

На правах рукописи



Климова Яна Анатольевна

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОГО УДЕРЖИВАНИЯ ДИПЕПТИДОВ
НА АДСОРБЕНТАХ С ПРИВИТЫМИ АМФОЛИТНЫМИ ХИРАЛЬНЫМИ
СЕЛЕКТОРАМИ НА ОСНОВЕ ГЛИКОПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ
И ПРОИЗВОДНЫХ ХИНИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ**

1.4.4. Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Саратов – 2025

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

Научный руководитель:

Аснин Леонид Давыдович

кандидат химических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Нестеренко Павел Николаевич

доктор химических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», профессор кафедры физической химии

Яшкин Сергей Николаевич

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

Ведущая организация:

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева»», г. Самара

Защита состоится 16 мая 2025 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.392.03, созданного на базе ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского», по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корп. I, Институт химии СГУ.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук, доцент



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Низкомолекулярные пептиды, и в частности дипептиды, широко применяются в медицине и фармацевтике как лекарственные средства или полупродукты для их синтеза. Они также могут служить биомаркерами патологических процессов в организме. Биологическая активность дипептидов зависит от стереохимической конфигурации составляющих их аминокислот. По этой причине возникает необходимость выделения из стереоизомерных смесей дипептидов или определения в этой смеси формы с требуемой биологической активностью. Одним из основных способов решения этой задачи является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на хиральных неподвижных фазах (ХНФ). Создание эффективных хроматографических методик требует понимания механизмов удерживания разделяемых компонентов на ХНФ и закономерностей их массопереноса в хроматографических колонках. Последнее представляет особый интерес ввиду слабой изученности динамики энантиоселективной адсорбции в условиях ВЭЖХ.

В представленной работе рассматриваются амфолитные ХНФ с привитыми селекторами двух типов: макроциклическими гликопептидными антибиотиками и цвиттер-ионными производными хининовых алкалоидов. Первая группа ХНФ давно используется для энантиоразделения низкомолекулярных пептидов, однако динамика процессов элюирования пептидных адсорбатов на таких колонках не была изучена. Неподвижные фазы на основе аддуктов хинина/хинидина с аминокислотами или аминосульфокислотами являются относительно новым классом хиральных адсорбентов, которые продемонстрировали свою эффективность в разделении энантиомеров аминокислот, ди- и трипептидов. Несмотря на активные исследования указанных материалов в последние несколько лет, многие особенности их поведения, как и связь строения с адсорбционными свойствами остаются непонятыми, что затрудняет внедрение этой перспективной группы адсорбентов в практику.

Цель работы. Установить закономерности энантиоселективного удерживания дипептидов на адсорбентах с привитыми амфолитными хиральными селекторами на основе гликопептидных антибиотиков и производных хининовых алкалоидов.

Задачи исследования:

1. Исследовать адсорбцию бинарных растворителей на ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками и цвиттер-ионными производными хининовых алкалоидов, выяснить влияние состава растворителя на состав адсорбированного слоя подвижной фазы.

2. Выяснить закономерности хроматографического разделения и удерживания энантиомеров дипептидов на ХНФ на основе производных хинина (QN) и хинидина (QD). Определить зависимости характеристик удерживания исследуемых дипептидов и селективность их разделения от состава и рН подвижной фазы.

3. Исследовать динамику адсорбции дипептидов на ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками и привитым аддуктом хинина и дипептида L-Ala-L-Leu (QN-L-Ala-L-Leu). Определить особенности поведения кривых ван Деемтера в зависимости от типа ХНФ и структуры аналита.

Научная новизна: В работе впервые:

- установлены закономерности удерживания и разделения стереоизомеров дипептидов в условиях обращенно-фазовой жидкостной хроматографии на новых цвиттер-ионных ХНФ на основе аддуктов хинина/хинидина и аминокислоты (ZWIX(+A), ZWIX(-A)) или дипептидов (QN-L-Leu-L-Ala, QN-L-Ala-L-Leu и QD-L-Ala-L-Leu). Предложены объяснения механизмов удерживания.

- измерена адсорбция смесей вода–метанол и вода–ацетонитрил на ХНФ Chirobiotic R и Chirobiotic T, с привитыми макроциклическими антибиотиками ристоцетином А и тейкопланином, соответственно, а также на ХНФ ZWIX(-A) и QN-L-Ala-L-Leu. Рассмотрены особенности строения адсорбированного слоя подвижной фазы в зависимости от природы растворителя.

- установлены особенности динамики адсорбции ряда дипептидов на ХНФ Chirobiotic R, Chirobiotic V и QN-L-Ala-L-Leu.

Теоретическая и практическая значимость. Объяснены механизмы влияния состава подвижной фазы (ПФ) на хроматографическое удерживание дипептидов на цвиттер-ионных ХНФ на основе производных хинина и хинидина. Выявлено влияние строения хирального селектора на его энантиоселективность, что дает возможность осуществлять рациональный выбор ХНФ для энантиоразделения низкомолекулярных пептидов. Определены оптимальные условия разделения энантиомеров дипептидов на указанных ХНФ, которые могут быть использованы в хроматографических методиках контроля состава энантиомерных смесей, а также для препаративного разделения стереоизомеров дипептидов. Объяснены закономерности энантиоселективной динамики адсорбции и определены характеристики массопереноса дипептидов на ХНФ Chirobiotic R, Chirobiotic V и QN-L-Ala-L-Leu, что позволяет прогнозировать эффективность соответствующих колонок в процессах препаративного разделения энантиомерных смесей.

Автор на защиту выносит:

1. Результаты исследования влияния состава элюента на строение границы раздела фаз ХНФ–элюент.

2. Зависимости факторов удерживания и разделения энантиомеров дипептидов на ХНФ с привитыми производными хининовых алкалоидов от состава и pH ПФ в условиях

высокоэффективной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Объяснение влияния строения исследуемых дипептидов на их удерживание и энантиоразделение.

3. Сравнительная характеристика динамики адсорбции дипептидов на ХНФ Chirobiotic R, Chirobiotic V и QN-L-Ala-L-Leu.

Методология и методы диссертационного исследования. Экспериментальная часть работы выполнена с использованием техники ВЭЖХ. Анализ полученных данных осуществлялся с применением методов классической термодинамики поверхностных явлений. Изучение динамики адсорбции основывалось на применении метода моментов и модифицированного уравнения ван Деемтера (с учетом концепции сопряжения вихревой и молекулярной диффузии), а также выполнялось с применением метода численного моделирования в рамках решения обратной задачи хроматографии.

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

Апробация результатов работы. Результаты исследований докладывались на VI Всероссийском симпозиуме с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (г. Краснодар, 26 сентября - 2 октября 2021 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Химия. Экология. Урбанистика» (г. Пермь, 28-29 апреля 2022 г. и 19-21 апреля 2023 г.), XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (г. Томск, 15-19 мая 2023 г.).

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 15 работах. Список публикаций включает 10 статей, из них 6 в рекомендованных ВАК изданиях, и тезисы 5 докладов.

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

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, трех глав, выводов и списка литературы, содержащего 305 источников. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 36 рисунков, 23 таблицы.

Реализация работы. Результаты диссертационной работы использованы при выполнении научно-исследовательских работ в рамках проекта Российского научного фонда

(грант № 18-13-00240) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-53-26007).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

В первой главе приводится обзор литературы по хиральной хроматографии. Первая часть обзора посвящена обсуждению теории хирального разделения и особенностей динамики адсорбции в хиральных системах. Вторая часть описывает строение и физико-химические свойства ХНФ. Подробно рассмотрены ХНФ на основе макроциклических гликопептидных антибиотиков и хининовых алкалоидов. В заключение приведен обзор применения метода ВЭЖХ к изучению механизмов энантиоразделения дипептидов.

Вторая глава содержит сведения об объектах и методах исследования, реактивах и оборудовании, использованных при выполнении работы. Группу исследованных веществ представляют стереоизомеры дипептидов Leu-Leu, Leu-Phe, Phe-Gly, Gly-Phe, Gly-Leu, Leu-Gly, Ala-Ala, Phe-Leu, а также Gly-Gly (Ala – аланин, Gly – глицин, Leu – лейцин, Phe – фенилаланин). Работа выполнялась на жидкостном хроматографе LC20AD-XR (Shimadzu, Япония) оснащенный прецизионным насосом, диодно-матричным детектором, автодозатором и термостатом колонок. Измерения осуществляли на колонках Chirobiotic R, Chirobiotic T и Chirobiotic V, заполненных силикагелем с привитыми антибиотиками ристоцетином А, тейкопланином и ванкомицином соответственно. Другая группа исследованных колонок содержала ХНФ ZWIX(+A) и ZWIX(-A) на основе аддуктов хининовых алкалоидов и аминокислоты глицил-L-аланина, отличающихся природой алкалоидного основания (хинин в (+A), хинидин в (-A) и конфигурацией кислоты ((R,R) в (+A), (S,S) в (-A)), а также на основе аддуктов хининовых алкалоидов и дипептидов (QN-L-Leu-L-Ala, QN-L-Ala-L-Leu, QD-L-Ala-L-Leu).

Адсорбцию бинарных растворителей на ХНФ измеряли методом малых возмущений; для анализа полученных данных применяли теорию реального адсорбционного раствора на границе раздела жидкость–твердое тело.

Для изучения динамики адсорбции дипептидов на ХНФ экспериментальные данные по зависимости приведенной высоты эквивалентной теоретической тарелки (ВЭТТ, h) от приведенной скорости подвижной фазы (v) аппроксимировали уравнением ван Деемтера-Гиддингса (1) и анализировали значения параметров уравнения, каждый из которых отвечает за вклад определенного массообменного процесса в размывание хроматографического пика.

$$h = \frac{B}{v} + \sum_{i=1}^3 \frac{1}{1/2\lambda_i + 1/\omega_i v} + C_{ext} v + (C_s + C_{ads}) v \quad (1)$$

где $h = \text{ВЭТТ}/d_p$, $v = (ud_p/D_m)$, d_p – диаметр частиц неподвижной фазы, B – коэффициент продольной диффузии, коэффициенты C_{ext} , C_s и C_{ads} характеризуют сопротивления массопереносу за счет внешней, внутрипоровой диффузии и кинетики адсорбции соответственно, коэффициенты λ и ω представляют собой структурные параметры, связанные с конвективным переносом (λ) и молекулярной диффузией (ω) на определенном масштабе длины.

Третья глава посвящена свойствам поверхности исследуемых ХНФ, изученных методом адсорбции бинарных растворителей. В качестве таковых использовали смеси метанол–вода и ацетонитрил–вода. Измерения проводили с двумя антибиотиковыми (Chirobiotic R и Chirobiotic T) и двумя цвиттер-ионными (QN-L-Ala-L-Leu и ZWIX(-A)) неподвижными фазами. К анализу результатов также привлечены полученные ранее¹ данные по адсорбции водо-органических смесей на ХНФ Nautilus E с привитым антибиотиком эремочицином.

Изотермы избыточной адсорбции воды из бинарных растворителей на хиральных адсорбентах показаны на рис. 1 в координатах $\Gamma_1^{(n)}$ – x_1^I (индекс «1» обозначает воду, индекс «2» – метанол или ацетонитрил).

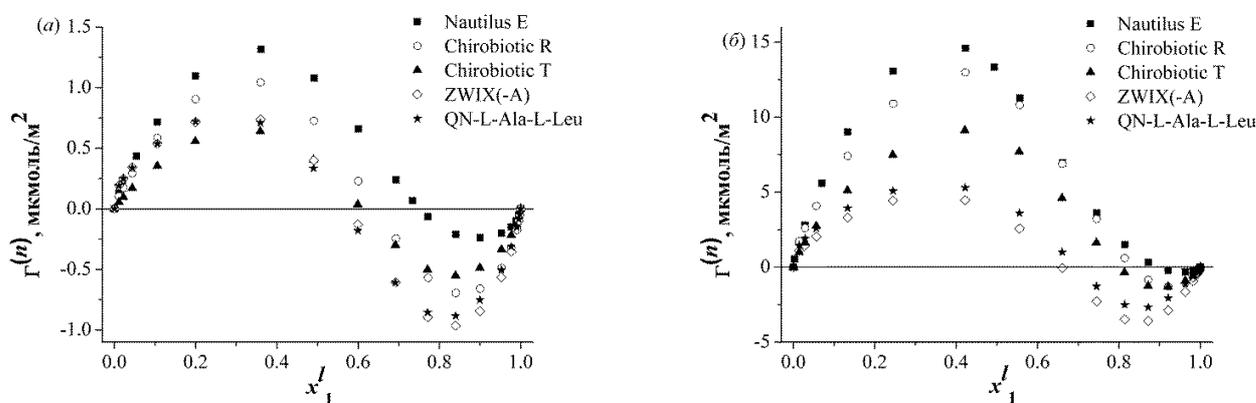


Рисунок 1 – Изотермы избыточной адсорбции воды из смесей вода–метанол (а) и вода–ацетонитрил (б) на исследуемых ХНФ

Все полученные изотермы принадлежат 5 типу по классификации Шая, так как имеют точку адсорбционного азеотропа ($\Gamma_1^{(n)} = 0$). Исследуемые ХНФ можно охарактеризовать как относительно гидрофильные, поскольку избыточная адсорбция воды наблюдается вплоть до ее мольной доли в подвижной фазе (ПФ) 0.6–0.75 для смеси MeOH–H₂O и 0.7–0.9 для MeCN–H₂O. Гидрофильность ХНФ увеличивается в ряду: ZWIX(-A) < QN-L-Ala-L-Leu < Chirobiotic T < Chirobiotic R < Nautilus E.

¹ Nikitina Y. K., Ali I., Asnin L. D. // J. Chromatogr. A, 2014. V. 1363. P. 71-78.

Максимум избыточной адсорбции воды из водно-ацетонитрильных смесей на порядок выше, чем из водно-метанольных. Это можно объяснить двумя обстоятельствами. Во-первых, наличие протондонорной гидроксильной группы у молекулы метанола позволяет ей конкурировать с молекулами воды за взаимодействие с протоноакцепторными центрами поверхности ХНФ. Во-вторых, такое отличие в адсорбции воды может быть связано со строением растворов метанол–вода и ацетонитрил–вода. Смеси MeOH–H₂O характеризуются экзотермическим эффектом смешения и относительно высокой степенью ближнего порядка, а смеси MeCN–H₂O эндотермическим смешением и увеличением энтропии, то есть разупорядочиванием структуры раствора относительно чистых жидкостей. Взаимодействие смеси метанол–вода с гидрофильной поверхностью ХНФ не существенно меняет степень упорядоченности приповерхностного слоя по сравнению с объемной фазой, и увеличение в нем концентрации воды не приводит к большому выигрышу энергии. Для смесей ацетонитрил–вода наблюдается противоположная картина. Накопление воды в приповерхностном слое приводит к увеличению упорядоченности, так как это энергетически выгодно за счет уменьшения энтропии. Описанные особенности также влияют и на толщину адсорбционного слоя (τ). Для смеси MeCN–H₂O она составляет 0.8-1.1 нм. Для смеси MeOH–H₂O $\tau \approx 0.1$ нм, что в 3-4 раза меньше размера компонентов смеси (0.3-0.4 нм). По-видимому, это связано с нарушением допущений, принятых для определения толщины адсорбционного слоя, главным из которых является условие равномерности состава и толщины адсорбционной фазы на поверхности адсорбента. Таким образом τ – это кажущаяся средняя толщина адсорбционного слоя, а полученные данные следует интерпретировать так, что τ для смесей MeOH–H₂O в среднем не превышает одного мономолекулярного слоя, а для смесей MeCN–H₂O составляет несколько (в среднем ~ 3) мономолекулярных слоев.

Анализ зависимости поверхностных коэффициентов активности компонентов ПФ от ее состава показал, что для обоих типов смесей наблюдается существенное изменение свойств раствора вблизи азеотропной точки, резкое для систем MeOH–H₂O и плавное для систем MeCN–H₂O.

Четвертая глава описывает результаты изучения хроматографического поведения энантиомеров дипептидов на ХНФ на основе производных хининовых алкалоидов ZWIX(–A), ZWIX(+A), QN-L-Leu-L-Ala, QN-L-Ala-L-Leu, QD-L-Ala-L-Leu.

Закономерности удерживания стереоизомеров дипептидов на ХНФ ZWIX(+A) и ZWIX(–A) изучали, используя смеси воды и метанола или ацетонитрила, варьируя содержание органического компонента.

Сравнение зависимостей фактора удерживания (k) от доли органического компонента в ПФ (φ) на ХНФ ZWIX(+A) и ZWIX(–A) показало, что исследуемые ХНФ являются по

отношению друг к другу псевдоэнантиомерами, так как характеризуются обратным порядком элюирования энантиомеров (рис. 2). Селекторы ZWIX(+A) и ZWIX(-A) содержат 7 хиральных центров, конфигурация трех из них совпадает, но конфигурации хиральных атомов, входящих в важный для энантиоразделения алкалоидный фрагмент, отличаются, что и может давать псевдоэнантиомерный эффект.

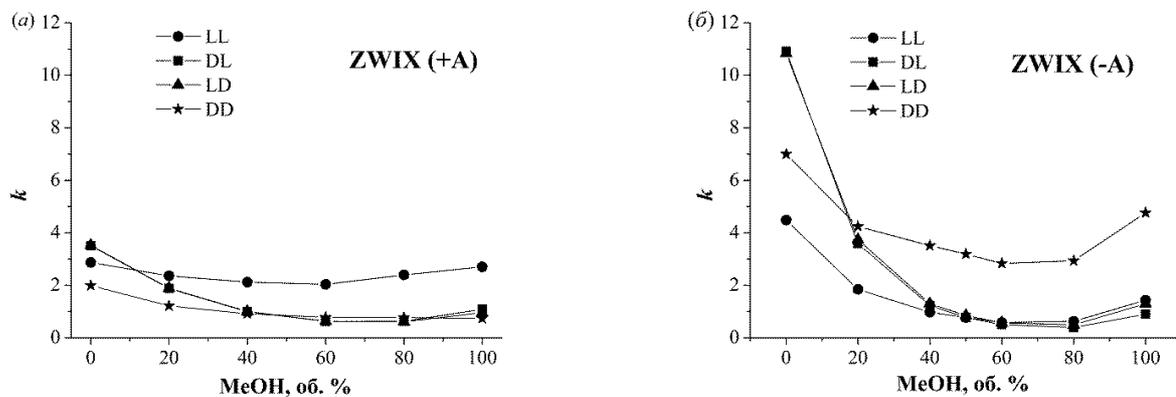


Рисунок 2 – Влияние доли метанола на фактор удерживания стереоизомеров Leu-Phe на ХНФ ZWIX(+A) (a) и ZWIX(-A) (б)

Хроматографическое поведение дипептидов на исследованных цвиттер-ионных ХНФ в значительной мере определяется их гидрофильностью. По этой характеристике исследованные дипептиды можно условно разделить на 3 группы: гидрофильные (Ala-Ala), гидрофобные (Leu-Leu, Leu-Phe) и с промежуточной гидрофильностью (Gly-Phe, Phe-Gly, Gly-Leu и Leu-Gly).

Графики зависимости $k(\varphi)$ для гидрофильных дипептидов на обеих ХНФ характеризуются возрастающей зависимостью (рис. 3a), для гидрофобных – имеют U-образную форму (рис. 3б), а дипептиды с промежуточной гидрофильностью демонстрируют почти возрастающую зависимость k от φ , подобно той, что наблюдается для гидрофильных дипептидов, но с еле заметным снижением k при увеличении концентрации MeOH от 0 до 20%.

Полученные закономерности объясняются влиянием на общую свободную энергию адсорбции процессов сольватации дипептидов в ПФ и десорбции компонентов растворителя с поверхности ХНФ. Гидрофильные вещества плохо сольватируются органическими растворителями, поэтому их фактор удерживания растет с увеличением доли MeOH в ПФ. Для гидрофобных веществ наоборот увеличение доли органического растворителя ведет к росту сольватирующей способности растворителя, и, соответственно, к уменьшению фактора удерживания. Появление U-образной зависимости связано с тем, что с некоторого значения φ начинает сказываться уменьшение в ПФ концентрации более сильного десорбента (H_2O), что ведет к увеличению k .

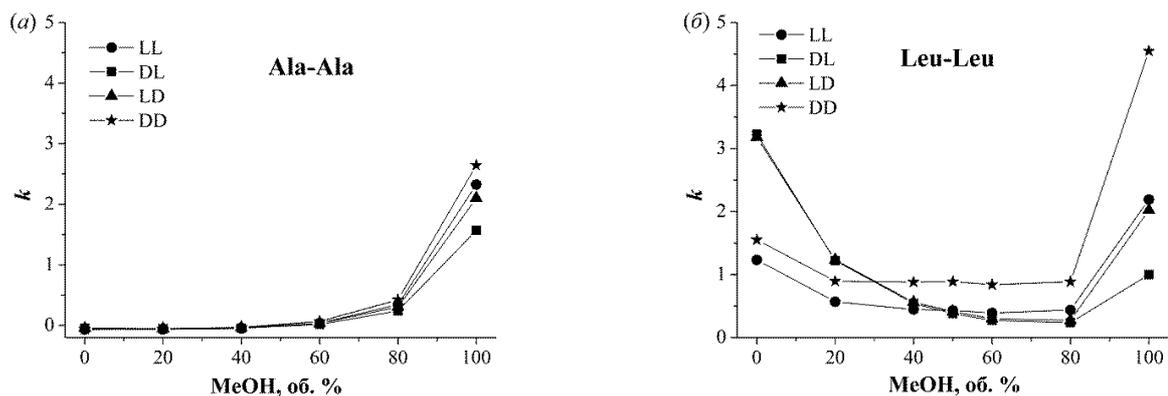


Рисунок 3 – Влияние доли метанола на фактор удерживания стереоизомеров Ala-Ala (а) и Leu-Leu (б) на ХНФ ZWIX(-А)

Влияние солевой добавки (ацетат аммония) в ПФ на значения k представлено на рис. 4. Видно, что добавление даже небольшого количества буфера в подвижную фазу сильно снижает удерживание дипептидов, что нехарактерно для ионообменного механизма адсорбции. Падение значений k особенно велико в растворителях с высоким содержанием метанола, что позволяет предположить потерю удерживания вследствие экранирования заряженных групп селектора противоионами буферной соли. В ПФ с высоким содержанием MeOH диссоциация подавлена, концентрация ионизированных групп становится меньше, а доля экранированных групп – больше, соответственно вклад этого явления в уменьшение k будет заметнее.

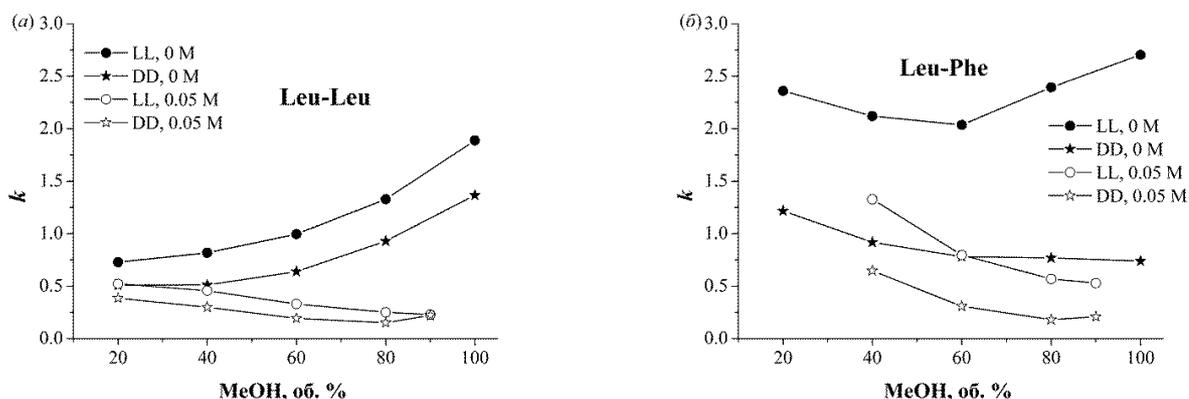


Рисунок 4 – Влияние добавки ацетата аммония в ПФ с различным содержанием MeOH на удерживание энантимеров Leu-Leu (а) и Leu-Phe (б) на ХНФ ZWIX(+А)

Влияние pH ПФ на удерживание дипептидов показано на рис. 5 на примере Leu-Phe. Зависимости k от pH элюента для всех стереоизомеров Leu-Phe проходят через максимум и далее падают. Для L-Leu-L-Phe описанный характер зависимости более ярко выражен; для остальных стереоизомеров при достижении pH 5 и выше k уменьшается незначительно. Leu-Phe

может существовать в нескольких ионных формах: катионной ($\text{NH}_3^+\text{-R-COOH}$), цвиттер-ионной ($\text{NH}_3^+\text{-R-COO}^-$) и анионной ($\text{NH}_2\text{-R-COO}^-$). Полностью нейтральные молекулы ($\text{NH}_2\text{-R-COOH}$) присутствуют в растворах дипептидов в незначительных концентрациях и их наличием пренебрегают. Соотношение долей указанных форм изменяется с изменением pH согласно кривым показанным на рис. 6. Сравнение зависимостей на рис. 5 и рис. 6 показывает, что фактор удерживания коррелирует с изменением доли цвиттер-ионов в растворе. Логично предположить, что цвиттер-ионы характеризуются более прочной адсорбцией на исследуемой ХНФ по сравнению с другими ионными формами дипептида.

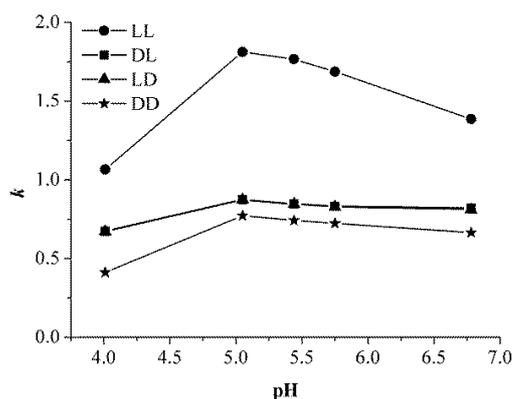


Рисунок 5 – Влияние pH элюента на фактор удерживания Leu-Phe. ХНФ: ZWIX(+A). ПФ: 0.1 М ацетатный буфер, MeOH:H₂O (40:60)

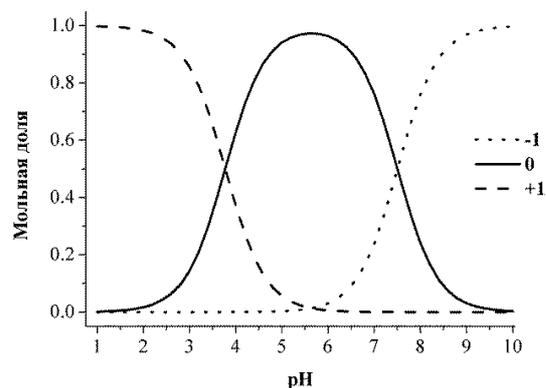


Рисунок 6 – Влияние pH на долю различных ионных форм Leu-Phe в растворителе MeOH:H₂O (40:60)

Хиральные селекторы типа ZWIX(A) проявляют низкую или умеренную энантиоселективность по отношению к стереоизомерам исследуемых аналитов и на них лучше разделяются энантиомеры гидрофобных дипептидов. Другой группой исследованных цвиттер-ионных селекторов были аддукты хинина или хинидина с дипептидами L-Ala-L-Leu и L-Leu-L-Ala. Сравнение неподвижных фаз на основе QN-L-Leu-L-Ala, QN-L-Ala-L-Leu позволило изучить влияние позиционной изомерии дипептидного фрагмента, а неподвижных фаз QN-L-Ala-L-Leu, QD-L-Ala-L-Leu – конфигурации алкалоидного фрагмента на хроматографические свойства указанной группы хиральных селекторов. Эксперименты с этой группой адсорбентов выполняли с ПФ, содержащими $2 \cdot 10^{-4}$ М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Такая небольшая добавка электролита незначительно влияла на удерживание, но способствовала быстрому установлению равновесия в колонке. Как и в случае с ХНФ типа ZWIX(A), вид зависимости фактора удерживания от объемной доли метанола в ПФ на данных ХНФ определяется гидрофильностью аналита. На ХНФ с привитым QN-L-Leu-L-Ala для относительно гидрофильного дипептида Ala-Ala зависимость возрастающая, для гидрофобных дипептидов

Leu-Leu, Leu-Phe и Phe-Leu – убывающая, а для дипептидов с промежуточной гидрофильностью зависимость имеет U-образную форму (Gly-Leu/Leu-Gly) или вид убывающей кривой с подъемом k при $\varphi > 80$ % об. (Gly-Phe/Phe-Gly). Также на ХНФ QN-L-Ala-L-Leu, QD-L-Ala-L-Leu наблюдается обращение порядка элюирования энантиомеров при изменении конфигурации алкалоидного фрагмента, т.е. замены QN на QD, как и на ХНФ семейства ZWIX.

Сравнение зависимостей $k(\varphi)$ на ХНФ QN-L-Leu-L-Ala, QN-L-Ala-L-Leu показало влияние позиционной изомерии катионообменного дипептидного фрагмента хирального селектора на механизмы удерживания. Для всех исследуемых дипептидов зависимости $k(\varphi)$ качественно совпадают в области 0-80 % об. MeOH, но отличаются при элюировании чистым метанолом. На ХНФ QN-L-Ala-L-Leu в области чистого органического растворителя наблюдается увеличение факторов удерживания для всех исследуемых дипептидов. Также для более гидрофобных дипептидов (Leu-Leu, Leu-Phe) на ХНФ с привитым QN-L-Ala-L-Leu значения k несколько выше. Таким образом, позиционная изомерия дипептидного фрагмента не влияет на порядок элюирования и не оказывает существенного влияния на хроматографическое поведение дипептидов. Можно сделать вывод, что центр хирального распознавания расположен в алкалоидном фрагменте селектора, а дипептидный заместитель играет только вспомогательную роль.

Влияние содержания ацетонитрила на удерживание стереоизомеров дипептидов Leu-Leu и Leu-Phe на ХНФ QN-L-Leu-L-Ala показано на рис. 7. Характер зависимостей фактора удерживания от доли органического компонента в составе ПФ для стереоизомеров Leu-Leu и Leu-Phe отличается от аналогичных зависимостей в водно-метанольных системах (рис. 8). В смесях MeCN–H₂O зависимость $k(\varphi)$ имеет U-образный характер, тогда как в смесях MeOH–H₂O k был убывающей функцией φ . Т.е. до области умеренных концентраций органического компонента (до 60 % об.) хроматографическое поведение двух рассматриваемых дипептидов качественно подобно. Отличия начинают проявляться только в водо-обедненных ПФ, где значимую роль начинают играть различия в десорбционной способности ацетонитрила и метанола. Ацетонитрил, как апротонный растворитель, не может конкурировать с дипептидом за взаимодействие с центрами образования водородной связи, поэтому по мере уменьшения содержания воды десорбционная способность ПФ уменьшается. Метанол содержит гидроксильную группу, поэтому по мере замещения воды метанолом способность ПФ экранировать центры образования водородной связи молекулы селектора не уменьшается существенно. В элюентах с высоким содержанием воды, она определяет десорбирующую активность, тогда как доля органического растворителя влияет на другую составляющую элюирующей силы ПФ – сольватирующую способность. При уменьшении доли воды от 100 до

40 % об. (увеличении доли метанола/ацетонитрила от 0 до 60 % об.) десорбирующая активность ПФ меняется несущественно, зато сольватирующая способность по отношению к относительно гидрофобным Leu-Leu и Leu-Phe увеличивается значительно для обоих растворителей, что и обуславливает симбатное уменьшение функций $k(\varphi)$ в указанном интервале составов ПФ. На рис. 9 приведены хроматограммы Leu-Phe на ХНФ QN-L-Leu-L-Ala.

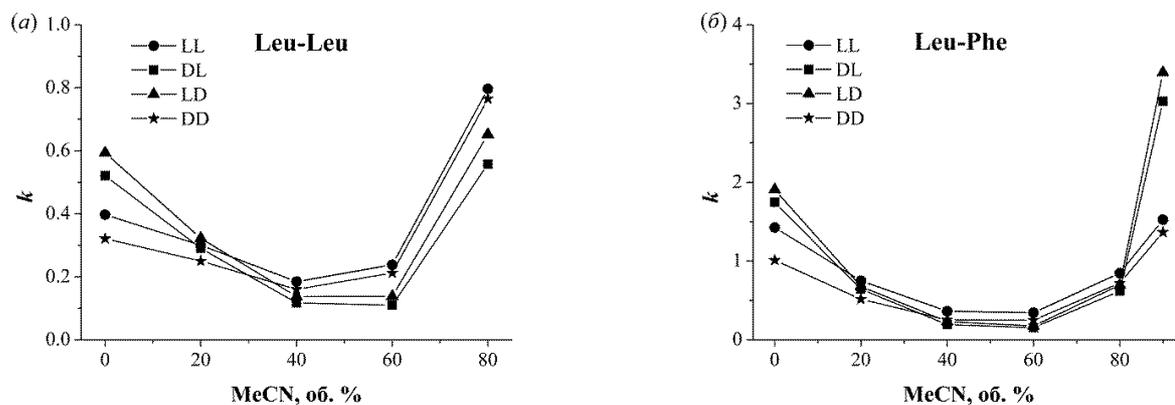


Рисунок 7 – Влияние доли ацетонитрила в ПФ на фактор удерживания стереоизомеров Leu-Leu (a) и Leu-Phe (б) на ХНФ с привитым селектором на основе QN-L-Leu-L-Ala

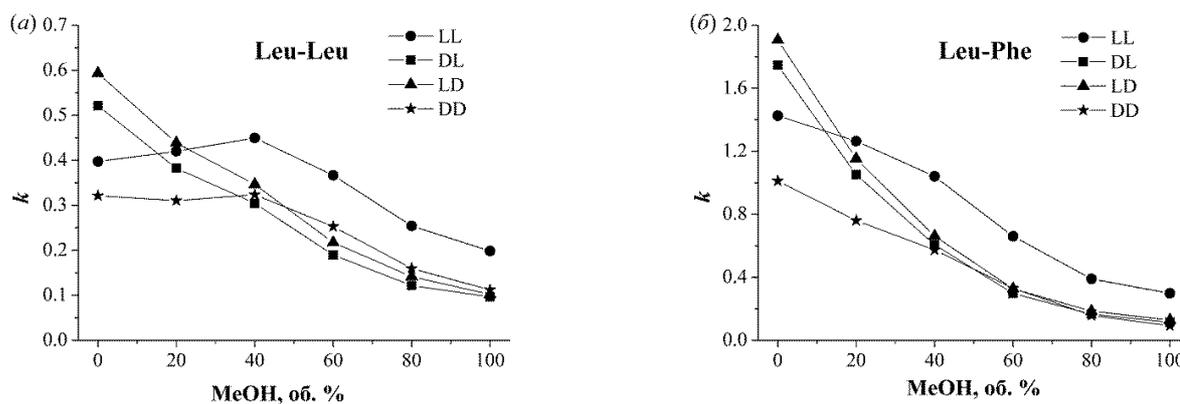


Рисунок 8 – Влияние доли метанола в ПФ на фактор удерживания стереоизомеров Leu-Leu (a) и Leu-Phe (б) на ХНФ с привитым селектором на основе QN-L-Leu-L-Ala

Полученные данные показывают, что хиральные селекторы QN/QD-X-X (где X обозначает остаток аминокислоты) проявляют схожую энантиоселективность по отношению к стереоизомерам дипептидов, как и хиральные селекторы типа ZWIX(A). На всех исследуемых цвиттер-ионных ХНФ на основе производных хининовых алкалоидов достигается лучшее разделение энантиомеров дипептидов, у которых обе аминокислоты содержат крупные боковые группы (Leu-Leu, Leu-Phe). Тип зависимости фактора удерживания от доли органического растворителя в элюенте в значительной мере определяется гидрофобностью анализата и меняется от убывающей зависимости для гидрофобных пептидов к возрастающей зависимости для

гидрофильных пептидов через U-образные кривые для пептидов с промежуточной гидрофильностью, хотя наблюдаются незначительные отклонения от этого правила, вызванные влиянием стереоселективных взаимодействий.

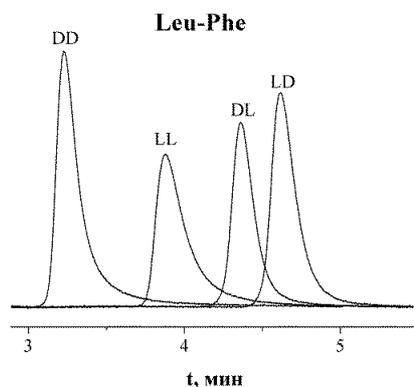


Рисунок 9 – Хроматограммы стереоизомеров Leu-Phe на ХНФ с привитым селектором на основе QN-L-Leu-L-Ala. ПФ: H_2O , $2 \cdot 10^{-4}$ М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

Пятая глава описывает результаты изучения динамики адсорбции ряда дипептидов на колонках Chirobiotic R, Chirobiotic V и QN-L-Ala-L-Leu. На рис. 10 представлены кривые ван Деемтера обоих энантиомеров Gly-Leu и L-Leu-Gly на колонке Chirobiotic R. Видно, что все кривые имеют выпуклую вверх форму, хотя кривизна не является сильной и едва различима в случае слабо удерживаемых Gly-L-Leu и L-Leu-Gly.

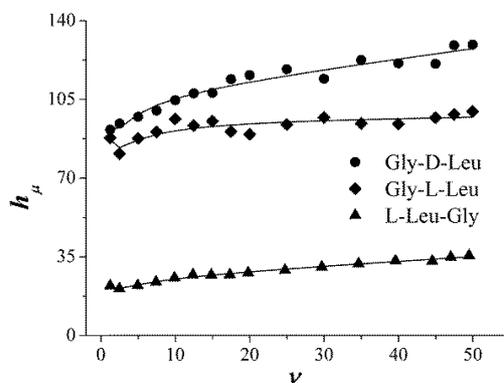


Рисунок 10 – Зависимости приведенной ВЭТТ от приведенной скорости потока для Gly-L-Leu, Gly-D-Leu и L-Leu-Gly. Символы представляют экспериментальные данные, линии показывают аппроксимации по уравнению ван Деемтера-Гиддингса. ПФ: $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (80:20, об/об), $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0.0002 моль/л)

Экспериментальные параметры массопереноса, относящиеся к продольной диффузии (B) и трансколоночной вихревой диффузии (λ_3 , ω_3) необычайно высоки (табл. 1), в то время как коэффициенты ($C_s + C_{ads}$) имеют обычные для хиральной хроматографии значения. Если пренебречь поверхностной диффузией, верхний теоретический предел коэффициента B должен

иметь значение 2, однако экспериментальные величины во много раз превышают этот предел даже для слабо удерживаемых соединений, указывая на существование дополнительного источника размывания хроматографического пика, способствующего кажущемуся увеличению коэффициента продольной диффузии.

Сравнение результатов, полученных с энантиомерами Gly-Leu, показывает, что сильнее удерживаемый D-энантиомер характеризуется большим размыванием пика, чем L-энантиомер. Это различие обусловлено кинетическим термом, поскольку параметры аксиальной дисперсии (B , λ_3 и ω_3) для энантиомеров сопоставимы.

Таблица 1 – Константы адсорбционного равновесия и коэффициенты уравнения ван Деемтера-Гиддингса на колонке Chirobiotic R для L-Leu-Gly и энантиомеров Gly-Leu

Дипептид	K , см ³ /см ³	B	λ_3	ω_3	$C_s + C_{ads}$
Gly-D-Leu	3.60	58	58	80	0.270
Gly-L-Leu	1.14	63	52	60	0.041
L-Leu-Gly	1.02	14	12	13	0.193

Кривая ван Деемтера для L-Leu-Gly лежит значительно ниже кривой для Gly-L-Leu (рис. 9), несмотря на то что факторы удерживания этих дипептидов почти совпадают, как и объемные коэффициенты диффузии. Очевидно, это связано с тем, что скорость адсорбции (или десорбции) Gly-L-Leu ниже, чем у L-Leu-Gly, хотя коэффициенты, приведенные в таблице 1, могут создать впечатление, что продольная диффузия и вихревая диффузия ответственны за отличие в динамике адсорбции этих анализируемых веществ. Однако физико-химические свойства, определяющие продольную и вихревую диффузию этих дипептидов, одинаковы, тогда как способы связывания селектора с хиральными молекулами, определяющие кинетику адсорбции, могут отличаться. Можно предположить, что часть трансколочной вихревой диффузии, зависящая от удерживания, пропорциональна $1/\nu$ и таким образом включается в B -терм.

Необычная выпуклая форма кривых ван Деемтера не может быть объяснена кинетическим C -термом уравнения ван Деемтера-Гиддингса. Два эмпирических факта указывают на то, что такая форма обусловлена влиянием кинетики адсорбции/десорбции на вихревую диффузию:

1. Явление наблюдается или сильнее выражено для прочнее удерживаемых соединений, и в случае пары энантиомеров для прочнее удерживаемого энантиомера;

2. Из двух соединений с одинаковым удерживанием, одно с более медленной кинетикой адсорбции демонстрирует более выпуклую форму кривых ван Деемтера и имеет более высокие кажущиеся коэффициенты аксиальной дисперсии.

Также была изучена динамика адсорбции энантиомеров Leu-Leu и, для сравнения, слабо удерживаемого Gly-Gly на колонках Chirobiotic R и Chirobiotic V (рис. 11). Поскольку известно, что кинетика связывания дипептидов на ристоцитине А медленнее, чем на ванкомицине, это позволило выяснить влияние кинетики адсорбции на особенности размывания пиков дипептидов на антибиотиковых колонках и, в частности, на необычную форму кривых ван Деемтера.

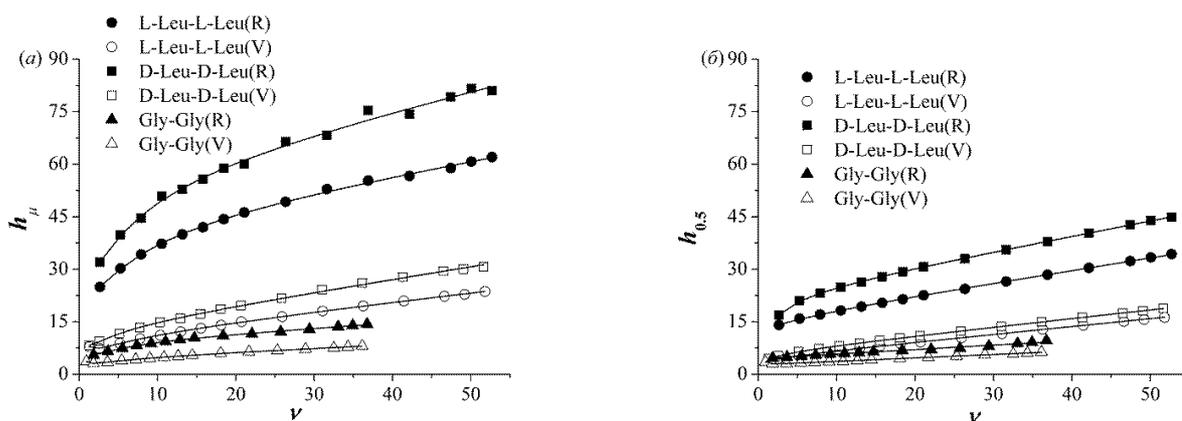


Рисунок 11 – Зависимости приведенной ВЭТТ, рассчитанной через моменты пика (а) и методом полувысоты (б), в зависимости от приведенной скорости потока для стереоизомеров (LL, DD) Leu-Leu и Gly-Gly. ПФ: MeOH–H₂O (10:90, об/об), CH₃COONH₄ (0.0002 моль/л)

Указанные кривые для всех исследуемых дипептидов на обеих колонках имеют выпуклую форму. Следует отметить, что зависимости для приведенной ВЭТТ, рассчитанной по ширине на половине высоты пика ($h_{0.5}$), имеют менее выраженную выпуклую форму (рис. 11б), чем таковые, рассчитанные через моменты пика (h_{μ}), которые находили численным интегрированием пиков между точками, соответствующими 1% высоты пика. Очевидно, необычная форма графиков ван Деемтера, наблюдаемая на рис. 11а, связана с асимметрией пиков, которая значительно влияет на численные значения моментов и соответственно на h_{μ} , тогда как величина $h_{0.5}$ определяется на уровне 50% высоты пика, где влияние асимметрии слабо заметно.

Кривые ван Деемтера всех исследуемых веществ на колонке Chirobiotic V лежат значительно ниже, чем на колонке Chirobiotic R (рис. 11), указывая на более высокую эффективность массопереноса на Chirobiotic V. Кроме того, степень кривизны зависимостей ван Деемтера на колонке Chirobiotic V меньше. Данные таблицы 2 показывают, что параметры

массопереноса, относящиеся к продольной диффузии (B) и трансколочной вихревой диффузии (λ_3, ω_3) для Chirobiotic V в несколько раз ниже, чем для Chirobiotic R, хотя все еще необычно высоки. Наблюдаемые значения суммарного кинетического параметра ($C_s + C_{ads}$) находятся в согласии с более быстрой кинетикой адсорбции на Chirobiotic V (C_{ads} обратно пропорционален k_{ads}), а факт существенно больших значений ВЭТТ удерживаемых дипептидов на ванкомициновой по сравнению с ристоцетиновой ХНФ подтверждает гипотезу о том, что параметры B, λ_3 и ω_3 представляют собой кажущиеся коэффициенты, объединенные с эффектами, возникающими в результате медленной кинетики адсорбции.

Таблица 2 – Константы адсорбционного равновесия и коэффициенты уравнения ван Деемтера-Гиддингса на колонках Chirobiotic V, Chirobiotic R для Gly-Gly и энантиомерной пары LL/DD

Leu-Leu

Дипептид	$K,$ $\frac{\text{см}^3}{\text{см}^3}$	B	λ_3	ω_3	$C_s + C_{ads}$
Chirobiotic V					
L-Leu-L-Leu	1.57	5.1	5.1	2.7	0.245
D-Leu-D-Leu	1.86	4.5	6.8	4.6	0.322
Gly-Gly	0.49	2.3	2.0	1.4	0.095
Chirobiotic R					
L-Leu-L-Leu	1.91	20	26	9	0.275
D-Leu-D-Leu	2.77	23	30	13	0.500
Gly-Gly	0.46	3.1	4.8	2.9	0.119

Для оценки влияния природы селектора на особенности поведения кривых ван Деемтера была изучена динамика адсорбции Gly-Gly и энантиомерных пар LL/DD Leu-Leu и Leu-Phe на ХНФ с привитым QN-L-Ala-L-Leu (рис. 12).

Интересно, что на ХНФ на основе аддукта хинина с дипептидом L-Ala-L-Leu, зависимости ван Деемтера для всех дипептидов (кроме Gly-Gly) имеют классическую форму. Также стоит отметить, что выпуклая вверх форма зависимостей ван Деемтера наблюдается только для Gly-Gly, хотя он практически не удерживается на данной ХНФ. На антибиотиковых ХНФ наблюдалась противоположная картина: для Gly-Gly выпуклость была менее выражена.

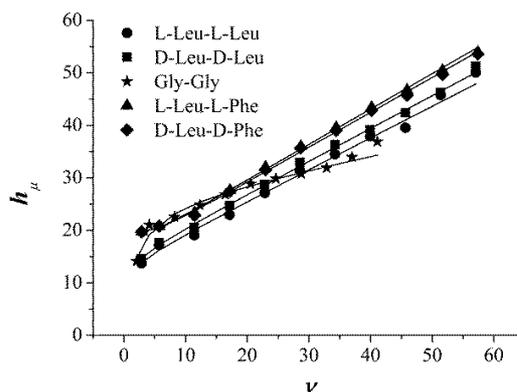


Рисунок 12 – Зависимости приведенной ВЭТТ от приведенной скорости потока для Gly-Gly и энантиомерных пар LL/DD Leu-Leu и Leu-Phe. ПФ: MeOH–H₂O (40:60, об/об), CH₃COONH₄ (0.0002 M)

Таблица 3 – Константы адсорбционного равновесия и коэффициенты уравнения ван Деемтера-Гиддингса на ХНФ QN-L-Ala-L-Leu для Gly-Gly и энантиомерных пар LL/DD Leu-Leu и Leu-Phe

Дипептид	K , см ³ /см ³	B	λ_3	ω_3	C_s+C_{ads}
L-Leu-L-Leu	1.71	1.5	6.5	188	0.50
D-Leu-D-Leu	1.33	0.03	7.1	205	0.52
L-Leu-L-Phe	4.59	12.1	6.9	58	0.56
D-Leu-D- Phe	2.15	9.2	7.5	71	0.55
Gly-Gly	0.20	0.0	13.2	20	0.21

Из таблицы 3 видно, что параметры массопереноса, относящиеся к трансколонной вихревой диффузии (λ_3 , ω_3) на данной колонке также имеют очень высокие значения. Коэффициенты B Gly-Gly и энантиомеров Leu-Leu имеют обычные для хиральной хроматографии значения, однако для сильно удерживаемых на данной ХНФ Leu-Phe величины B в несколько раз выше.

Таким образом, можно сделать вывод, что необычная (выпуклая вверх) форма кривых ван Деемтера обусловлена особенностями кинетики связывания хирального селектора с анализируемыми веществами. В таких случаях зависимость термина трансколонной вихревой диффузии от скорости потока является более сложной чем это предполагается теорией Гиддингса, а на параметры аксиальной дисперсии B , λ_3 и ω_3 оказывает влияние медленная кинетика адсорбции/десорбции.

ВЫВОДЫ

1. Установлены закономерности хроматографического разделения и удерживания стереоизомеров дипептидов на ХНФ на основе производных хинина и хинидина. Показано, что тип зависимости фактора удерживания от доли органического растворителя в элюенте в значительной мере определяется гидрофобностью аналита. На всех исследуемых ХНФ гидрофильные дипептиды характеризуются возрастающими зависимостями фактора удерживания от содержания метанола, гидрофобные дипептиды – U-образными зависимостями на ХНФ типа ZWIX(A) и нелинейно убывающими зависимостями на ХНФ с селекторами на основе аддуктов хинина/хинидина с дипептидами. Дипептиды с промежуточной гидрофильностью характеризуются U-образными или более сложными немонотонными зависимостями. Наличие солевых добавок в составе ПФ приводит к значительному снижению удерживания дипептидов и уменьшению коэффициентов разделения вследствие экранирования заряженных групп селектора ионами соли.
2. Продемонстрировано влияние структуры хирального селектора и дипептидов на разделение их стереоизомеров. Установлено, что на исследуемых цвиттерийонных ХНФ центр хирального распознавания связан с алкалоидным фрагментом, тогда как природа бокового (неалкалоидного) фрагмента не вносит качественных изменений в свойства ХНФ, но может влиять на количественные характеристики удерживания и разделения энантиомеров, причем лучшее энантиоразделение наблюдается для дипептидов, состоящих из аминокислотных остатков с более крупными или ароматическими боковыми группами.
3. Изучена динамика адсорбции ряда дипептидов на ХНФ Chirobiotic R, Chirobiotic V и на ХНФ с привитым селектором QN-L-Ala-L-Leu. Показано, что дипептидные адсорбаты, которые характеризуются более медленной кинетикой адсорбции на ХНФ демонстрируют более выраженное искажение зависимостей ван Деемтера и более высокие кажущиеся коэффициенты аксиальной дисперсии.
4. Изучена адсорбция смесей вода–метанол и вода–ацетонитрил на ХНФ Chirobiotic R, Chirobiotic T, QN-L-Ala-L-Leu и ZWIX(-A)). Показано, что исследованные ХНФ являются гидрофильными материалами, на поверхности которых формируется мономолекулярный адсорбционный слой в контакте со смесью H_2O –MeOH и полимолекулярный слой для смеси H_2O –MeCN. Данные ХНФ характеризуются качественно одинаковыми закономерностями адсорбции водно-органических смесей, описываемых изотермами адсорбции с точкой адсорбционного азеотропа, и отличаются только в количественных показателях адсорбции.

Основное содержание диссертации опубликовано в работах:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК:

1. Asnin L.D., Korpchenova M.V., Vozisov S.E., Klochkova M.A., **Klimova Y.A.** Enantioselective retention mechanisms of dipeptides on antibiotic-based chiral stationary phases. II. Effect of the methanol content in the mobile phase // Journal of Chromatography A. – 2020. – V. 1626. – N 461371.
2. **Klimova Y.A.**, Asnin L.D. Enantioselective adsorption dynamics of leucyl-leucine in a Chirobiotic R column // Journal of Chromatography A. – 2021. – V. 1635. – N 461771.
3. **Климова Я.А.**, Аснин Л.Д. Адсорбция бинарных растворителей на хиральных неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками // Журнал физической химии. – 2021. – Т. 95. – №. 11. – С. 1739–1745.
4. Asnin L., Herciková J., Lindner W., **Klimova Y.**, Ziganshina D., Reshetova E., Kohout M. Chiral separation of dipeptides on Cinchona-based zwitterionic chiral stationary phases under buffer-free reversed-phase conditions // Chirality. – 2022. – V. 34. – No. 8. – P. 1065–1077.
5. Asnin L.D., Ziganshina D.I., **Klimova Y.A.**, Reshetova E.N., Tůma J., Kohout M. Chiral zwitterionic stationary phases based on Cinchona alkaloids and dipeptides: Application in chiral separation of dipeptides under reversed phase conditions // Journal of Chromatography A. – 2024. – V. 1726. – N 464966.
6. **Klimova Y.A.**, Asnin L.D. Comparison of the adsorption dynamics of leucyl-leucine enantiomers and glycyl-glycine on Chirobiotic R and Chirobiotic V columns // Journal of Chromatography Open. – 2024. – V. 6. – N 100152.

Другие публикации:

1. **Климова Я.А.**, Аснин Л.Д. Точность эмпирических уравнений для оценки коэффициентов молекулярной диффузии // Химия. Экология. Урбанистика. – 2020. – Т. 2. – С. 89–93.
2. **Климова Я.А.** Сравнительная оценка методов расчета второго центрального момента хроматографических пиков // Материалы Междунар. молодеж. науч. форума «Ломоносов-2020». – Москва. – 2020. – [Электронный ресурс].
3. **Климова Я.А.**, Аснин Л.Д. Коэффициенты диффузии лейцил-глицина и глицил-лейцина в водно-метанольных растворах // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. – 2021. – №. 3. – С. 22–32.

4. Зиганшина Д.И., **Климова Я.А.**, Аснин Л.Д. Разделение стереоизомеров дипептидов на хиральных цвиттерионных колонках // Материалы IV Всерос. симп. «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». – Краснодар. – 2021. – С. 19.

5. **Климова Я.А.**, Аснин Л. Д. Особенности массопереноса энантиомеров глициллейцина в хиральной колонке Chirobiotic R // Материалы IV Всерос. симп. «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». – Краснодар. – 2021. – С. 53.

6. Зиганшина Д.И., **Климова Я.А.**, Аснин Л.Д. Закономерности удерживания и разделения стереоизомеров дипептидов на энантиоселективных неподвижных фазах с привитыми цвиттерионными хиральными селекторами // Химия. Экология. Урбанистика. – 2022. – Т. 2. – С. 56–60.

7. Зиганшина Д.И., **Климова Я.А.**, Морева Е.А., Барашкова А.С., Аснин Л.Д. Разделение стереоизомеров дипептидов на цвиттерионных хиральных неподвижных фазах // Материалы XXV Междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке». – Томск. – 2023. – Т. 1. – С. 504–505.

8. **Климова Я.А.**, Барашкова А.С., Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Закономерности энантиоселективного разделения стереоизомеров Leu-Phe и Leu-Leu на хиральных неподвижных фазах на основе производных хинидина // Материалы XXV Междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке». – Томск. – 2023. – Т. 1. – С. 405–406.

9. **Климова Я.А.**, Барашкова А.С., Зиганшина Д.И., Морева Е.А., Аснин Л.Д. Энантиоселективное разделение стереоизомеров дипептидов на хиральных неподвижных фазах на основе производных хининовых алкалоидов // Химия. Экология. Урбанистика. – 2023. – Т. 1. – С. 298–302.