–601.
131. *Kubelka P.* New contribution to the optics of intensely light-scattering materials. Part I. // *J. Opt. Soc. Amer.* 1948. V. 38. № 5. P. 448–457.
132. *Рунов В.К.* Развитие оптических сорбционно-молекулярно-спектроскопических методов анализа. Дис. д-ра хим. наук. Москва. 1994.
133. *Рунов В.К., Тропина В.В.* Оптические сорбционно-молекулярно-спектроскопические методы анализа. Методические вопросы количественных измерений в спектроскопии диффузного отражения. // *Журн. Аналит. Химии*. 1996. Т. 51. № 1. С. 71–77.

134. Качин С.В., Козель Н.А., Сагалаков С.А., Калякина О.П., Кононова О.Н. Методы твердофазной спектроскопии в анализе воздуха рабочей зоны. // Вестн. КрасГУ. 2003. № 2. С. 115–122.
135. Полякова (Елфимова) Я.А. Новые наногибридные материалы на основе наночастиц золота для ВЭЖХ. // Дисс. канд. хим. наук. Москва. 2013. 190 с.
136. Ананьева И.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография оптически активных азотсодержащих соединений. // Дисс. канд. хим. наук. Москва. 2001.
137. Суслина З.И., Пирадов М.А. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика. МЕДпресс-информ. Москва. 2008. 288 с.
138. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Новая Волна. Москва. 2014. 1216 с.
139. Воронина Т.А. Отечественный препарат нового поколения мексидол, основные эффекты, механизм действия, применение. НИИ Фармакологии РАМН. Москва. 2005. 20 с.
140. Суслина З.А., Смирнова И.Н., Танащян М.М. и др. Клиническая эффективность мексидола и влияние его на реологические свойства крови и гемоперфузию головного мозга при хронических формах цереброваскулярных заболеваний. Москва. 2002. 19 с.
141. Яснецов В.В., Скачилова С.Я., Воронина Т.А., Яснецов В.В. Нейротропное средство, обладающее антиоксидантной, противогипоксической, нейропротекторной, антиамнестической и противоукучивающей активностью и способностью улучшать когнитивные функции. // Авторское свидетельство РФ. № 2394816. Опубликовано 20.07.2010.
142. Pizzarello S., Cooper G.W. Molecular and chiral analyses of some protein amino acid derivatives in the Murchison and Murray meteorites. // Meteorit. Planet. Sci. 2001. V. 36. P. 897–909.
143. Fanali S., Crucianelli M., De Angelis F., Prescutti C. Enantioseparation of amino acid derivatives by capillary zone electrophoresis using vancomycin as chiral selector. // Electrophoresis. 2002. V. 23, P. 3035–3040.
144. Ramulu K., Rao B.M., Madhavan P., Lalitha Devi M., Srinivasu M.K., Chandrasekhar K.B. A valid chiral LC method for the determination of enantiomeric

- purity of pemetrexed disodium on an amylase-based chiral stationary phase. // *Chromatographia*. 2007. V. 65. P. 249–252.
145. *European Pharmacopoeia*, Strasbourg: The Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe. 2013. 8th ed. P. 2975–2977.
146. *Beesley T.E., Scott R.P.W.* Chiral chromatography. Separation science series. John Wiley and Sons Ltd. 1998. 552 p.
147. *Chirobiotic Handbook*. Advanced Separation Technologies Inc. Whippany New Jersey. 1999. 44 p.
148. *The United States Pharmacopoeia. Official Monographs*. The United States Pharmacopoeial Convention. 2014. V. 37. P. 3513.
149. *Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Dueva E.V.* Inhibitors of Tick-Borne Flavivirus Reproduction from Structure-Based Virtual Screening // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2013. V. 4. № 9. P. 869–874.
150. *Bosakova Z., Curinova E., Tesarova E.* Comparison of vancomycin-based stationary phases with different chiral selector coverage for enantioselective separation of selected drugs in high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1088. P. 94–103.
151. *Petrusevska K., Kuznetsov M.A., Gedicke K., Meshko V., Staroverov S.M., Seidel-Morgenstern A.* Chromatographic enantioseparation of amino acids using a new chiral stationary phase based on a macrocyclic glycopeptide antibiotic. // *J. Sep. Sci.* 2006. V. 29. P. 1447–1457.
152. *Aboul-Enein H.Y., Abou-Basha L.I.* The impact of stereochemistry on drug development and use. New York. Wiley. 1997. 728 p.
153. *Онищенко Г.Г., Зайцева Н.В., Уланова Т.С.* Контроль содержания химических соединений и элементов в биологических средах. Пермь. 2011. 520 с.