

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

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

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

Пермь 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Теории хирального распознавания	11
1.2. Механизмы удерживания в жидкостной хроматографии.....	15
1.2.1. Характеристики хроматографического удерживания.....	15
1.2.2. Адсорбционный механизм	16
1.2.3. Распределительный механизм	18
1.2.4. Сольвофобная теория удерживания.....	19
1.2.5. Ионообменный механизм.....	20
1.2.6. Особенности механизмов удерживания в хиральной хроматографии	21
1.2.7. Влияние концентрации элюируемого вещества на фактор удерживания.....	24
1.2.8. Влияние вторичных равновесий на механизм удерживания	25
1.2.8.1. Сольватация	26
1.2.8.2. Особенности удерживания слабых электролитов.....	28
1.3. Динамика адсорбции в хиральной хроматографии.....	29
1.3.1. Общие закономерности динамики адсорбции	29
1.3.2. Модельное описание динамики адсорбции.....	35
1.3.2.1. Общая модель процесса элюирования	35
1.3.2.2. Смешанно-диффузионные модели	36
1.3.2.3. Транспортно-дисперсионная модель.....	37
1.3.2.4. Равновесно-дисперсионная модель	38
1.3.2.5. Численное решение уравнений динамики адсорбции	38
1.3.3. Особенности динамики адсорбции в хиральной хроматографии	41
1.4. Хиральные неподвижные фазы.....	43
1.4.1. Хиральные неподвижные фазы на основе макроциклических гликопептидных антибиотиков.....	47

1.4.2. Хиральные неподвижные фазы на основе производных хининовых алкалоидов	56
1.5. Удерживание дипептидов на хиральных неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками	61
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА	64
2.1. Реактивы и материалы	64
2.1.1. Хроматографические колонки	64
2.1.2. Реактивы и растворители для приготовления подвижных фаз	66
2.1.3. Дипептиды	66
2.2. Оборудование	67
2.3. Определение мертвого объема колонки и характеристик пористости слоя неподвижной фазы	68
2.4. Измерение изотерм адсорбции бинарных растворителей на хиральных неподвижных фазах	68
2.5. Измерение хроматографического удерживания дипептидов	71
2.6. Изучение динамики адсорбции	71
2.6.1. Измерение коэффициентов диффузии дипептидов в подвижных фазах	71
2.6.2. Измерение кривых ван Деемтера и определение параметров массопереноса	72
2.6.3. Математическое моделирование процесса элюирования	75
ГЛАВА 3. АДСОРБЦИЯ БИНАРНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА ХИРАЛЬНЫХ НЕПОДВИЖНЫХ ФАЗАХ С ПРИВИТЫМИ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИМИ АНТИБИОТИКАМИ	78
3.1. Изотермы избыточной адсорбции воды	79
3.2. Коэффициенты активности в адсорбционной фазе	81
ГЛАВА 4. ХИРАЛЬНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ДИПЕПТИДОВ НА ХИРАЛЬНЫХ НЕПОДВИЖНЫХ ФАЗАХ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ	84
4.1. Удерживание и разделение дипептидов на хиральных неподвижных фазах ZWIX(+A) и ZWIX(-A)	84
4.1.1. Влияние состава подвижной фазы	84
4.1.1.1. Метанол-вода	84

4.1.1.2. Ацетонитрил–метанол	89
4.1.1.3. Буферные системы	92
4.2. Удерживание и разделение дипептидов на хиральных неподвижных фазах АК56, АК57, АК59	95
4.2.1. Влияние состава подвижной фазы	95
4.2.1.1. Метанол–вода	95
4.2.1.2. Ацетонитрил–вода	103
ГЛАВА 5. ДИНАМИКА АДСОРБЦИИ ДИПЕПТИДОВ	106
5.1. Коэффициенты молекулярной диффузии дипептидов в водно-метанольных растворах	106
5.2. Анализ кривых ван Деемтера	107
5.2.1. Gly-Leu и Leu-Gly на колонке Chirobiotic R.....	107
5.2.2. Leu-Leu и Gly-Gly на колонках Chirobiotic R и Chirobiotic V	112
5.2.3. Leu-Leu, Leu-Phe и Gly-Gly на колонке АК57	116
5.3. Численное моделирование.....	121
ВЫВОДЫ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ПФ – подвижная фаза

ХНФ – хиральная неподвижная фаза

ВЭТТ – высота эквивалентная теоретической тарелке

ТГФ – тетрагидрофуран

QN – хинин

QD – хинидин

ОКГЭ – ортогональные коллокации на граничных элементах

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. 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 аминоклогексансульфоновой кислоты (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. Выяснено 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 рН 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Хиральностью называют свойство молекулы быть несовместимой со своим отражением при любой комбинации вращений и перемещений в трехмерном пространстве. В хиральных молекулах чаще всего присутствует ассиметричный (хиральный) атом, обычно это атом углерода, связанный с четырьмя разными заместителями. Такие молекулы могут существовать в двух формах, которые называют энантиомерами. Энантиомеры проявляют оптическую активность – вращают плоскость поляризации плоскополяризованного света в разных направлениях и обозначаются соответственно символами (+) – правовращающий, и (–) – левовращающий. Другой способ обозначения, рекомендованный для аминокислот [1] связан с отнесением данной аминокислоты к ряду D- или L-глицеринового альдегида. Эквимолярная смесь двух форм называется рацемической и не проявляет оптической активности. Первым экспериментально доказал существование оптической изомерии Луи Пастер в экспериментах по разделению рацемической смеси тартрата натрия-аммония на индивидуальные энантиомеры [2]. Позже в работах Пастера, Фишера и др. было продемонстрировано, что многие ферменты катализирующие различные метаболические процессы являются энантиоселективными, так как взаимодействуют только с одной энантиомерной формой хиральных субстратов [3; 4].

Природные хиральные вещества, как правило, существуют только в одной энантиомерной форме. Аминокислоты чаще имеют L-конфигурацию, D-энантиомеры встречаются редко [5; 6].

Так как большинство метаболических процессов протекает либо с участием хиральных веществ, либо в хиральном окружении, действие синтетических хиральных веществ также будет иметь энантиоселективный характер. Как правило, только один из энантиомеров в организме проявляет требуемую биологическую активность, а второй либо является неактивным или вызывает нежелательные побочные эффекты. Соответственно коммерческий смысл имеет производство именно активного энантиомера. Обычными методами химического синтеза получают рацемические смеси; применение стереоселективных методов химического или биохимического синтеза также не приводит к получению 100% чистого энантиомера. Это диктует необходимость создания методов разделения оптических изомеров для их препаративного выделения в чистом виде и для контроля состава энантиомерных смесей. Многие нативные хиральные соединения, в том числе и дипептиды, могут служить биомаркерами различных процессов в организме, поэтому в физиологических и фармацевтических исследованиях также возникает необходимость определения качественного и количественного состава энантиомерных смесей [3].

Хиральная хроматография – наиболее популярный метод разделения энантиомеров, который может применяться как для аналитических, так и для препаративных целей [7; 8]. Высокая скорость процесса, быстрота разработки и оптимизации методик разделения, высокая степень автоматизации, а также возможность получения целевого компонента с высокой степенью чистоты являются преимуществами данного метода. В хиральной хроматографии разделение осуществляется за счет образования диастереомерных комплексов¹ между разделяемыми энантиомерами и хиральным агентом, который может быть иммобилизован на неподвижной фазе или быть добавлен в подвижную фазу (прямая хиральная хроматография), либо прореагировать с разделяемой смесью до ввода в хроматографическую колонку (косвенная хиральная хроматография). Метод косвенной хиральной хроматографии характеризуется серьезным недостатком, объясняющим его невысокую популярность. Он требует дополнительной стадии дериватизации разделяемой смеси, причем реакция дериватизации должна обеспечивать 100% выход и исключать вероятность рацемизации [9]. В случае препаративной хроматографии требуется извлечение энантиомеров из дериватов после их разделения. Прямая хиральная хроматография может осуществляться либо на ХНФ, либо на ахиральных неподвижных фазах с добавлением хирального агента в подвижную фазу. Последний прием не нашел широкого распространения, поскольку связан с большим расходом хиральных добавок, которые являются дорогостоящими веществами и, кроме того, мешают детектированию анализируемых компонентов. Таким образом, наиболее популярным методом хроматографического разделения оптических изомеров является прямое разделение на ХНФ. Теоретическим основам применения этого метода для разделения стереоизомеров дипептидов и посвящено настоящее диссертационное исследование.

1.1. Теории хирального распознавания

Хроматографическое энантиоразделение основано на образовании диастереомерных комплексов между разделяемыми энантиомерами, находящимися в ПФ, и хиральным селектором, привитым к поверхности неподвижной фазы. Так как селектор находится в одной стереохимической конфигурации, а энантиомеры в разных, образующиеся поверхностные комплексы будут являться по отношению друг к другу диастереомерами. Диастереомерные комплексы характеризуются различной прочностью связи, что приводит к разделению оптических изомеров, благодаря различию их времени выхода из хроматографической колонки. Селективное взаимодействие молекулы хирального селектора с энантиомерами называется хиральным распознаванием.

¹ Диастереомеры – изомеры, которые содержат более одного хирального атома и не являются зеркальными отражениями друг друга.

Хронологически первая модель хирального распознавания была предложена в 1933 г. Иссоном и Штедманом для объяснения стереоселективного связывания хиральных молекул с белковым рецептором [10]. Согласно этой модели для хирального распознавания необходимо, чтобы субстрат и селектор взаимодействовали не менее чем в трех точках (рис. 1.1). Данная теория сформулирована на основе следующих геометрических соображений. Простейшей фигурой, несоответствующей своему зеркальному отражению является треугольник с неравными вершинами (на рис. 1.1. они обозначены разными буквами). Данное свойство отсутствует у точки или отрезка, поэтому взаимодействия в одной или двух точках недостаточно для энантиоселективного взаимодействия.

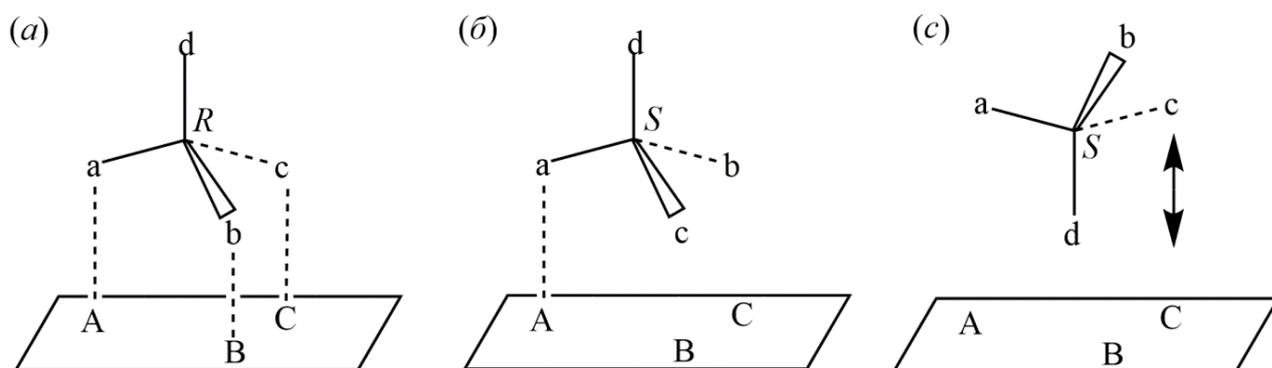


Рис. 1.1. Модель Иссона и Штедмана. Центры связывания трех заместителей (a, b, c) у тетраэдрического атома углерода обозначены как A, B и C соответственно. (a) Энантиомер R может связываться во всех трех точках. (б) Энантиомер S органичен одной точкой контакта. (c) Альтернативная возможность связывания S-энантиомера исключена из-за стерических затруднений, вызванных наличием d-группы, так как расстояния a–A, b–B и c–C слишком велики, чтобы обеспечить связывание [9]

Позже Огстон предложил аналогичную модель для ферментативных реакций [11], в которой допустил, что все три взаимодействия являются притягивающими, в то время как в модели Иссона и Штедмана характер сил, обуславливающих взаимодействие в трех точках, не имеет значения. Далглиш применил концепцию трехточечного взаимодействия для объяснения энантиоселективной адсорбции ароматических аминокислот на целлюлозе [12]. Он предположил, что для энантиоселективного взаимодействия молекула энантиомера должна обладать тремя различными функциональными группами, образующими связи с тремя точками на поверхности адсорбента, которые удалены друг от друга.

Модели Огстона и Иссона-Штедмана содержали неявное предположение, что субстрат может приближаться к поверхности хирального рецептора только с одной стороны. Необходимость такого условия была подчеркнута Вилкоксом и соавторами [13]. Месекар и

Кошланд расширили модель Иссона-Штедмана, предполагая, что энантиомеры могут приближаться к центру связывания с противоположных сторон (рис. 1.2) [14; 15]. Расширенная модель актуальна для распознавания энантиомеров в реальной структуре белка. В ней группы a, b, c у разных энантиомеров занимают одни и те же центры связывания, тогда как группы d направлены в разные стороны, поэтому точки D' и D'' являются определяющими для процесса разделения. Модель «четырёх локаций» предполагает, что разделение энантиомеров осуществляется, если имеется три точки связывания, комплементарных трем фрагментам в структуре энантиомеров, а также четвертая «локация», которая может быть или точкой связывания, или набором стерических препятствий, задающих молекуле энантиомера определенное направление в структуре селектора.

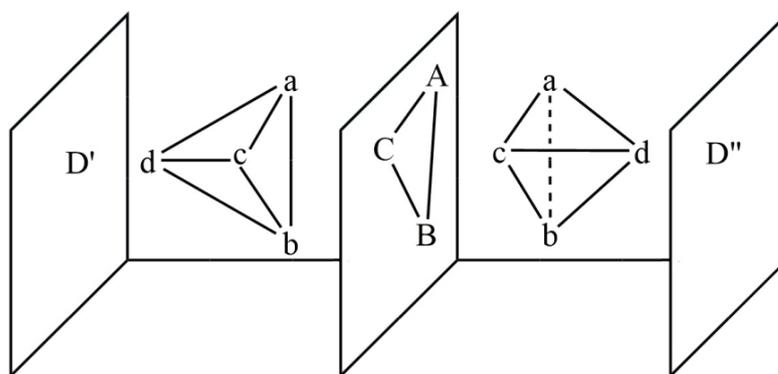


Рис. 1.2. Модель Месекара и Кошланда (модель «четырёх локаций»)

Близкие взгляды высказывал Бентли, который в 2003 г. предложил свою концепцию стереоселективного четырехточечного взаимодействия [16]. Согласно этой концепции, визуализация которой представлена на рис. 1.3, центр связывания D находится в плоскости, перпендикулярной центрам связывания A, B и C. При этом одна из групп субстрата обладает «гибкостью» за счет присутствия группы CH_2 между хиральным центром и одной из связывающих групп. Такой субстрат будет представлен как $\text{Cab}(-\text{CH}_2-\text{c})\text{d}$. Данная трехмерная модель позволяет связывать только один энантиомер Cabcd (рис. 1.3a). При этом оба энантиомера $\text{Cab}(-\text{CH}_2-\text{c})\text{d}$ могут связываться в точках A, C и D (рис. 1.3б), однако хиральное распознавание возможно только благодаря четвертому контакту между CH_2 -группой и точкой B селектора.

Проблему хирального распознавания пытались решить и с формальной физико-математической точки зрения. Салем предложил модель, основанную на рассмотрении дифференциальных энергий взаимодействия, рассчитываемых между двумя гомо- и гетерохиральными тетраэдрическими молекулами. Он показал, что за хиральное распознавание ответственны шестицентровые силы, возникающие одновременно между тройками атомов (по одному триплету в каждой молекуле) (рис. 1.4) [17].

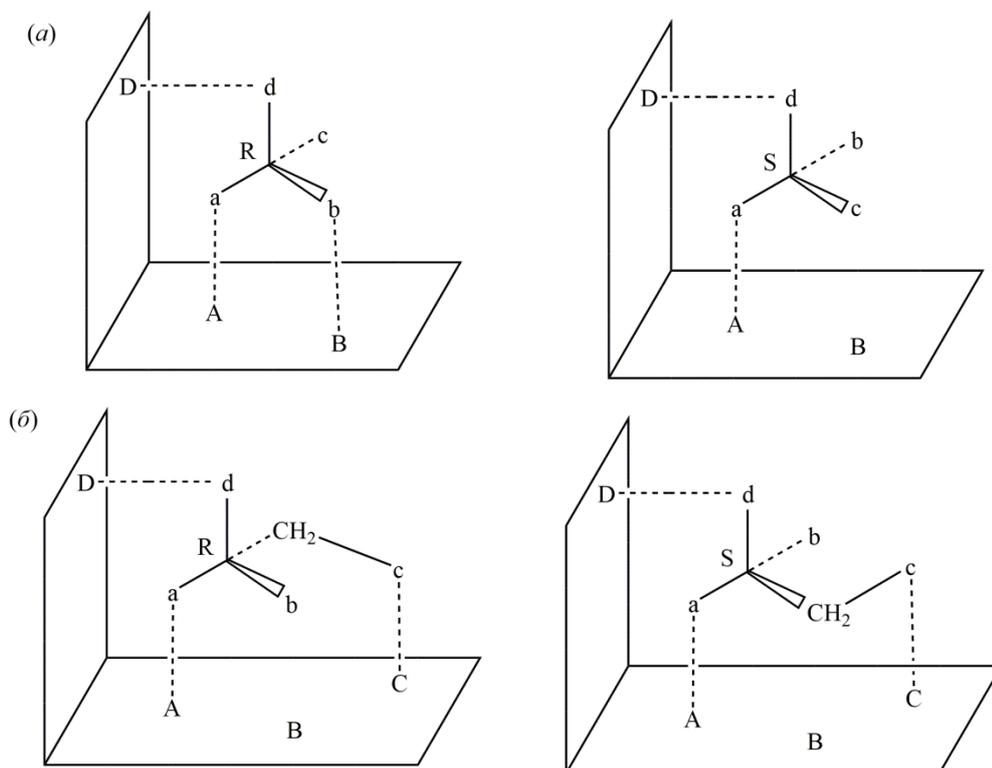


Рис. 1.3. Модель Бентли. (а) Только *R* энантиомер $Cabcd$ может связываться с тремя центрами *A*, *B* и *D*; *S* энантиомер ограничен двумя центрами *A* и *D*. (б) Оба энантиомера $Cab(-CH_2-c)d$ могут связываться с центрами *A*, *C* и *D*, хиральное распознавание осуществляется благодаря четвертому контакту между CH_2 -группой и точкой *B* селектора

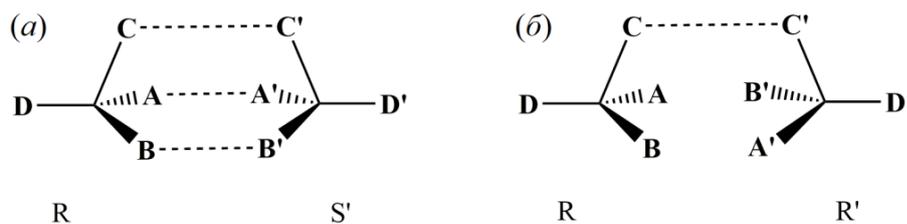


Рис. 1.4. Модель Салема. В данной модели шестичентровые силы возникают между одинаковыми парами атомов энантиомеров, что приводит к $R \rightarrow S'$ взаимодействию (а). Такое взаимодействие невозможно для случая (б)

Модель Салема подверглась критике со стороны Топиоля и Сабио, которые расширили ее до восьмицентровой модели взаимодействия [18]. При этом авторы указали, что взаимодействия в четырех точках контакта могут быть как притягивающими, так и отталкивающими. В более поздней статье Топиоль предложил более общий критерий

хирального распознавания [19]. В качестве такого критерия выступает неравенство матриц расстояний диастереомерных комплексов хиральных соединений с селектором.

Восьмицентровые (четырёхточечные) модели не получили широкого распространения для объяснения хирального распознавания на твердой поверхности и до сих пор для этой цели чаще используется модель трехточечного взаимодействия, несмотря на ее вышеобозначенные теоретические ограничения. Кроме того, классическая трехточечная модель не учитывает конформационную гибкость селектора и адсорбата [20]. Неоднократно предпринимались попытки улучшить «правило трех точек» Иссона-Штедмана и Огстона, оставаясь в рамках концепции шестицентровых взаимодействий. Пиркл и Почапски переформулировали его на «правило трех взаимодействий» согласно которому для «хирального распознавания необходимо минимум три одновременных взаимодействия между ХНФ и по меньшей мере одним из энантиомеров, причем по меньшей мере одно из этих взаимодействий должно быть стереохимически зависимым» [21]. Авторы указывали на недопустимость механистического толкования термина «взаимодействие» как связи между двумя точками, так как многие типичные для хиральной хроматографии взаимодействия по своей природе многоточечные, например, π - π взаимодействия между бензольными кольцами, которые в рамках трехточечной модели рассматриваются как одна связь. Они также, как позднее Даванков [22], рассматривали отталкивающие взаимодействия как продуктивные со стереохимической точки зрения. Так, например, «из трех требуемых взаимодействий два могут быть отталкивающими, если третье взаимодействие достаточно сильное, чтобы способствовать образованию по меньшей мере одного из двух возможных диастереомерных ассоциатов» [22]. Даванков и Курганов показали, что для достижения хирального распознавания достаточно двух точек взаимодействия разделяющего агента с энантиомерами при условии, что образуемые диастереомерные аддукты, дополнительно взаимодействуют с нехиральным участком ХНФ [23]. На процесс хирального распознавания также могут оказывать влияние молекулы растворителя, которые составляют микроокружение адсорбционного комплекса [22].

1.2. Механизмы удерживания в жидкостной хроматографии

1.2.1. Характеристики хроматографического удерживания

В хроматографии под удерживанием понимают способность неподвижной фазы в контакте с данной ПФ задерживать движение элюируемого вещества вдоль колонки. Математическим выражением удерживания является фактор удерживания (k) численно равный безразмерному коэффициенту распределения элюируемого вещества между неподвижной и

подвижной фазы. Фактор удерживания связан с константой равновесия процесса переноса вещества из жидкой фазы в неподвижную фазу (K_c) простым соотношением [24]:

$$k = K_c \frac{V_s}{V_m} = K_c \phi \quad (1.1)$$

где V_s и V_m – объемы неподвижной и подвижной фаз соответственно, а ϕ – фазовое отношение.

Концентрационная константа равновесия определяется через жидкофазную концентрацию адсорбата (c) и равновесную ей избыточную концентрацию адсорбата в твердой фазе (Γ) как $K_c = \Gamma/c$. Строго говоря, коэффициент K_c не является постоянной величиной в общем случае и в нелинейной области изотермы адсорбции зависит от c , однако в условиях бесконечного разбавления, которые будут применяться в данном исследовании, он может считаться постоянным [25] и равным истинной (термодинамической) константе равновесия. Следует также отметить, что при анализе адсорбционного равновесия с применением стехиометрического подхода используют величину полной, а не избыточной, концентрации адсорбата в твердой фазе (q). В условиях бесконечного разбавления отличием между q и Γ можно пренебречь и принять, что

$$K_c = \lim_{c \rightarrow 0} (q/c) \quad (1.2)$$

Константа равновесия связана со стандартной свободной энергией переноса адсорбата из жидкой фазы в твердую фазу (ΔG^0) или, для краткости, стандартной свободной энергией адсорбции хорошо известным уравнением:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_c \quad (1.3)$$

где R – универсальная газовая постоянная, а T – абсолютная температура.

Отношение факторов удерживания двух энантиомеров определяет их степень разделения [26]:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (1.4)$$

где индексы 1 и 2 обозначают первый и второй элюируемые энантиомеры соответственно. Изучение влияния состава ПФ, температуры, структуры селектора и адсорбатов на значения k и α может дать ценную информацию о природе взаимодействий в хроматографической колонке.

1.2.2. Адсорбционный механизм

Хронологически первую адсорбционную модель удерживания для элюирования неэлектролитов на полярных адсорбентах (силикагель, оксид алюминия) предложил Снайдер [27]. Он количественно описал связь между значением фактора удерживания и свойствами элюента. Согласно его теории, предполагается, что поверхность адсорбента является

энергетически гомогенной и состоит из молекул адсорбата (Z) и молекул элюента (S), которые составляют мономолекулярный слой. Для адсорбции молекулы Z , она должна вытеснить эквивалентное количество молекул S с поверхности адсорбента:

$$Z_m + nS_s = Z_s + nS_m \quad (1.5)$$

где индексы m и s соответствуют подвижной и неподвижной фазе, а n – отношение площадей молекул адсорбата (A_0) и элюента в адсорбционном слое. Согласно модели Снайдера, уравнение, связывающее факторы удерживания веществ в растворителях 1 и 2 имеет следующий вид:

$$\lg(k_2 / k_1) = \alpha' A_0 (\zeta_1 - \zeta_2) \quad (1.6)$$

где α' – параметр активности адсорбента, а ζ – условная сила элюента в некоторой эмпирической шкале. Сила элюента бинарного растворителя ζ_{ab} по Снайдеру рассчитывается по следующему уравнению:

$$\zeta_{ab} = \zeta_a + \frac{\lg(X_b 10^{A_b(\zeta_b - \zeta_a)} + 1 - X_b)}{\alpha' A_b} \quad (1.7)$$

где ζ_a и ζ_b – сила элюента чистого растворителя a и b соответственно, A_b – величина молекулярной площадки растворителя b , X_b – мольная доля растворителя b .

Позже Сочевинский предложил модель для случая, где из двух компонентов бинарной смеси только растворитель b обладает элюирующей силой, а растворитель a является инертным [28]. Модель Сочевинского, предполагающая замещение молекулы растворителя молекулой адсорбата на адсорбционном центре в стехиометрии 1:1, приводит к выражению

$$\lg k = \text{const} - \lg X_b \quad (1.8)$$

Снайдер обобщил модель Сочевинского на более общий случай вытеснения молекулой адсорбата n молекул растворителя (в соответствии с уравнением (1.5)), что дало выражение

$$\lg k = \text{const} - n \lg X_b \quad (1.9)$$

названное впоследствии моделью Снайдера-Сочевинского). Уравнение (1.9) нашло применение в нормально-фазовой хроматографии для систем, состоящих из полярного адсорбента и бинарной ПФ, где один растворитель полярный, а второй неполярный [29]. Так, например, в работе [30] наблюдались линейные зависимости в логарифмических координатах для стереоизомеров имидазолохиназолиндиона на ХНФ на основе карбамата хинина. Модель Снайdera-Сочевинского, как и близкая по смыслу модель Ланина-Никитина [31] предсказывают монотонную зависимость фактора удерживания от концентрации активного компонента ПФ. На практике, однако, нередко встречаются немонотонные зависимости фактора удерживания от состава ПФ. Это обстоятельство попытались объяснить Тсуи с соавторами, добавив в чисто адсорбционную модель Сочевинского сольватацию молекул адсорбата молекулами растворителя в ПФ [32]. Модель Тсуи и др. включает уравнения

взаимодействия растворителя и аналита с адсорбционным центром А (уравнения (1.10) и (1.11) соответственно), а также уравнение образования сольватного комплекса в ПФ (уравнение (1.12)):

$$S + A = S-A \quad (1.10)$$

$$Z + xA = Z-A_x \quad (1.11)$$

$$Z + yS = Z-S_y \quad (1.12)$$

Итоговое уравнение модели Тсуи и др. имеет вид:

$$k = \frac{k_0}{(1 + K_S C_S^y)(1 + K_{SA} C_S)^x} \quad (1.13)$$

где k_0 – фактор удерживания адсорбата измеренный в инертном растворителе в качестве ПФ, C_S – молярная концентрация активного компонента в составе ПФ, K_S и K_{SA} – константы равновесия реакций (1.12) и (1.10) соответственно. Уравнение (1.13) позволяет описывать немонотонные зависимости.

В работе [33] предложена расширенная модель Тсуи и др. [32], которая предполагает участие обоих компонентов бинарного элюента в процессах сольватации и конкурентной адсорбции:

$$Z + uW + vO = Z - W_u - O_v \quad (1.14)$$

$$Z + W_x - O_y - A = Z - A + xW + yO \quad (1.15)$$

где u и v – число молекул воды (W) и органического растворителя (O), участвующих в сольватации адсорбата в ПФ, а x и y – число молекул воды и органического растворителя, вытесняемых адсорбатом с адсорбционного центра.

Для системы уравнений (1.14) и (1.15) выражение зависимости фактора удерживания от состава ПФ имеет следующий вид:

$$k = \frac{q_A \phi K_A}{C_W^x C_O^y (1 + K_S C_W^u C_O^v)} \quad (1.16)$$

где C_W и C_O – молярная концентрация воды и органического растворителя в ПФ, K_S и K_A – константы равновесия процесса сольватации и конкурентной адсорбции соответственно, ϕ – отношение объемов неподвижной и подвижной фаз в колонке и q_A – концентрация адсорбционных центров на поверхности неподвижной фазы.

1.2.3. Распределительный механизм

Распределительный механизм удерживания был предложен для объяснения процессов элюирования в обращенно-фазовой хроматографии на алкилированном силикагеле [34]. Он предполагает, что удерживание вещества осуществляется за счет его распределения между

двумя несмешивающимися объемными фазами, т.е. органический слой хроматографического адсорбента считается объемной фазой. В работе [35] предложена модель, выведенная на основании статистико-термодинамических соображений, которая связывает фактор удерживания с составом водно-органической ПФ:

$$\ln(k / \phi) = \varphi_a \ln(k_a / \phi) + \varphi_b \ln(k_b / \phi) - \varphi_a \varphi_b r \chi_{ab} \quad (1.17)$$

где индексы a и b обозначают растворители в составе бинарной ПФ, φ_a и φ_b – объемные доли этих растворителей, k_a и k_b – факторы удерживания адсорбата в чистом растворителе a и b соответственно, r – структурный параметр адсорбата, а χ_{ab} – параметр взаимодействия компонентов ПФ.

Уравнение (1.17) сложно для практического применения, поэтому оно, как и другие модели, полученные на основании статистико-термодинамического подхода [36; 37] не получили широкого распространения. Более популярными являются эмпирические зависимости, из которых наиболее часто в литературе встречается следующее уравнение, впервые предложенное в работе [38]:

$$\lg k = \lg k_0 - S\varphi_b \quad (1.18)$$

где k_0 – фактор удерживание адсорбата в воде, S – параметр, зависящий от природы аналита.

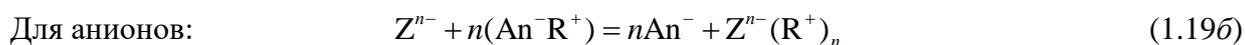
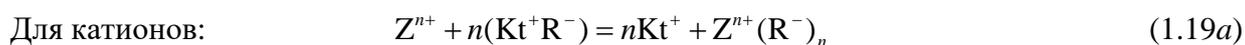
1.2.4. Сольвофобная теория удерживания

Под сольвофобной теорией понимают термодинамический подход, в котором ассоциативный процесс в растворе разбивают на два процесса: ассоциация в газовой фазе и сольватация задействованных частиц в жидкой фазе. Свободная энергия процесса рассчитывается на основании соответствующего термодинамического цикла. Предложенная Синаноглу [39] сольвофобная теория была адаптирована Хорватом с соавторами [40; 41] для описания удерживания в обращенно-фазовой хроматографии, которое они рассматривали как результат взаимодействия молекул аналита с привитыми к поверхности твердого носителя алкильными радикалами, названными лигатами. В рамках этого подхода свободная энергия удерживания (ΔG_R^0) принимается аддитивной функцией следующих энергетических вкладов: (1) образования пустоты в объеме ПФ, в которую помещается молекула адсорбата, (2) взаимодействия адсорбата и компонентов элюента, (3) ассоциации адсорбата и лигатов в газовой фазе, (4) уменьшение вклада (3), благодаря образованию ассоциата в присутствии растворителя, и (5) вклад, связанный с изменением свободного объема ($-RT \ln(RT/V_S)$, где V_S – молярный объем элюента). Каждый терм ΔG_R^0 в свою очередь разбивается на несколько вкладов, описывающих различные типы взаимодействий. Подставляя найденное для свободной

энергии удерживания выражение в формулу $\ln(k/\phi) = -\Delta G_R^0/RT$, получают уравнение, связывающее $\ln k$ с физико-химическими свойствами адсорбата и ПФ. Даже в простом случае неполярного аналита итоговое выражение для $\ln k$ будет иметь сложный вид и большое число (минимум 11 [42]) параметров, часть из которых трудно определить независимыми методами. По этой причине сольвофобная теория не используется в количественных расчетах, но периодически привлекается для объяснения экспериментальных закономерностей хроматографического удерживания на качественном уровне [42; 43]. Следует отметить, что некоторые положения сольвофобной теории подвергались критике. Так, например, Карр с соавт., основываясь на экспериментальных данных, утверждали, что предсказания теории относительно вклада сольватационных взаимодействий в ПФ в хроматографическую селективность значительно переоценен [44].

1.2.5. Ионообменный механизм

Ионообменный механизм адсорбции представляет по сути обменную адсорбцию ионов и, соответственно, характерен для систем, где адсорбат является заряженной частицей, а адсорбент/неподвижная фаза содержит ионогенные активные центры, знак заряда которых (после ионизации) противоположен знаку заряда частиц адсорбата. Для разделения положительно заряженных веществ неподвижная фаза должна обладать катионообменными свойствами, а для разделения отрицательно заряженных веществ – анионообменными. Уравнения (1.19а) и (1.19б) описывают равновесие ионного обмена между ионом адсорбата с абсолютной величиной заряда n и противоиона ПФ, находящегося в контакте с одновалентной ионообменной группой неподвижной фазы.



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

Для такой системы k связан с концентрацией противоиона в ПФ (C) следующим образом:

$$k = \phi \frac{K_{ion} (q^*)^n}{C^n} \quad (1.20)$$

где K_{ion} – константа равновесия реакции (1.19а) или (1.19б), q – обменная емкость неподвижной фазы. Если $n = 1$ (для одновалентных ионов Z), выражение (1.20) дает обратно пропорциональную зависимость k от C . Если логарифмическая зависимость $\lg k - \lg C$ имеет

линейный характер, то это подтверждает наличие ионообменного механизма [45]. При этом угловой коэффициент этого графика соответствует величине n . Выражение для k при элюировании ионогенного адсорбата смесью нескольких электролитов, имеет более сложный вид, который включает константы равновесия ионного обмена хроматографируемого вещества со всеми противоионами в элюенте [46].

Для строго термодинамического описания ионообменного равновесия требуется знание не концентраций, а активностей участвующих ионов [47]. Однако ввиду сложностей определения коэффициентов активности на практике для выявления ионообменного механизма удерживания пользуются выражением (1.20). Если оно не описывает экспериментальные данные, то предполагают наличие смешанного механизма и ищут причины отклонения от идеального ионообменного процесса. Такими причинами могут быть ион-парные взаимодействия, доннановское равновесие, адсорбция части адсорбата по механизму молекулярной адсорбции и т. д. В работах [48; 49] наблюдались линейные зависимости в координатах $\lg k - \lg C$ с угловым коэффициентом близким к единице для органических оснований на хиральных катионообменниках. Другим интересным примером являются публикации [50; 51], в которых описаны аналогичные линейные зависимости для энантиомеров β -аминокислот на ХНФ с привитыми амфолитными селекторами, однако значения углового коэффициента были ниже единицы, указывая на отличия ионообменных равновесий в системах с амфотерными и неамфотерными электролитами.

1.2.6. Особенности механизмов удерживания в хиральной хроматографии

Процесс, который позволяет ХНФ предпочтительно удерживать один из энантиомеров, представляет собой обратимое образование диастереомерных комплексов между адсорбатами и адсорбционными центрами хирального селектора (рис. 1.5).

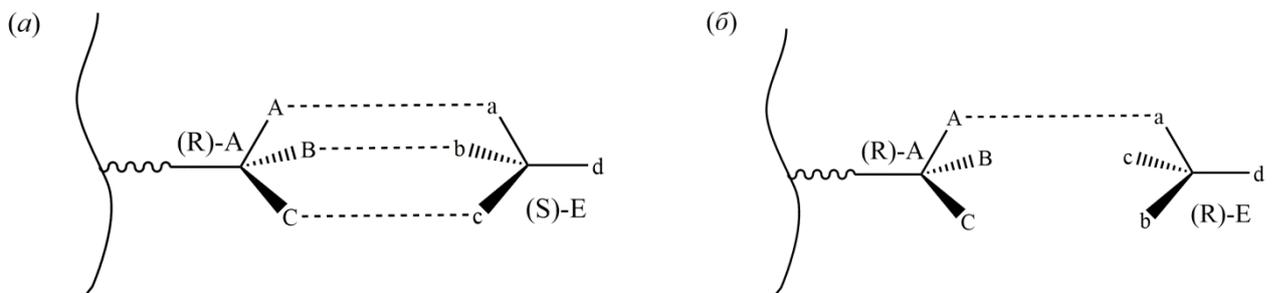
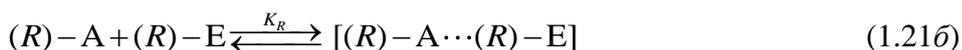


Рис. 1.5. Модель трехточечного взаимодействия [9]. (а) Идеальное и (б) неидеальное соответствие селектора и адсорбата

В этом процессе энантиомер E в (R)- или (S)-конфигурации приближается к селектору, который содержит хиральный центр связывания A в одной, допустим, в (R)-конфигурации. Из-за специфических пространственных ограничений один из энантиомеров связывается сильнее (идеальное соответствие) по сравнению с другим (неидеальное соответствие), что приводит к различным константам связывания K_S и K_R ($K_S > K_R$) равновесных реакций между A и (S)-E и (R)-E [9]:



В силу связи между константой равновесия и фактором удерживания (уравнение (1.1)) энантиомер характеризующийся меньшей константой связывания будет выходить из колонки первым, а энантиомер с большей константой связывания – вторым.

Условия, обеспечивающие эффективное связывание, описаны в обзоре Ламмерхофера [9]:

- Стерическое соответствие (комплементарность размера и формы) адсорбата с центром связывания, который обычно представляет собой связывающий «карман».
- Электростатическое соответствие (соответствие функциональных групп), т.е. благоприятная геометрическая и пространственная ориентация комплементарных функциональных групп, обеспечивающих взаимодействия электростатического характера (водородные связи, координационные связи, ионные, диполь-дипольные и π - π взаимодействия).
- Гидрофобное соответствие (в водных элюентах гидрофобные области селектанда и селектора взаимодействуют друг с другом, образуя тесные межмолекулярные контакты липофильных фрагментов, что приводит к взаимному насыщению их гидрофобных поверхностей) [9].
- Динамическое и индуцированное соответствие (динамическая конформационная адаптация в процессе образования комплекса, направленная на максимизацию связывающих взаимодействий между анализируемым веществом и селектором) [20; 52–54].

Взаимодействие веществ с поверхностью адсорбата описывается изотермами адсорбции. Простейшей модели адсорбции на энергетически гомогенной поверхности из идеального раствора соответствует уравнение изотермы Лэнгмюра:

$$q = \frac{q^* bc}{1 + bc}, \quad (1.22)$$

где q и c – концентрация адсорбата на поверхности адсорбента и в объеме жидкой фазы соответственно; q^* и b – адсорбционная емкость и коэффициент адсорбционного равновесия. В условиях бесконечного разбавления, принимая во внимание уравнение (1.2), можем записать:

$$K_c = q^*b \quad (1.23)$$

Поверхность ХНФ, как правило, имеет более сложную структуру, чем предполагается классической моделью Лэнгмюра. На поверхности ХНФ помимо центров энантиоселективной адсорбции (тип I) могут находиться центры неселективной адсорбции (тип II) [55–57]. Энантиоселективные центры характеризуются разным сродством по отношению к хиральным изомерам, а неселективные одинаково взаимодействуют с обоими энантиомерами. Долгое время считалось, что неселективная адсорбция осуществляется на ахиральных участках НФ: остаточных силанольных группах поверхности носителя и ахиральных фрагментах селектора, но в работах [58; 59] было показано, что сами хиральные селекторы могут выступать в качестве центров неселективной адсорбции. Выбор подвижной фазы также может влиять на стереоспецифичность селектора по отношению к селектамдам [60]. Взаимодействие молекул растворителя с хиральным селектором может блокировать доступ к нему других молекул или приводить к сильным конформационным изменениям, обуславливающим потерю сорбционной активности. Обычно энантиоселективные взаимодействия характеризуются более высокой энергией адсорбции по сравнению с неселективными, так как в энантиоселективной адсорбции чаще участвуют более сильные специфические взаимодействия, такие как водородные связи, ион-ионные, донорно-акцепторные и диполь-дипольные взаимодействия. В неселективной адсорбции обычно участвуют более слабые межмолекулярные взаимодействия: дисперсионные или индукционные [57], хотя в литературе описаны и случаи прочного неселективного взаимодействия [61]. Поскольку количество неселективных центров связывания может существенно превышать таковое энантиоселективных центров, то вклад таких неспецифических взаимодействий в общее удерживание может быть значительным.

Для гетерогенных ХНФ, состоящих из двух типов адсорбционных центров:

$$K_{ci} = K_{c,I,i} + K_{c,II,i} \quad (1.24)$$

где индекс $i = 1, 2$ обозначает первый и второй элюируемый энантиомер соответственно.

В терминах хроматографического удерживания уравнение (1.24) будет переписано следующим образом:

$$k_i = k_{I,i} + k_{II,i} \quad (1.25)$$

Для энантиоселективных центров $k_{I,1} \neq k_{I,2}$, а для неселективных центров $k_{II,1} = k_{II,2}$.

Вклады центров типа I и типа II в изотерму адсорбции независимы и аддитивны. Механизм гетерогенной адсорбции на таких хиральных адсорбентах можно описать изотермой адсорбции би-Лэнгмюра [62–64]

$$q_i = q_{I,i} + q_{II,i} = \frac{q_{I,i}^* b_{I,i} c_i}{1 + b_{I,i} c_i} + \frac{q_{II,i}^* b_{II,i} c_i}{1 + b_{II,i} c_i} \quad (1.26)$$

Исходя из определения неселективных и селективных центров адсорбции, для параметров уравнения (1.26) можно записать следующие условия: $b_{I,1} \neq b_{I,2}$ и $b_{II,1} = b_{II,2}$. Относительно адсорбционных емкостей устанавливается требование $q_{II,1}^* = q_{II,2}^*$ и $q_{I,1}^* = q_{I,2}^*$, означающее что число адсорбционных центров данного типа не зависит от конфигурации энантиомера [61].

Комбинируя уравнения (1.1), (1.2), (1.24) и (1.26), получим

$$k_i = k_{I,i} + k_{II,i} = \phi(q_{I,i}^* b_{I,i} + q_{II,i}^* b_{II,i}) \quad (1.27)$$

Часто центров типа I значительно меньше, чем центров типа II ($q_{i,II}^* \gg q_{i,I}^*$), а энергия адсорбции на центрах первого типа значительно больше, чем на центрах второго типа ($b_{i,I} \gg b_{i,II}$) [55; 61]. Поэтому нередко $k_{I,i}$ сопоставим по величине с $k_{II,i}$.

Для коэффициента разделения на таких бицентровых поверхностях с учетом уравнения (1.25) можно записать:

$$\alpha = \frac{k_{I,2} + k_{II,2}}{k_{I,1} + k_{II,1}} \quad (1.28)$$

В гипотетической ситуации отсутствия неселективных центров коэффициент разделения был бы равен

$$\alpha_{сел} = \frac{k_{I,2}}{k_{I,1}} \quad (1.29)$$

Сравнивая выражения (1.28) и (1.29), видим, что экспериментальный коэффициент энантиоразделения (α) всегда меньше гипотетического коэффициента энантиоразделения ($\alpha_{сел}$) из-за вклада неселективных центров адсорбции. Таким образом способами повышения энантиоселективности будет увеличение дифференцирующей способности энантиоселективных центров (увеличение отношения $k_{I,2} / k_{I,1}$) или уменьшение вклада неселективных центров.

1.2.7. Влияние концентрации элюируемого вещества на фактор удерживания

Как было отмечено в главе 1.2.1 фактор удерживания не изменяется в линейной области изотермы адсорбции (уравнение (1.2)), а за пределами этой области определяется следующим уравнением [25]:

$$k(c) = \phi \frac{dq(c)}{dc} \quad (1.30)$$

где концентрация c означает концентрацию элюируемого вещества на выходе из хроматографической колонки. Очевидным образом она связана с количеством этого вещества, введенного в колонку: чем больше это количество, тем выше будет концентрация в максимуме хроматографического пика.

Зависимость фактора удерживания от концентрации адсорбата определяется формой изотермы адсорбции. В хиральной хроматографии чаще всего встречаются выпуклые изотермы адсорбции, для которых с увеличением концентрации образца уменьшается производная dq/dc , следовательно, согласно уравнению (1.30), уменьшается время удерживания [65]. Таким изотермам адсорбции соответствуют пики с размытым хвостом и острым фронтом. Наиболее распространенными примерами изотерм адсорбции данного типа являются изотерма Лэнгмюра (уравнение (1.22)) и би-Лэнгмюра (уравнение (1.26)).

Вогнутые изотермы адсорбции характеризуются ростом фактора удерживания с увеличением концентрации образца и хроматографическими пиками с медленным нарастанием переднего и крутым обрывом заднего фронта. Чаще изотермы данного типа наблюдаются в системах, где взаимодействие адсорбат–адсорбат сильнее взаимодействия адсорбат–адсорбент. Примером является так называемая изотерма анти-Лэнгмюра:

$$q = \frac{q^* bc}{1 - bc} \quad (1.31)$$

В литературе описаны единичные примеры таких изомерм адсорбции в хиральных системах [66].

Нередко в хиральной хроматографии встречаются изотермы адсорбции с точкой перегиба, S-образные или более сложной формы [67–70]. Наиболее часто встречающиеся объяснения такого поведения – латеральные взаимодействия между адсорбированными молекулами [67; 68] или влияние вторичных равновесий; в случае слабых электролитов – это их ионизация и раздельная адсорбция ионизированной и нейтральной форм [69; 70]. В таких условиях k будет сложной, немонотонной функцией введенного в колонку количества аналита.

1.2.8. Влияние вторичных равновесий на механизм удерживания

В жидкостной хроматографии на удерживание могут оказывать влияние процессы, протекающие в ПФ, такие как ионизация хроматографируемых веществ и электролитических компонентов ПФ, сольватация адсорбатов и адсорбционных центров, ассоциация молекул адсорбатов между собой и т.д. Такие процессы, не являющиеся собственно адсорбцией

хроматографируемых веществ на поверхности неподвижной фазы, называют вторичными равновесиями.

1.2.8.1. Сольватация

Адсорбция на границе раздела жидкость/твердое тело является сложным процессом, включающим (1) десольватацию растворенного вещества в жидкой фазе, (2) десорбцию растворителя с поверхности ХНФ, (3) адсорбцию растворенного вещества на поверхности ХНФ (образование переходного комплекса), (4) ресольватацию адсорбционного комплекса и (5) разбавление жидкой фазы молекулами растворителя, десорбированными с поверхности адсорбента. Соответственно, изменение термодинамических характеристик, энтальпии (H), энтропии (S) или энергии Гиббса (G), в результате адсорбции будет описываться следующим уравнением [71]:

$$\Delta X^0 = \Delta X^0(1) + \Delta X^0(2) + \Delta X^0(3) + \Delta X^0(4) + \Delta X^0(5) \quad (1.32)$$

где $X = H, S, G$. Так как вклад последнего термина в уравнение (1.32) в условиях линейной хроматографии незначителен, им, как правило, пренебрегают.

Вклад сольватации в общий тепловой эффект адсорбции обычно значителен. Энтальпия сольватации варьируется в диапазоне от -90 до -130 кДж/моль при участии в растворении полярных и ионных взаимодействий [56], что в несколько раз выше наблюдаемых значений энтальпии адсорбции в жидко-твердофазных системах. В работе [72] показано, что при образовании комплексов некоторых пептидов и нуклеиновых кислот с биологически активными веществами процесс реорганизации растворителя обеспечивает 25-100% общей энтальпии процесса связывания. Гаспаррини с соавт. продемонстрировали важность процессов сольватации для энантиоразделения трипептидов на ХНФ с привитым макробициклическим селектором при элюировании 3% MeOH в CH_2Cl_2 [73]. Адсорбция более сильно удерживаемого стереоизомера была слабо экзотермической ($\Delta H^0 = -4.1$ кДж/моль), а менее удерживаемого – эндотермической ($\Delta H^0 = 14.6$ кДж/моль). Авторы объяснили это сильной реорганизацией структуры растворителя, окружающей адсорбированные молекулы, сопровождающейся поглощением тепла. Для сильнее удерживаемого энантиомера экзотермический эффект связывания превышал эффект эндотермической реорганизации растворителя.

Выражение для разности свободных энергий удерживания энантиомеров $\Delta\Delta G^0 = \Delta\Delta G_2^0 - \Delta\Delta G_1^0$, определяющей энантиоселективность адсорбента, записывается следующим образом:

$$\Delta\Delta G^0 = \Delta\Delta G^0(2) + \Delta\Delta G^0(3) + \Delta\Delta G^0(4) + \Delta\Delta G^0(5) \quad (1.33)$$

Как видно, терм десольватации отсутствует, поскольку этот процесс протекает в жидкой фазе и не является хиральным, следовательно, $\Delta G_1^0(1) = \Delta G_2^0(1)$ и $\Delta \Delta G^0(1) = 0$. Фактором разбавления жидкой фазы десорбированным растворителем (5) тоже можно пренебречь. Хотя энергии разбавления для оптических изомеров могут отличаться, сам термодинамический эффект разбавления невелик, поэтому разность этих эффектов будет мала по сравнению с другими членами уравнения (1.33). Наибольший вклад в свободную энергию энантиоразделения ожидается от адсорбционного члена $\Delta \Delta G^0(3)$. Именно различие в энергиях связывания оптических изомеров с хиральным селектором являются, как считается [9], движущей силой энантиоразделения. Однако факторы десорбции (2) и ресольватации (4) также могут играть определенную роль. Член $\Delta \Delta G^0(2)$ зависит от количества и состава десорбированной жидкой фазы. В случае, когда моды связывания энантиомеров адсорбционным центром отличаются, они могут вытеснять с его поверхности разное количество молекул растворителя. Если при этом компоненты растворителя обладают высоким сродством к адсорбционному центру, как, например, молекулы воды по отношению к гидрофильным адсорбентам, то вклад десорбции в величину $\Delta \Delta G^0$ может оказаться существенным. Терм ресольватации определяется различием в величинах и структуре доступной поверхности энантиомеров в составе адсорбционных комплексов. Если один из энантиомеров входит внутрь «кармана» хирального селектора глубже, чем его антипод, то площадь молекулы этого энантиомера, доступная для взаимодействия с жидкой фазой, будет меньше, чем у антипода. О возможной роли процесса ресольватации в разделении стереоизомеров дипептидов на ХНФ Chirobiotic R сообщалось в статье [74].

Прямое изучение процесса сольватации в жидко-твердофазных системах представляет собой крайне сложную задачу, поскольку требует независимого определения других термодинамических вкладов уравнения (1.32). Подобные исследования в доступной литературе не обнаружены. В хроматографии для этой цели прибегают к косвенным способам. Одним из таких способов является аппроксимация зависимостей фактора удерживания от состава ПФ с помощью сложных моделей, учитывающих сольватные равновесия в явном виде. Примеры таких моделей разбирались в разд. 1.2.2. Другой подход возможен в случае наблюдения эффекта энтальпийно-энтропийной компенсации [75]. Считается, что в жидко-твердофазной адсорбции этот феномен в значительной мере обусловлен сольватными равновесиями [76]. Так Харун с соавт., анализируя с применением компенсационной гипотезы термодинамические данные по адсорбции энантиомеров триптофана на ХНФ на основе тейкопланина и агликона тейкопланина, установили, что дегидратация межфазной поверхности играет важную роль в связывании триптофана с хиральными селекторами и в определенной степени контролирует

энантиораспознавание [77]. Авторами было оценено приблизительное количество молекул воды, вытесненных в процессе адсорбции из центра связывания в тейкопланине (1 молекула) и агликоне тейкопланина (3-4 молекулы).

1.2.8.2. Особенности удерживания слабых электролитов

В зависимости от pH слабые электролиты присутствуют в растворе в виде нейтральных или заряженных частиц, сродство которых к адсорбенту может отличаться. Математическое описание влияния данного явления на хроматографическое удерживание впервые было дано Хорватом, Меландером и Молнаром (ХММ) в работе [78]. Они исходили из допущения, что неподвижная фаза представляет собой инертный носитель, на поверхности которого равномерно расположены одинаковые лиганды, которые и вступают во взаимодействие с частицами адсорбтива. Ионогенный адсорбтив существует в растворе в разных ионных формах (включая нейтральную). Равновесие между этими формами определяется константами диссоциации $K_{a,i}$ ионизируемых групп. Общий фактор удерживания складывается из парциальных факторов удерживания каждой ионной формы (k_j) с учетом ее доли в ПФ (χ_j):

$$k = \sum_j k_j \chi_j \quad (1.34)$$

Для ионного равновесия $HA = A^- + H^+$ выражение для фактора удерживания выглядит следующим образом:

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

где k_0 – это фактор удерживания недиссоциированной формы HA, k_{-1} – фактор удерживания анионной формы A^- . Доли частиц в растворе соответственно: $\chi_0 = 1 / (1 + [H^+] / K_a)$ и $\chi_{-1} = ([H^+] / K_a) / (1 + [H^+] / K_a)$, где K_a – константа диссоциации. Данное уравнение дает S-образную зависимость фактора удерживания от pH ПФ с точкой перегиба при $pH = pK_a$. Отклонения от S-образной формы графика говорит о нарушении допущений теории ХММ.

Для цвиттер-ионных молекул выражение для фактора удерживания имеет следующий вид:

$$k = k_{+1} \chi_{+1} + k_0 \chi_0 + k_{-1} \chi_{-1} \quad (1.36)$$

где индексы +1, 0, -1 соответствуют катионной, нейтральной и анионной формам цвиттер-иона. Мольные доли частиц рассчитываются по следующим выражениям:

$$\chi_{+1} = \frac{[H^+]^2}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a,2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a,1} K_{a,2}}\right) K_{a,1} K_{a,2}} \quad (1.37a)$$

$$\chi_0 = \frac{[\text{H}^+]}{\left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a,2}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a,1}K_{a,2}}\right)K_{a,2}} \quad (1.37б)$$

$$\chi_{-1} = \frac{1}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a,2}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a,1}K_{a,2}}} \quad (1.37в)$$

где $K_{a,1}$ и $K_{a,2}$ – константы диссоциации основной и кислотной групп цвиттер-ионного анализатора.

Теория ХММ успешно использовалась для описания зависимостей удерживания слабых электролитов от pH на алкилированных силикагелях в обращенно-фазовой хроматографии [79] [80]. Обобщение данной теории для нелинейной хроматографии дано в работе [81].

ХНФ на основе макроциклических антибиотиков и хининовых алкалоидов содержат ионообменные группы, которые в зависимости от pH ПФ могут находиться в ионизированном состоянии и быть центрами ионообменной адсорбции, что не соответствует постулатам теории ХММ. Несмотря на это, уравнение данной модели хорошо описывало удерживание дипептидов на ХНФ Chirobiotic R с привитым антибиотиком ристоцетином и частично описывала данные по удерживанию дипептидов на ХНФ Chirobiotic T с привитым антибиотиком тейкопланином [82]. В работе [83] наблюдалась S-образная зависимость фактора удерживания профеновых кислот от pH ПФ на ХНФ Nautilus-E с привитым антибиотиком эремомицином, что объяснялось смешанным ионообменно-адсорбционным механизмом удерживания. В таких случаях для описания закономерностей удерживания слабых электролитов требуется привлечение более сложных моделей, которые бы учитывали существование разных типов адсорбционных центров на поверхности в зависимости от величины pH ПФ и вариативность мод связывания разных форм адсорбата с разными формами хирального селектора.

1.3. Динамика адсорбции в хиральной хроматографии

1.3.1. Общие закономерности динамики адсорбции

Движение ПФ через хроматографическую колонку подчиняется обычным уравнениям гидродинамики (уравнение неразрывности, уравнение движения вязкой жидкости) [84]. Для описания миграции адсорбируемого вещества вместе с ПФ к уравнениям гидродинамики необходимо добавить уравнения массового баланса адсорбируемого вещества и уравнение кинетики адсорбции. Эта система уравнений чрезвычайно сложна для решения и на практике заменяется упрощенными моделями, подробно обсуждаемыми в разделе 1.3.2.

Адсорбируемое вещество вводится в хроматографическую колонку в виде узкой зоны. В процессе перемещения вдоль колонки эта зона размывается под действием следующих процессов:

1. Продольная молекулярная диффузия, вызванная тепловым движением молекул.
2. Внешняя диффузия или перенос вещества из ПФ к поверхности адсорбента.
3. Внутрипоровая диффузия или перенос вещества внутри пор частиц неподвижной фазы.

4. Кинетика адсорбции/десорбции. (Замедление стадии адсорбции или десорбции приводит к тому, что молекулы, участвующие в акте адсорбции (и последующей десорбции) отстают в своем движении вдоль колонки от молекул, находящихся в ПФ).

5. Вихревая диффузия, обусловленная неоднородностью локальных скоростей в колонке. Эта неоднородность по-разному проявляется на разных масштабах длины. Гиддингс рассматривал 4 составляющих вихревой диффузии [85] (рис. 1.6):

а) Трансчастичное размывание, вызванное конечным временем миграции элюируемого вещества в порах адсорбента. В современной интерпретации динамики адсорбции эти процессы связывают с внутрипоровой диффузией (п. 3) и не включают в вихревую диффузию.

б) Трансканальное размывание. Связано с неоднородностью поля скоростей в поперечном сечении канала между частицами неподвижной фазы.

в) Межканальное размывание. Связано с неоднородностью упаковки слоя неподвижной фазы в колонке, в результате чего скорость потока через участок с более высокой плотностью будет меньше, чем через участок с менее высокой плотностью, поскольку средний диаметр каналов в первом участке будет меньше, чем во втором. Гиддингс различал межканальную неоднородность на небольшом масштабе длины, между соседними участками высокой и низкой плотности, и на большом масштабе длины, полагая, что картина неоднородности упаковки слоя будет сильно меняться по сечению колонки. Первый тип межканального размывания он называл *ближнего* порядка, а второй – *дальнего* порядка [85]. Численные оценки величины межканального размывания дальнего порядка дают небольшие значения и на практике им, как правило, пренебрегают [86].

г) Трансколоночное размывание. Связано с различием поля скоростей в поперечном сечении колонки. Как правило у стенок колонки скорость потока ПФ выше чем в центре колонки (стеночный эффект) [87]. Изменение профиля скорости могут происходить и в случае наличия пустот, возникающих в результате некачественной набивки.

Размывание хроматографических полос описывают с помощью теории тарелок, предложенной Мартином и Сингом [88]. В рамках этой теории хроматографическая колонка условно разбивается на N участков, на каждом из которых достигается равновесие между концентрацией растворенного вещества в ПФ и неподвижной фазе по всей длине этого участка. Такой участок называется «теоретической тарелкой». Число теоретических тарелок определяется следующим выражением:

$$N = (\mu_1^2 / \mu_2') \quad (1.38)$$

где μ_1 и μ_2' – первый и второй центральный моменты пика соответственно. Второй центральный момент также называют дисперсией.

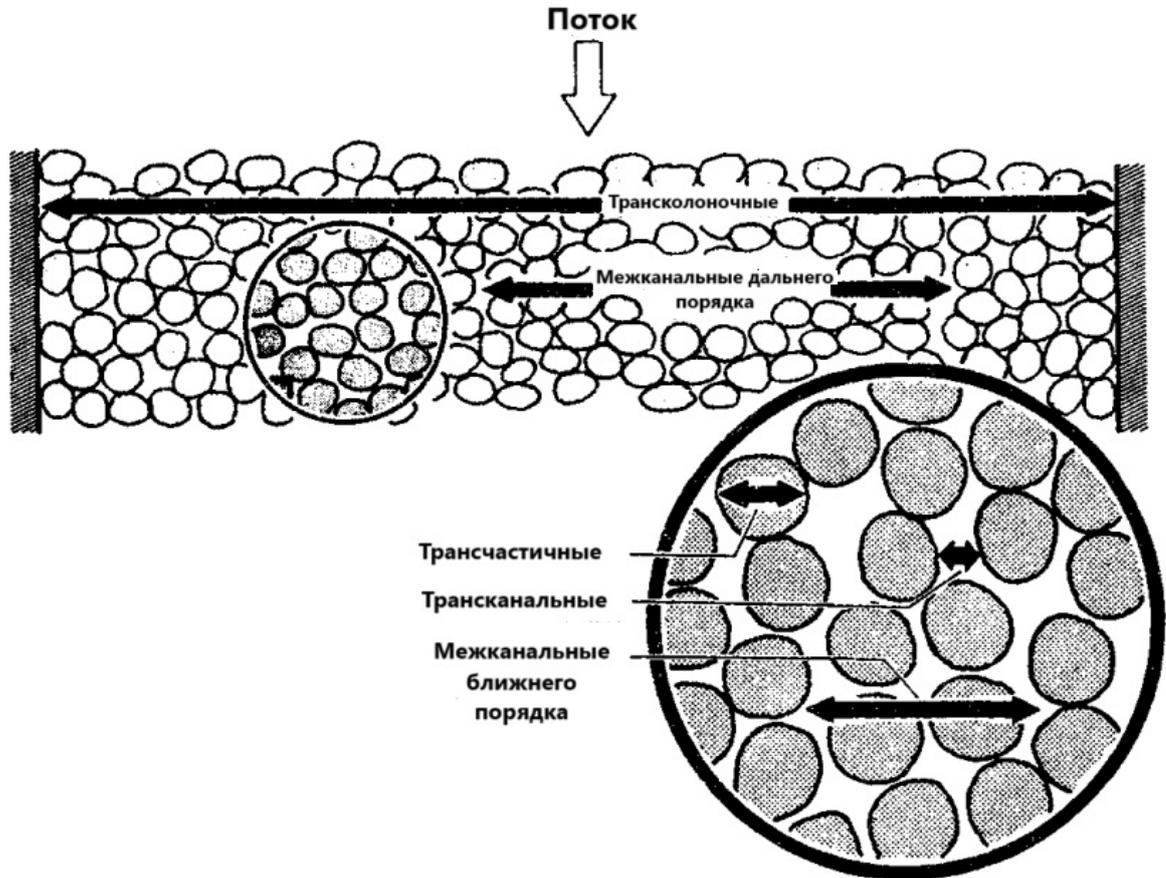


Рис. 1.6. Схематичное изображение различных вкладов в вихревую диффузию. Стрелками показаны масштабы длины, на которых проявляются указанные виды размывания [85]

Можно определить высоту эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ, H) как

$$H = \frac{L}{N} \quad (1.39)$$

где L – длина колонки.

Различные факторы размывания вносят аддитивный вклад в общую дисперсию хроматографической полосы:

$$\mu_2' = \sum \mu_{2,i}' \quad (1.40)$$

где $\mu_{2,i}'$ – вклад каждого независимого процесса i в дисперсию пика.

Если разделить процессы, которые протекают внутри колонки и вне ее, тогда

$$\mu_2' = \mu_{2,extra}' + \mu_{2,0}' \quad (1.41)$$

где $\mu'_{2,extra}$ – внеколоночная дисперсия, а $\mu'_{2,0}$ – суммарная внутриколоночная дисперсия, которая представляет собой суперпозицию различных вкладов внутриколоночного размывания:

$$\mu'_{2,0} = \mu'_{2,mol.diff} + \mu'_{2,eddy} + \mu'_{2,ext} + \mu'_{2,s} + \mu'_{2,ads} \quad (1.42)$$

где $\mu'_{2,mol.diff}$, $\mu'_{2,eddy}$, $\mu'_{2,ext}$, $\mu'_{2,s}$ и $\mu'_{2,ads}$ – вклад продольной, вихревой, внешней, внутриворонной диффузии и кинетики адсорбции в общую дисперсию пика соответственно. Поскольку H пропорциональна μ'_2 [85] можно записать

$$H = H_{mol.diff} + H_{eddy} + H_{ext} + H_s + H_{ads} \quad (1.43)$$

где $H_{mol.diff}$, H_{eddy} , H_{ext} , H_s и H_{ads} пропорциональны соответствующим значениям μ'_2 в уравнении (1.42).

В расчетах удобно пользоваться безразмерными величинами ВЭТТ (h) и скорости потока ПФ (ν):

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (1.44)$$

$$\nu = \frac{ud_p}{D_m} \quad (1.45)$$

где d_p – диаметр частиц неподвижной фазы, u – истинная линейная скорость потока, D_m – коэффициент молекулярной диффузии.

В 1956 г. ван Дееттер, Клиненберг и Зюйдерверг предложили уравнение, описывающее размывание хроматографической полосы как сумму трех вкладов [89]:

$$h = A + \frac{B}{\nu} + C\nu \quad (1.46)$$

где A – коэффициент, характеризующий вихревую диффузию, B – коэффициент, характеризующий продольную диффузию, C – коэффициент, характеризующий сопротивление массопереносу, вызванное процессами внешней диффузии, внутренней диффузии и кинетики адсорбции.

Уравнение (1.46) (известное как уравнение ван Дееттера) успешно используется для описания зависимостей h от ν для многих хроматографических систем. В ряде случаев, однако, наблюдаются отклонения экспериментальных зависимостей от теоретической кривой, связанные с нарушением допущений и предположений, принятых при выводе данного уравнения [90]. Для описания таких данных Нокс предложил уравнение, в котором коэффициенты B и C идентичны таковым в уравнении ван Дееттера, но терм вихревой диффузии зависит от ν в степени 0.33 [91]:

$$h = A\nu^{0.33} + \frac{B}{\nu} + C\nu \quad (1.47)$$

В 1960-х годах Гиддингс модифицировал уравнение ван Деемтера и вместо постоянной A , ответственной за вихревую диффузию, использовал функцию $A(v)$, рассчитываемую на основании теории сопряжения механизмов молекулярной и вихревой диффузии [85]. Соответствующее уравнение ван Деемтера-Гиддингса записывается следующим образом:

$$h = \sum_{i=1}^3 \frac{1}{1/2\lambda_i + 1/\omega_i v} + \frac{B}{v} + C_{ext} v + (C_s + C_{ads}) v \quad (1.48)$$

Первый терм уравнения (1.48), характеризующий вихревую диффузию (h_{eddy}), зависит от неоднородности потока ПФ в колонке, как было сказано выше. Индексы $i = 1, 2, 3$ обозначают три типа неоднородности, проявляющиеся на разных масштабах длины: трансканальные, межканальные ближнего порядка и трансколоночные [90–93]. Коэффициенты λ и ω представляют собой структурные параметры, связанные с конвективным переносом (λ) и диффузией (ω) на определенном масштабе длины.

Коэффициенты C_{ext} , C_s и C_{ads} характеризуют сопротивления массопереносу за счет внешней, внутривидовой диффузии и кинетики адсорбции соответственно, и в рамках модели динамики адсорбции известной как general rate model, рассмотренной в разделе 1.3.2.1, определяются следующими выражениями [94]:

$$C_{ext} = \left(\frac{k_1}{1+k_1} \right)^2 \frac{D_m}{3F_e d_p k_{ext}} \quad (1.49)$$

$$C_s = \left(\frac{k_1}{1+k_1} \right)^2 \frac{D_m}{30F_e D_i} \quad (1.50)$$

$$C_{ads} = 2 \left(\frac{k_1}{1+k_1} \right)^2 \left(\frac{k_p}{1+k_p} \right)^2 \frac{D_m}{F_e d_p^2 (1-\varepsilon_i) k_{ads}} \quad (1.51)$$

где k_{ext} – коэффициент внешнего массопереноса, k_{ads} – константа скорости адсорбции, D_i – коэффициент диффузии внутри частиц адсорбента (внутривидовая диффузия), $F_e = (1-\varepsilon_e)/\varepsilon_e$, $k_p = K(1-\varepsilon_i)/\varepsilon_i$, $k_1 = F_e(\varepsilon_i + (1-\varepsilon_i)K)$, K – константа адсорбционного равновесия, ε_e – внешняя пористость колонки, а ε_i – внутренняя пористость колонки.

Поскольку k_{ext} является функцией скорости потока, C_{ext} является переменным коэффициентом. В жидкостной хроматографии принято, что k_{ext} пропорционален $v^{1/3}$ [95; 96]. Коэффициент внешнего массопереноса можно оценить по эмпирическому уравнению Вильсона-Гинкописа, которое хорошо себя зарекомендовало в традиционных системах ВЭЖХ [97]:

$$k_{ext} = 1.09 \left(\frac{D_m}{d_p} \right) \varepsilon_e^{-2/3} v^{1/3} \quad (1.52)$$

Ван Деемтер с соавт. предполагали, что продольная диффузия в колонке (коэффициент B) обусловлена молекулярной диффузией в подвижной фазе [89]. Позже Гиддингс [85], Нокс и Скотт [98] пришли к выводу, что молекулы растворенного вещества диффундируют не только в подвижной, но и в неподвижной фазе, и вклады обоих процессов должны учитываться в терме $h_{mol.diff}$

$$h_{mol.diff} = \frac{B}{v} = \frac{2(1+k_1) \cdot (D_{eff} / D_m)}{v} \quad (1.53)$$

где D_{eff} – коэффициент эффективной диффузии в колонке. Простейшая модель, объясняющая эффективную диффузию, модель параллельных зон [98], предполагает аддитивный вклад диффузии в подвижной и неподвижной фазах:

$$D_{eff} = \frac{\gamma_e D_m}{1+k_1} + \frac{F_e D_i}{1+k_1} \quad (1.54)$$

где γ_e – внешний обструкционный фактор насадочного слоя. Нокс и Скотт предлагают для этой величины значение $\gamma_e = 0.65$ [98].

Миграция растворенных веществ в неподвижной фазе происходит за счет механизмов поровой и поверхностной диффузии. Предполагая, что эти механизмы аддитивны, D_i может быть выражен через пористость частиц, внутренний (поровый) обструкционный фактор (γ_i), коэффициент поверхностной диффузии (D_{sur}) и коэффициент молекулярной диффузии [92]:

$$D_i = \gamma_i \varepsilon_i D_m + (1 - \varepsilon_i) K D_{sur} \quad (1.55)$$

Значение порового обструкционного фактора γ_i определяют как произведение обструкционного фактора для неограниченной внутренней диффузии ($\gamma_{i,0}$) и фактора стерического торможения $F(\lambda_m)$, который зависит от отношения молекулярного радиуса растворенного вещества к радиусу пор (λ_m). $F(\lambda_m)$ можно оценить по корреляции Бреннера-Гайдоса [99]:

$$F(\lambda_m) = \frac{1 + 1.125 \lambda_m \ln \lambda_m - 1.539 \lambda_m}{(1 - \lambda_m)^2} \quad (1.56)$$

Сумма вкладов молекулярной и вихревой диффузии в ВЭТТ определяет аксиальную дисперсию:

$$h_{ax} = h_{mol.diff} + h_{eddy} = 2(D_{ax} / D_m) / v \quad (1.57)$$

где D_{ax} – коэффициент аксиальной дисперсии.

С учетом уравнения (1.57) уравнение (1.48) можно представить в следующем виде:

$$h = \frac{2(D_{ax} / D_m)}{v} + C_{ext} v + (C_s + C_{ads}) v \quad (1.58)$$

1.3.2. Модельное описание динамики адсорбции

Численное моделирование динамики адсорбции в хроматографической колонке используется для решения двух противоположных задач: расчета формы кривой элюирования по известным физико-химическим свойствам адсорбционной системы (прямая задача хроматографии) и расчета физико-химических свойств адсорбционной системы по экспериментально измеренной кривой элюирования (обратная задача хроматографии). Решение обеих задач требует априорного задания динамической модели хроматографического процесса. Модели, наиболее часто используемые в хроматографической литературе, описаны ниже в порядке уменьшения их сложности. Поскольку эксперименты в работе выполнялись в линейной области изотермы адсорбции, во всех нижеследующих моделях предполагается линейная изотерма адсорбции.

1.3.2.1. Общая модель процесса элюирования

Наиболее общая модель жидкостной хроматографии была предложена Линдой Вонг с соавт [100] и получила в зарубежной литературе название general rate (GR) model [101–103]. В этой модели допускается, что колонка, заполненная пористыми зёрнами сферической формы, находится в изотермических условиях, и подвижная фаза является несжимаемой, что позволяет считать скорость подвижной фазы постоянной вдоль всей длины колонки. Уравнение массового баланса для движения хроматографической зоны в подвижной фазе (уравнение (1.59)) сочетается с уравнением диффузии адсорбата в частице неподвижной фазы (уравнение (1.60)) и уравнением кинетики адсорбции внутри пор частиц неподвижной фазы (уравнение (1.61)):

$$\varepsilon_e \frac{\partial c}{\partial t} + u \frac{\partial c}{\partial x} + (1 - \varepsilon_e) a_p k_{ext} [c - c_p(r = R_p)] = \varepsilon_e D_{ax} \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1.59)$$

$$\varepsilon_i \frac{\partial c_p}{\partial t} + (1 - \varepsilon_i) \frac{\partial q}{\partial t} = D_{eff} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c_p}{\partial r} \right) \quad (1.60)$$

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_{ads} (c_p - q/K_c) \quad (1.61)$$

где x – координата вдоль колонки, c – концентрация хроматографируемого вещества в подвижной фазе, c_p – его концентрация в жидкой фазе, заполняющей поры частиц неподвижной фазы, q – его средняя концентрация в частицах неподвижной фазы, a_p – удельная поверхность частиц неподвижной фазы, R_p – ее радиус, r – радиальная координата вдоль частицы неподвижной фазы. Параметры D_{ax} , K_c , k_{ads} , k_{ext} описаны выше.

Система уравнений (1.59) – (1.61) дополняется условием стационарного массопереноса на внешней границе частиц неподвижной фазы, означающего равенство потоков вещества из подвижной фазы к внешней границе частиц адсорбента и оттуда внутрь пор адсорбента:

$$k_{ext} [c - c_p(r = R_p)] = D_{ax} \left(\frac{\partial c_p}{\partial r} \right)_{r=R_p} \quad (1.62)$$

Начальные условия:

$$c(0, x) = c^0 \quad (1.63)$$

$$c_p(0, r, x) = c_p^0(r, x); \quad q(0, r, x) = q^0(r, x); \quad \text{для } 0 < x < L \text{ и } 0 < r < R_p \quad (1.64)$$

В качестве граничных условий на входе в колонку ($t > 0$ и $x = 0$) используют условие Данквертса:

$$u_f c'_f - u(0)c(0) = -\varepsilon_e D_{ax} \frac{\partial c}{\partial x}$$

$$c'_f = \begin{cases} c_f & \text{если } 0 < t < t_p \\ 0 & \text{если } t \leq t_p \end{cases} \quad (1.65)$$

где t_p – время, в течение которого постоянная концентрация адсорбтива c_f подается в колонку.

В качестве граничных условий на выходе из колонки ($t > 0$ и $x = L$) используют условие симметричности:

$$\frac{\partial c}{\partial x} = 0 \quad (1.66)$$

Граничные условия для уравнения (1.59) при $t > 0$:

на внешней поверхности частицы, $r = R_p$

$$D_{eff} \frac{\partial c_p(t, r)}{\partial r} = k_{ext} [c - c_p(t, r)] \quad (1.67)$$

в центре частицы, $r = 0$

$$\frac{\partial c_p(t, r)}{\partial r} = 0 \quad (1.68)$$

Использование GR модели для численного моделирования в хроматографической колонке связано с рядом трудностей вычислительного характера, поэтому на практике чаще используются упрощенные модели [101].

1.3.2.2. Смешанно-диффузионные модели

Первым упрощением описания динамики адсорбции являются смешанно-диффузионные модели [104–107], основная идея которых состоит в совместном учете факторов внешнего и внутреннего массопереноса. В хроматографии широкое распространение получила смешанно-

диффузионная модель, предложенная Морбиделли с соавторами [105; 106]. В этой модели не учитывается внутренняя структура зерна адсорбента и используются концентрации вещества в жидкой (в порах зерен адсорбента) и твердой фазах, усредненные по объему зерна: \bar{c}_p и \bar{q} соответственно. Уравнения массового баланса в подвижной и неподвижной фазах записываются следующим образом:

$$\varepsilon_e \frac{\partial c}{\partial t} + u \frac{\partial c}{\partial x} + (1 - \varepsilon_e) k_{eff} a_p (c - \bar{c}_p) = \varepsilon_e D_{ax} \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1.69)$$

$$\varepsilon_i \frac{\partial \bar{c}_p}{\partial t} + (1 - \varepsilon_i) \frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = k_{eff} a_p (c - \bar{c}_p) \quad (1.70)$$

где k_{eff} – эффективный коэффициент массопереноса, который определяется следующим уравнением:

$$k_{eff} = \left[\frac{1}{k_{ext}} + \frac{1}{k_{int}} \right]^{-1} \quad (1.71)$$

где k_{ext} и k_{int} – внешний и внутренний коэффициенты массопереноса соответственно. Внутренний коэффициент массопереноса рассчитывается из уравнений:

$$k_{int} = \frac{10D_{eff}}{d_p}; D_{eff} = \frac{\varepsilon_i D_m}{\gamma} \quad (1.72)$$

где γ – фактор извилистости.

Система уравнений (1.69) – (1.70) дополняется уравнением изотермы адсорбции $\bar{q} = f(\bar{c}_p)$. Начальные и граничные условия модели аналогичны используемым в GR модели (1.63) – (1.66).

1.3.2.3. Транспортно-дисперсионная модель

Дальнейшим упрощением описания динамики адсорбции является транспортно-дисперсионная модель, в которой скорость адсорбции на твердой поверхности предполагается бесконечно быстрой, а скорость массопереноса конечной [101]. Все вклады в сопротивление массопереносу объединены в коэффициенте массопереноса (k_f). Система уравнений, описывающих данную модель, состоит из уравнения массового баланса (1.73) и уравнения эффективного массопереноса (1.74) [108]:

$$u \frac{\partial c}{\partial x} + \frac{\partial c}{\partial t} + \frac{1 - \varepsilon_e}{\varepsilon_e} \frac{\partial q}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1.73)$$

$$\frac{\partial c_p}{\partial t} = k_f (q^* - q) \quad (1.74)$$

В уравнении (1.74) q^* – концентрация хроматографируемого вещества в адсорбционном слое на поверхности частиц адсорбента, находящаяся в равновесии с его концентрацией в подвижной фазе.

Начальные и граничные условия для транспортно-дисперсионной модели аналогичны уравнениям (1.63) – (1.66).

1.3.2.4. Равновесно-дисперсионная модель

Следующим уровнем упрощения является равновесно-дисперсионная (РД) модель [103], в которой пренебрегают сопротивлением массопереносу, предполагая, что концентрация адсорбтива в подвижной фазе равна его концентрации в порах адсорбента. Кроме того допускают, что все неравновесные эффекты могут быть объединены в эффективном коэффициенте аксиальной дисперсии D_{ax} . Это позволяет перейти от системы уравнений к одному уравнению массового баланса:

$$\varepsilon_t \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \varepsilon_t) \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial c}{\partial x} = \varepsilon_e D_{ax} \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1.75)$$

Начальные и граничные условия модели заданы уравнениями (1.63) – (1.66).

РД-модель часто используется для моделирования кривых элюирования, как в аналитической, так и в препаративной хроматографии [92] из-за ее простоты, позволяющей выполнять расчеты быстро, на современных персональных компьютерах – в течении нескольких секунд. Она, однако, не позволяет выяснить влияние различных механизмов массопереноса в размывание хроматографического пика, что является существенным недостатком с исследовательской точки зрения. Точность предсказаний РД-модели обсуждалась в работе [102], где было показано, что пространство точных предсказаний сложным образом зависит от условий массопереноса в колонке. Авторы обозначили это пространство набором диапазонов допустимых значений чисел Пекле и Шмидта. Анализ этих условий показывает, что чем выше эффективность хроматографической колонки, т.е. чем больше число теоретических тарелок, с тем большей вероятностью РД-модель будет адекватно описывать кривые элюирования. Этот вывод интуитивно понятен и совпадает с эмпирическим опытом применения РД-модели в хроматографии, обобщенном в монографии [103].

1.3.2.5. Численное решение уравнений динамики адсорбции

Попытки применить численные методы для расчета хроматограмм предпринимались с начала 1970-х годов и были основаны на различных подходах к использованию метода конечных разностей. Краткий, но содержательный обзор этих ранних работ сделан в статье [109]. Главный вывод первого этапа заключался в том, что погрешность аппроксимации

производных конечными разностями первого порядка приводит к заметному искажению кривых элюирования. Рюшон и др. показали, что если выбирать шаги сеток по осям x и t особым образом, то можно получить решение уравнения (1.75) РД-модели с достаточной точностью. Метод Рюшона применим, однако, только для РД-модели и только для однокомпонентной задачи. Для решения более сложных задач предлагались различные модификации метода конечных разностей [110; 111], но они требовали больших затрат машинного времени и были чувствительны к незначительным погрешностям экспериментальных параметров. Альтернативой конечно-разностному подходу стал метод ортогональных коллокаций на граничных элементах (ОКГЭ). Предложенный Вилладсенем и Стюартом [112], этот метод позволял уменьшить число точек на сетке и, следовательно, время расчета без потери точности. Изначально разработанный для решения задач химической технологии, он был быстро адаптирован для расчета динамики адсорбции в неподвижном слое [113; 114] и в хроматографических колонках [109; 115], как частном случае указанной задачи. Другие численные подходы к расчету кривых элюирования, такие как метод переноса частицы (particle transport method) [116] или метод каскадов Крейга [117] не нашли широкого применения для численного моделирования в хроматографии, и метод ОКГЭ остается наиболее популярным. В этом методе вместо ступенчатой аппроксимации решения, как принято в методе конечных разностей, используют гладкую интерполяцию в каждом интервале сетки. Нормализованное пространство координат в интервале $[0, 1]$ делят на N_E субдоменов (элементов) с $N_E + 1$ границами, которые обозначаются S_i и удовлетворяют следующим неравенствам:

$$0 = S_1 < S_2 < \dots < S_i < \dots < S_{N_E} < S_{N_E+1} = L \quad (1.76)$$

где L – длина колонки.

В каждом i -м субдомене должна быть определена локальная нормализованная пространственная переменная:

$$s_i = \frac{x - S_i}{\Delta x}, \quad s \in [0, 1] \quad (1.77)$$

где Δx – ширина субдомена, которая определяется как $L / N_E = S_{i+1} - S_i$

Согласно обычной процедуре метода ортогональных коллокаций в i -м элементе N_P внутренних точек коллокации выбираются как корни полинома Лежандра N_P -го порядка. Решение в пределах i -го элемента аппроксимируется следующими интерполирующими полиномами:

$$\left. \frac{\partial c}{\partial s} \right|_{c=c_{ji}} = \sum_{k=1}^{N_P+2} A_{jk} c_{ki}, \quad j = 1, 2, \dots, N_P + 2 \quad (1.78)$$

$$\left. \frac{\partial^2 c}{\partial s^2} \right|_{c=c_{ji}} = \sum_{k=1}^{N_p+2} B_{jk} c_{ki}, \quad j=1,2,\dots,N_p+2 \quad (1.79)$$

где C_{ki} - концентрация в k -й точке коллокации на i -м элементе, а A_{jk} и B_{jk} – значения первой (A) и второй (B) производной полинома Лагранжа степени k , численные значения которых приведены в работе [112]. Затем интегрируется система уравнений, которые обеспечивают выполнение уравнения материального баланса во внутренних точках коллокации в пределах каждого субдомена. Например, уравнение (1.75) в узловых точках i -го субдомена принимает вид:

$$s \in [S_i, S_{i+1}], \quad \left. \frac{\partial c}{\partial t} \right|_{c=c_{ji}} = -\frac{1-\varepsilon_t}{\varepsilon_t} \left. \frac{\partial q}{\partial t} \right|_{q=q_{ji}} + \frac{D_{ax}}{\Delta x^2} \sum_{k=1}^{N_p+2} B_{jk} c_{ki} - \frac{u}{\varepsilon_t \Delta x} \sum_{k=1}^{N_p+2} A_{jk} c_{ki} : \\ j=1,2,\dots,N_p+2, \quad i=2,3,\dots,N_E \quad (1.80)$$

В начале координат, т.е. для входного узла ($N_E = 1, x = 0$):

$$\left. \frac{\partial c}{\partial x} \right|_{c=c_{ji}} = \frac{u}{\varepsilon_t D_{ax}} [c_{fi} - \phi(t)], \quad j=1, \quad i=1 \quad (1.81)$$

где $\phi(t)$ – функция входного профиля пробы (обычно задается прямоугольный входной профиль как в выражении (1.65)).

В конце последнего узла ($N_i = N_E, x = L$):

$$\left. \frac{\partial c}{\partial x} \right|_{c=c_{ji}} = 0, \quad j=N_p+2, \quad i=N_E \quad (1.82)$$

В случае РД-модели ($q = f_i$) преобразование уравнения массового баланса (1.75) по схеме метода ОКГЭ приводит к следующему уравнению:

$$\left. \frac{\partial c}{\partial t} \right|_{c=c_{ji}} = \frac{\left[\frac{D_{ax}}{\Delta x^2} \sum_{k=1}^{N_p+2} B_{jk} c_{ki} - \frac{u}{\varepsilon_t \Delta x} \sum_{k=1}^{N_p+2} A_{jk} c_{ki} \right]}{1 + \left(\frac{1-\varepsilon_t}{\varepsilon_t} \right) \left. \frac{dq}{dc} \right|_{c_{ji}}} \quad (1.83)$$

Для более сложной транспортно-дисперсионной модели, состоящей из системы уравнений (1.73) – (1.74), преобразования по схеме метода ОКГЭ дает следующую систему уравнений:

$$\left. \frac{dc}{dt} \right|_{c=c_{fi}} = -\frac{1-\varepsilon_t}{\varepsilon_t} \left. \frac{\partial q}{\partial t} \right|_{c=c_{fi}} + \frac{D_{ax}}{\Delta x^2} \sum_{k=1}^{N_p+2} B_{jk} c_{ki} - \frac{u}{\varepsilon_t \Delta x} \sum_{k=1}^{N_p+2} A_{jk} c_{ki} \quad (1.84a)$$

$$\left. \frac{\partial q}{\partial t} \right|_{q=q_{ji}} = K [f(c_{ji}) - q_{ji}] \quad (1.84b)$$

Уравнения (1.80) – (1.84) представляют набор обыкновенных дифференциальных и алгебраических уравнений первого порядка. Алгебраические уравнения (1.77) и (1.78) решаются с использованием классических математических процедур [118], а система дифференциальных уравнений решается с использованием метода Рунге-Кутты [119] или Адама-Мултона [120].

1.3.3. Особенности динамики адсорбции в хиральной хроматографии

Первые работы, посвященные динамике адсорбции в хиральной хроматографии были опубликованы в 1980-1990-е годы [121–125]. Рицци, исследуя динамику адсорбции на колонках, заполненных триацетатом целлюлозы, обнаружил, что на поверхности ХНФ существует два типа адсорбционных центров (центры «быстрого» и «медленного» типа), которые различаются скоростью адсорбции, а также характером взаимодействий с аналитами [121]. По-видимому, он был первым, кто попытался объяснить размывание пиков с помощью двухцентровой модели, хотя и ошибочно считал, что вклады в ВЭТТ от двух типов участков являются аддитивными. В 1993 году Марле с соавт. исследовали размывание пиков в колонках с интактным и фрагментированным ферментом целлобиогидролазой I [123]. Они показали, что каждому фрагменту хирального селектора соответствует свой центр связывания, причем один центр связывания является доминирующим и приводит к энантиоразделению, а второй характеризуется низкими временами удерживания и приводит к энантиоразделению только при высоких значениях рН. В работе [126] обнаружено, что кривые элюирования менее удерживаемого L-фенилглицина симметричны, а кривые более прочно удерживаемого D-фенилглицина имеют хвост во всех исследуемых ПФ. Авторы объяснили это размывание существованием двух дополнительных хиральных центров адсорбции на поверхности ХНФ Chirobiotic T, которые способствовали удерживанию D-фенилглицина. Таким образом, в хиральной хроматографии при разделении пары энантиомеров часто наблюдается картина, когда второй элюированный пик характеризуется большим размыванием. Ожидаемое поведение графиков ван Деемтера для энантиомеров хиральных веществ состоит в том, что участки графиков с низкой скоростью потока совпадают, а участки с высокой скоростью расходятся, как показано на рис. 1.7а. Это связано с тем, что согласно классической теории [98] коэффициенты A и B уравнения ван Деемтера должны быть инвариантны по отношению к энантиомеру, тогда как кинетические коэффициенты C для оптических изомеров должны различаться. Такое поведение действительно часто встречается в хиральной хроматографии [127–131], однако нарушение этого правила не является редкостью [132].

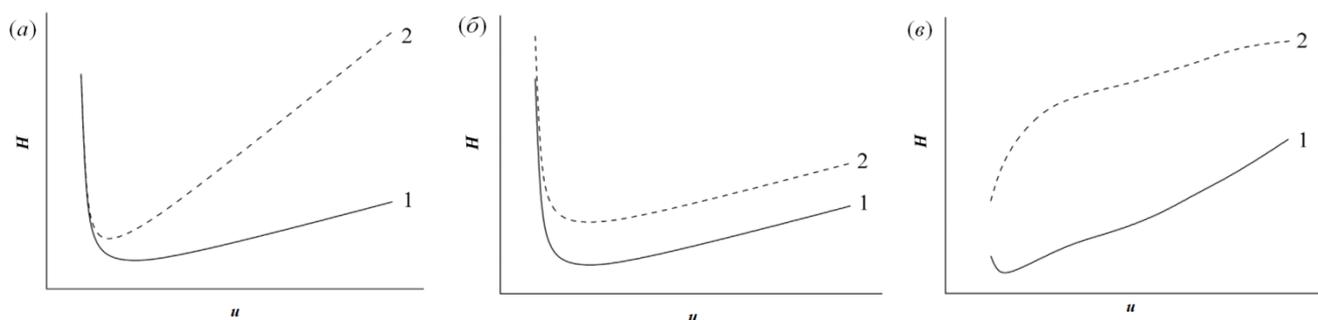


Рис. 1.7. Три типа кривых ван Деемтера для пары энантиомеров: (а) $A_1 = A_2, B_1 = B_2, C_1 < C_2$; (б) $A_1 < A_2, B_1 = B_2, C_1 = C_2$; (в) $A_1 \ll A_2, B_1 \neq B_2, C_1 < C_2$. Индексы 1 и 2 обозначают первый и второй элюированный энантиомер соответственно [132]

На рис. 1.7б показана ситуация, когда различное размывание пиков энантиомеров объясняется разницей в A -термах при равенстве C -термов. В работе [133] наблюдались почти параллельные Cu -ветви кривых ван Деемтера для энантиомеров бупивакаина, полученных на ХНФ Kromasil СНІ-ТВВ. Бархати и др. [134] наблюдали параллельные графики ван Деемтера для энантиомеров миансерина на ХНФ с привитым антибиотиком ванкомицином. Третий тип динамического поведения проиллюстрирован на рис. 1.7в и заключается в необычной, выпуклой вверх, форме кривой ван Деемтера для сильнее удерживаемого энантиомера [135]. Отклонение графика от обычной формы, определяемой классическим уравнением ван Деемтера [89], не является редкостью в ахиральной хроматографии [136; 137] и предсказывается, например, теорией сопряжения эффектов молекулярной и вихревой диффузии Гиддингса [85] [138]. Особенность этого явления в хиральной хроматографии состоит в различных формах кривых ван Деемтера для пары энантиомеров, когда кривая для первого элюированного энантиомера имеет обычную форму, а для второго элюированного энантиомера выпуклую вверх и лежит заметно выше, чем для первого (рис. 1.7в). Феллетти с соавт. обнаружили выпуклую вверх кривую ван Деемтера для более удерживаемого энантиомера хирального сульфоксида на колонке с полисахаридной ХНФ [139]. При этом первый элюированный энантиомер той же молекулы демонстрировал традиционную форму графика ван Деемтера. Авторы отмечали, что необычная форма графиков ван Деемтера наблюдается при сочетании сильного удерживания и замедленной диффузии вещества в твердой фазе. Действительно, в работе было установлено, что внутрипоровая диффузия сильнее удерживаемого энантиомера сульфоксида была на порядок меньше, чем у слабее удерживаемого энантиомера. Аналогичное поведение наблюдалось в работе [132] для некоторого хирального пирролохинолона на колонке Nautilus-R. Необычную форму кривых ван Деемтера авторы объясняли медленной кинетикой адсорбции/десорбции и несовершенной упаковкой неподвижной фазы в колонке, которая приводит к высокой трансколоночной вихревой диффузии. При этом отмечалось, что хотя

несовершенства слоя ХНФ в колонке могут объяснить высокий вклад вихревой диффузии в ВЭТТ, но не могут объяснить экспериментально наблюдавшихся различий в величинах этого вклада для энантиомеров, поскольку, будучи ахиральным эффектом, этот вклад должен быть одинаков для обоих оптических изомеров. Предполагалось, что именно медленная кинетика адсорбции или десорбции как-то влияет на вихревую диффузию, вызывая аномальное повышение значений ВЭТТ для более сильно удерживаемого энантиомера. Также в работе наблюдались необычно высокие значения коэффициентов продольной диффузии для обоих энантиомеров. Авторы предполагали, что часть ВЭТТ связанная с трансколоночной вихревой диффузией каким-то образом связана с *B*-термом уравнения ван Деемтера-Гиддингса. Это вполне логичное объяснение, так как трансколоночная вихревая диффузия может сочетать в себе несколько механизмов, возникающих из-за различных видов дальнедействующих неоднородностей в колонке, каждый из которых характеризуется своей собственной зависимостью от скорости потока. Армстронг с соавт. наблюдали выпуклые вверх графики ван Деемтера для более сильно удерживаемых энантиомеров *m*-тирозина [134] и гомофенилаланина [135] на ХНФ на основе тейкопланина. Они объяснили такое поведение эффектом нагрева, вызванным трением ПФ о стенки колонки и неподвижную фазу [140]. По мере увеличения расхода ПФ это явление может привести к повышению температуры по сравнению с заданным значением. При низких давлениях (ниже 200 бар) этот эффект незначителен, однако когда давление достигает 400 бар и выше при высоких скоростях потока температура в колонке может увеличиваться на десять градусов и более [134; 135]. Рост температуры приводит к увеличению константы скорости адсорбции (k_{ads}) и соответственно график ВЭТТ будет отклоняться вниз. Однако выпуклые вверх графики ван Деемтера наблюдались в работе [132], где давление не превышало 200 бар, следовательно, отклонение кривых от классической формы не могли быть вызваны эффектом нагрева трением.

1.4. Хиральные неподвижные фазы

Различия в свойствах оптических изомеров проявляются только в хиральном окружении, поэтому для хроматографического разделения энантиомерных смесей необходимо применение вспомогательного агента, который бы образовывал с разделяемыми изомерами диастереомерные комплексы. В энантиоселективной хроматографии с ХНФ такой агент вводится в структуру неподвижной фазы. Существует большое количество коммерческих ХНФ на основе природных и синтетических материалов, которые условно можно разделить на несколько классов.

Полисахариды

Наиболее распространенными полисахаридами, используемыми для получения ХНФ, являются целлюлоза и амилоза [141]; реже используются хитин и хитозан [142]. Нативные полисахариды редко проявляют высокую энантиоселективность, однако ее можно увеличить путем химической модификации [143]. Углеводы могут быть легко карбамоилированы или этерифицированы в результате реакций с изоцианатами или хлорангидридами карбоновых кислот [144].

Производные полисахаридов могут быть механически нанесены на силикагель. Такие ХНФ могут работать в нормально-фазовом, полярно-органическом и обращенно-фазовом режиме, однако диапазон применяемых элюентов ограничен из-за несовместимости с рядом растворителей, таких как дихлорметан, хлороформ, толуол и ацетон. Использование этих компонентов может привести к растворению полимера, и как следствие, вымыванию селектора из хроматографической колонки [9]. Этому недостатка лишены неподвижные фазы с ковалентно иммобилизованными полисахаридами, устойчивыми в контакте с более широким диапазоном растворителей. С другой стороны, потенциал хирального разделения с использованием иммобилизованных ХНФ на основе полисахаридов обычно ниже, чем у нанесенных, из-за искажения стереоспецифической конформации, вызванной процессом иммобилизации [145; 146].

Высокая универсальность полисахаридных ХНФ обусловлена комбинацией факторов: молекулярной хиральностью из-за присутствия стереогенных центров глюкопиранозных единиц, конформационной хиральностью из-за спирального закручивания основной цепи полимера, а также надмолекулярной хиральностью, возникающей в результате взаимодействия (выравнивания) соседних полимерных цепей с образованием упорядоченных полостей [147]. Следует также отметить, что ХНФ на основе полисахаридов характеризуются высокой загрузочной емкостью, что объясняет их широкое использование для препаративного разделения энантиомеров [7]. Различные примеры применения ХНФ на основе полисахаридов для разделения белков, пептидов и стереоизомеров аминокислот обсуждаются в обзорах [148] [149].

Белки

Белки представляют собой натуральные хиральные селекторы, способность которых к хиральному распознаванию давно известна. Структурно они представляют собой сложные образования с большой площадью поверхности, включающие различные стереогенные центры и центры связывания, которые обеспечивают многочисленные возможности межмолекулярных взаимодействий с небольшими молекулами. Белки могут проявлять энантиоселективность по отношению к широкому спектру заряженных частиц и нейтральных молекул. Наиболее

важными белковыми ХНФ являются нанесенные на инертный носитель (как правило, сликагель) сывороточный альбумин человека (HSA), α_1 -кислый гликопротеин (AGP), яичный белок овомукоид (OVM) и целлобиогидролаза I (CBH I) [9].

Белковые ХНФ совместимы с водными и водно-органическими ПФ, и могут быть использованы в хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Недостатками данных ХНФ являются медленная кинетика адсорбции, обуславливающая относительно большое размывание хроматографических пиков, и низкая концентрация центров связывания. Кроме того, белки характеризуются пониженной химической и биохимической стабильностью, поэтому даже небольшие изменения экспериментальных условий (рН, ионной силы, температуры и доли органического растворителя в ПФ) могут привести к денатурации белка. По этой причине белковые ХНФ не применяются в препаративной практике [9]. Активные исследования возможности разделения энантиомеров аминокислот и низкомолекулярных пептидов на белковых ХНФ осуществлялись в последней четверти XX века [150–153].

Циклодекстрины

Циклодекстрины (ЦД) – это циклические олигосахариды [154]. Наиболее распространенными являются α -, β - и γ -ЦД, которые представляют собой макроциклы с 6, 7 и 8 остатками D-(+)-глюкозы, соединенными α -1,4-гликозидными связями. Структура циклодекстрина представляет собой усеченный конус. Внутренняя полость неполярна из-за углеродного остова сахарных фрагментов, в то время как поверхности верхнего и нижнего обода гидрофильны, благодаря наличию гидроксильных групп [9]. Эти группы могут быть дериватизированы различными полярными или неполярными заместителями, которые могут влиять на конформационную гибкость ЦД, изменяя размер его полости и доступ к ней, а также создавать дополнительные центры связывания [155; 156].

Эффект энантиораспознавания на данных ХНФ обычно основан на образовании комплекса включения между анализируемыми веществами и внутренней полостью циклодекстрина [9]. Помимо этого, адсорбаты могут устанавливать различные типы взаимодействий с внешней поверхностью ЦД: водородные связи, диполь-дипольные, ионные, π - π и дисперсионные взаимодействия.

Одним из преимуществ ХНФ на основе циклодекстринов является их совместимость с широким спектром растворителей. Их можно использовать в нормально-фазовом, обращенно-фазовом, полярно-органическом и полярно-ионном режимах. Возможность разделения стереоизомеров аминокислот и дипептидов на ХНФ данного типа продемонстрирована в работах [157–160].

Краун-эфиры

Краун-эфиры состоят из макроциклических полиэфиров с полостью определенного размера, способных образовывать комплексы с аналитами. ХНФ на основе краун-эфиров можно разделить на две основные группы: краун-эфиры, содержащие 1,1'-бинафтильную группу, и краун-эфиры, содержащие две молекулы винной кислоты [161]. Применение данных неподвижных фаз в хиральной хроматографии ограничивается соединениями, имеющими первичную аминогруппу: аминокислоты, амиды аминокислот, ди- и трипептиды, аминоспирты [71; 161–163].

В качестве ПФ с такими адсорбентами используют сильноокислые водные растворы (рН 1-3.5) для достижения полного протонирования аминогруппы аналитов. Генерируемые таким образом хиральные ионы аммония могут энантиоселективно связываться с макроциклическим краун-эфиром за счет образования комплекса включения, вызванного образованием тройной водородной связи между ионом аммония и тремя электронодонорными атомами кислорода, расположенными внутри краун-эфира. Также в стабилизации комплекса участвуют заместители ионов аналита и функциональные группы краун-эфиров [9].

ХНФ на основе краун-эфиров получают механическим нанесением на подложку или иммобилизацией [164]. Однако из-за возможности вымывания ХНФ из колонки и для обеспечения возможности анализа гидрофобных соединений ковалентно связанные ХНФ являются более предпочтительными [165].

Донорно-акцепторные ХНФ (фазы Пиркла)

Данные ХНФ часто называют фазами «щеточного» типа, так как привитые молекулы хиральных селекторов выставлены в подвижную фазу наподобие волосков щетки [166]. Основой этого типа ХНФ являются нейтральные синтетические или полусинтетические хиральные низкомолекулярные вещества, способные к π -донорным или/и π -акцепторным взаимодействиям [9; 167]. Важными преимуществами фаз Пиркла являются: хорошие кинетические характеристики, широкая применимость, совместимость с любыми ПФ, высокая грузочная емкость колонок, доступность ХНФ с селекторами в обеих энантиомерных формах, что позволяет менять порядок элюирования разделяемых оптических изомеров [168]. За последние 20 лет синтезировано более 200 ХНФ Пиркла [169], которые используются для энантиоразделения широкого круга хиральных соединений. Пиркл с соавт. сообщили об эффективном разделении метиловых эфиров дипептидов [170; 171].

Лигандообменные адсорбенты

Данный тип ХНФ был впервые предложен Даванковым в 1968 году для разделения рацематов α -аминокислот с использованием в качестве селектора пролина, иммобилизованного на полистирольной подложке, в сочетании с ионами Cu (II) в элюенте [172]. Механизм

разделения в лигандообменной хроматографии основан на обратимом включении молекул аналита из ПФ в координационную сферу иона металла, связанного в результате комплексообразования с хелатирующим хиральным селектором, закрепленным на поверхности неподвижной фазы. В результате образуется обратимый тройной комплекс селектор/ион металла/лиганд. В зависимости от стерических и функциональных свойств аналитов эти диастереомерные тройные хелатные комплексы демонстрируют разные скорости образования и/или термодинамическую стабильность, что приводит к разным временам удерживания энантиомеров. В ходе процесса хроматографии координированные лиганды обратимо замещаются другими лигандами из ПФ [173].

Применимость лигандообменной хроматографии зависит от наличия металлохелатирующих функциональных групп как в селекторе, так и в аналите. Наиболее подходящими являются би- или тридентантные лиганды с двумя или тремя электронодонорными функциональными группами (гидроксильные, амина, карбоксильные группы). Предпочтительным хелатирующим ионом металла является Cu(II), однако возможно применение Zn(II) и Ni(II) [9]. В качестве селекторов часто используют циклические аминокислоты пролин и гидроксипролин, серосодержащие аминокислоты цистеин [174] и пеницилламин [175]. В основном лигандообменные хиральные адсорбенты используются для разделения энантиомеров α -аминокислот и α -гидроксикарбоновых кислот [9; 174].

1.4.1. Хиральные неподвижные фазы на основе макроциклических гликопептидных антибиотиков

Макроциклические антибиотики были введены в качестве хиральных селекторов для ВЭЖХ Армстронгом в 1994 г. [176]. В настоящее время они являются второй по популярности группой ХНФ после полисахаридов [9]. Данные ХНФ могут использоваться в обращенно-фазовом, нормально-фазовом, полярно-органическом и полярно-ионном режимах [177].

В семейство макроциклических антибиотиков входят сотни соединений, однако в качестве хиральных селекторов используются четыре основные группы: ансамицины, гликопептиды, полипептиды и аминогликозиды.

Ансамицины содержат ароматическое ядро, связанное с алифатической цепью. По структуре ароматического фрагмента различают нафталиновые ансамицины, содержащие нафталиновое или нафтохиноновое кольцо и бензольные ансамицины, содержащие бензольное или бензохиноновое кольцо [177]. Наиболее распространенными ансамицинами, используемыми в качестве ХНФ, являются рифамицины В и SV; первый из них энантиоселективен по отношению к катионным соединениям, а второй – по отношению к нейтральным и анионным веществам [144].

Полипептиды. Единственным полипептидным антибиотиком, который используется в качестве ХНФ является тиострептон. Он содержит пять тиазольных колец и одно хинолиновое кольцо. Данный антибиотик не получил широкого распространения как хиральный селектор для хроматографии [178].

Аминогликозиды. Аминогликозидные антибиотики представляют собой большое семейство водорастворимых слабых оснований и могут относиться к разным структурным классам. В первый структурный класс, содержащий 2-дезоксистрептаминовое кольцо, входят такие антибиотики, как канамицин, гентамицин, генетицин или неомицин. Другие классы включают стрептомицин, содержащий стрептидиновое кольцо или гигромицин, содержащий гиозаминовое кольцо. Многие из этих соединений являются природными антибиотиками, продуцируемыми преимущественно актиномицетами, в то время как другие представляют собой полусинтетические производные (например, амикацин) [177].

Гликопептидные антибиотики. Гликопептидные антибиотики представляют собой природные молекулы, которые состоят из гликозилированных циклических или полициклических нерибосомных пептидов и синтезируются различными видами бактерий, такими как *Actinoplanes*, *Streptomyces*, *Nonomuraea*, *Nocardia lurida* и *Amycolatopsis*. К важным гликопептидным антибиотикам относятся авопарцин, тейкопланин, ристоцетин А, ванкомицин, телаванцин, блеомицин, рамопланин и декапланин. Физико-химические свойства некоторых гликопептидных антибиотиков приведены в таблице 1.1.

Использование макроциклических гликопептидных антибиотиков в качестве хиральных селекторов связано с их механизмом взаимодействия с аминокислотами. Известно, что некоторые макроциклические антибиотики ингибируют развитие грамположительных бактерий, связываясь с концевыми остатками D-Ala-D-Ala мономеров пептидогликана, необходимого для построения клеточной стенки. Таким образом, они являются естественными селекторами пептидов, содержащих концевой остаток D-Ala.

В структуре гликопептидных антибиотиков имеется центральный гептапептидный домен, в котором пять из семи аминокислотных остатков являются общими для всех гликопептидов. Различия между молекулярными структурами гликопептидов заключаются в первой и третьей аминокислотах и в заместителях ароматических аминокислотных остатков. Ароматические остатки могут нести хлор, гидроксильные или метильные группы, при этом некоторые гидроксильные группы замещены сахарами или аминосахарами. Наличие фенольных групп позволяет формировать двух- и трехкольцевые структуры. Пептидный фрагмент, содержащий семь аминокислотных остатков, называется агликоном и является биологически активным. Сахара и аминосахара, играющие роль заместителей, обычно расположены снаружи молекулы, обуславливая различные фармакокинетические свойства и не

оказывают заметного влияния на активность антибиотиков. В некоторых гликопептидах, например, тейкоплатинах, аминогруппа аминсахара заменена цепью жирной кислоты, содержащей от девяти до одиннадцати атомов углерода [177].

Таблица 1.1

Физико-химические свойства гликопептидных антибиотиков

Характеристика	Эремомицин	Ристоцетин А	Тейкоплатин	Ванкомицин
Формула	$C_{73}H_{89}N_{10}O_{26}Cl$	$C_{95}H_{110}N_8O_{44}$	$C_{88}H_{97}N_9O_{33}Cl_2$	$C_{66}H_{75}N_9O_{24}Cl_2$
Молекулярный вес, Да	1556	2066	1878	1449
pK_a функциональных групп антибиотика	2.9; 7.1; 8.3; 9.2; 10.1; 10.9; 12.0	7.0; 8.3; 9.2; 9.9; 10.1; 10.9	2.8; 7.4; 8.5; 8.9; 9.3; 11.0	2.9; 6.8; 7.7; 8.5; 10.4; 11.7
Изократическая точка	8.5	7.5	6.5	7.2

Макроциклические гликопептидные селекторы содержат большое количество разных функциональных групп и обладают характерной конформацией, образующей внутреннюю полость («карман»), что обеспечивает широкие возможности для энантиоселективного связывания с хиральными веществами. В зависимости от структуры аналита и режима хроматографирования могут реализовываться различные типы взаимодействий: ионные, электростатические, π - π взаимодействия, водородные связи. Также заметную роль в энантиораспознавании могут играть стерические, гидрофобные и другие типы взаимодействий [144; 179].

Макроциклические гликопептиды используются для разделения широкого круга хиральных молекул, включая дериватизированные и недериватизированные аминокислоты, пептиды, гидроксикислоты, аминоэфиры, сульфоксиды, имиды, оксазолидиноны, β -блокаторы, профеновые нестероидные противовоспалительные препараты и многие другие [144; 178; 180].

Ванкомицин – гликопептид, продуцируемый бактериями *Streptomyces orientalis* [177], был первым представителем группы гликопептидных антибиотиков, использованном в хроматографии [176]. В молекуле ванкомицина есть три макроциклических домена, которые также содержат пять ароматических колец (рис. 1.8). К центральному фрагменту присоединены

две боковые группы, одна из которых – дисахарид L-ванкозаминил-D-глюкоза, а другая – N-метиллейцин. Структура боковых цепочек может отличаться в аналогах ванкомицина, продуцируемых другими штаммами вида *orientalis*, или в химически модифицированных ванкомицинах [181]. Нативная молекула содержит вторичную аминогруппу и карбоксильную группу и, таким образом, может выступать как в качестве слабого анионообменника, так и в качестве слабого катионообменника в соответствующих диапазонах pH.

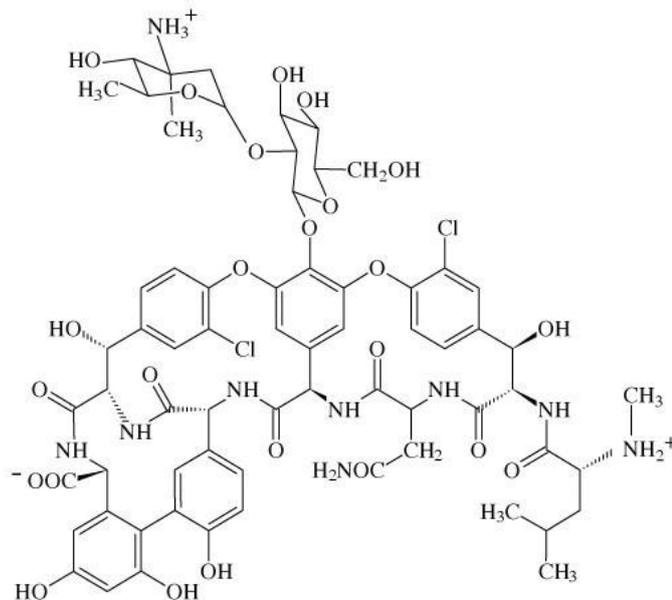


Рис. 1.8. Структурная формула ванкомицина [177]

Наиболее часто ванкомицин как хиральный селектор используется для энантиоразделения хиральных лекарственных соединений. В работе [182] разработана методика разделения энантиомеров ателолола, который является избирательным β_1 -адреноблокатором. Янг и др. исследовали влияние pH ПФ, скорости потока, температуры на разделение дулоксетина и его R-энантиомера [183]. В работе [184] изучалось влияние состава ПФ на разделение энантиомеров венлафаксина и O-десметил венлафаксина. Авторы указывают, что изменение концентрации электролита (ацетат аммония) в диапазоне от 10-100 мМ не оказывает существенного влияния на энантиоразделение. В качестве органических модификаторов ПФ использовались метанол, ацетонитрил, 2-пропанол. Добавление ацетонитрила в ПФ отрицательно сказывалось на разделении энантиомеров. Концентрация метанола варьировалась от 80 до 95 об.%. Увеличение доли метанола в ПФ не влияло на коэффициент разделения, но улучшало разрешение (R_s) пиков. Время удерживания аналитов росло с увеличением концентрации метанола в элюенте, что не соответствует типичному поведению в обращено-фазовой хроматографии на C18 колонках, когда время выхода уменьшается с увеличением доли метанола. Авторы сделали вывод о смешанном (т.е. не чистом обращенно-фазовом) механизме

удерживания на ванкомициновой ХНФ. Хефнави с соавт. [185] изучали хроматографическое поведение энантиомеров буфуралолола на ХНФ на основе ванкомицина в полярно-ионном режиме. В качестве ПФ использовались смеси метанол–уксусная кислота–триэтиламин. При отсутствии основания в ПФ энантиоразделение не наблюдалось, что объясняется сильным отталкиванием между протонированными аминогруппами молекул адсорбата и ХНФ. Авторы отмечают, что концентрация уксусной кислоты и триэтиламина в ПФ оказывает существенное влияние на удерживание. Хашем с соавт. изучали влияние температуры, концентрации буферной соли (NH_4NO_3) и pH ПФ на разделение энантиомеров тербуталина и сабутамола на колонке Chirobiotic V [186]. Установлено, что влияние катиона буферной соли (эффект конкурентной адсорбции) является доминирующим фактором, влияющим на энантиоразделение исследуемых адсорбатов; увеличение концентрации соли приводило к значительному уменьшению времени удерживания и ухудшению разрешения.

В работе [187] было предсказано хроматографическое поведение нескольких хиральных соединений на колонке Chirobiotic V с использованием программного обеспечения DryLab. Авторы исходили из предположения, что в обращено-фазовом режиме на данной колонке механизм удерживания соответствует сольвофобной теории.

Тейкопланины представляют собой группу антибиотиков, продуцируемых актиномицетом *Actinoplanes teichomyceticus* [178]. Группа включает 5 близкородственных гликопептидов, обозначаемых тейкопланин А с индексами от 2-1 до 2-5. Они сходны по структуре и спектру действия с ванкомицином, родительским антибиотиком этой группы. Как и все гликопептидные антибиотики семейства ванкомицина, тейкопланины содержат пептидное ядро, состоящее из семи аминокислотных остатков; по периферии молекулы расположены три углеводных остатка: N-ацил- β -D-глюкозамин, N-ацетил- β -D-глюкозамин и α -D-манноза, которые связаны с агликоном в положениях 4, 6 и 7 соответственно. Структура ацильной боковой цепочки β -D-глюкозамина определяет тип тейкопланина: 4-декановая кислота (A_{2-1}), 8-метилнонановая кислота (A_{2-2}), n-декановая кислота (A_{2-3}), 8-метилдекановая кислота (A_{2-4}) и 9-метилдекановая кислота (A_{2-5}). Наиболее распространенный компонент группы, тейкопланин A_{2-2} , ранее также известный как тейкомицин A_2 [188], в хроматографической литературе получил название тейкопланин (без указания идентификатора A_{2-2}) (рис. 1.9). Молекула содержит одну первичную аминогруппу и одну карбоксильную группу и, таким образом, может проявлять свойства как слабого катионообменника, так и слабого анионообменника. Агликоновая часть тейкопланина также используется в качестве хирального селектора в хроматографии [178]. Хроматографические свойства агликоновой ХНФ несколько, хотя и не драматически, отличаются от свойств ХНФ с привитым исходным тейкопланином [189].

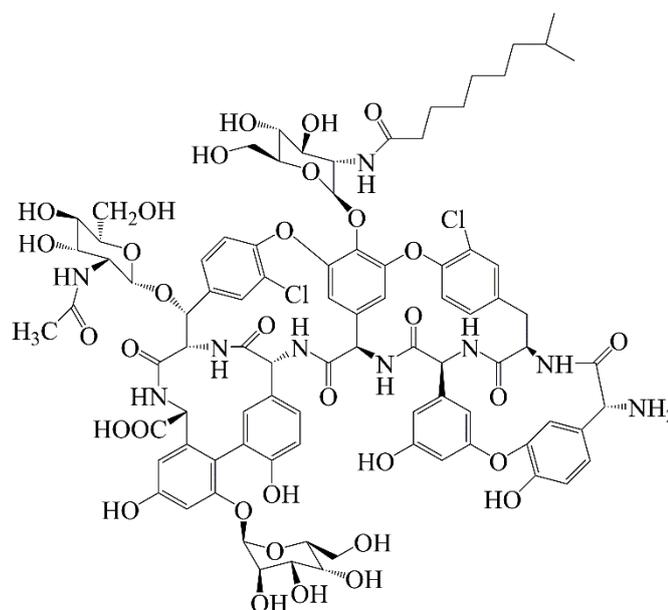


Рис. 1.9. Структурная формула тейкопланина

Тейкопланин является наиболее часто используемым хиральным селектором из числа макроциклических гликопептидных антибиотиков, продемонстрировавшим способность к эффективному разделению более сотни стереоизомеров различных соединений [180], включая природные и синтетические аминокислоты и пептиды [179; 190; 191].

В работе [192] сообщается, что в обращенно-фазовом режиме хроматографии макроциклические гликопептидные антибиотики являются неполярными центрами адсорбции благодаря наличию гидрофобного хирального «кармана» в структуре. Тейкопланин в дополнение к этому имеет алкильный фрагмент, что делает его еще более гидрофобным. Следствием этого являлся наблюдавшийся Пейрином с соавт. [193] рост фактора удерживания дансильированных аминокислот на тейкопланиновой ХНФ с увеличением гидрофобности адсорбата в ПФ с низким содержанием органического растворителя. Интересно, что коэффициенты разделения энантиомеров были невелики. Это может указывать на то, что хиральный «карман» мог быть не задействован в процессе энантиораспознавания, то есть удерживание определялось взаимодействием с периферическими группами хирального селектора.

Влияние содержания типа органического растворителя (метанол или ацетонитрил) в элюенте на зависимости фактора удерживания от φ изучалось в работе [194]. Зависимости $k(\varphi)$ для 5-метил-5-фенилгидантоина имели U-образный характер для смесей вода–ацетонитрил и убывающие зависимости для смесей вода–метанол. Возрастающую ветвь зависимости k от доли ацетонитрила при $\varphi > 80$ об.% авторы объясняли тем, что ацетонитрил как апротонный растворитель не может конкурировать с молекулами адсорбата за взаимодействие с центрами

образования водородных связей хирального селектора. Авторы работы [195] сравнивали хроматографическое поведение 28 хиральных соединений, включая аминокислоты, на ХНФ с привитым тейкопланином и родственным ему антибиотиком А-40,926. Рост удерживания фенилаланина при увеличении содержания метанола в ПФ объяснялся уменьшением растворимости аминокислоты в элюенте с высокой долей метанола, хотя более вероятным объяснением является уменьшение сольватации аминокислоты в элюенте с высоким содержанием спирта.

Армстронг с соавт. изучали возможность разделения нативных аминокислот, пептидов, α -гидроксикарбоновых кислот и различных нейтральных веществ, включая циклические амиды и амины на ХНФ Chirobiotic T с привитым тейкопланином в обращенно-фазовом, нормально-фазовом и «полярно-органическом» режимах [194]. Авторы исследовали влияние рН элюента на удерживание и установили, что подкисление ПФ до 4.1 приводит к заметному увеличению удерживания веществ со свободными карбоксильными группами, что указывает на более сильное связывание протонированных кислот с молекулой тейкопланина чем соответствующих анионов. Каваццини с соавт. сравнивая адсорбцию аминокислот и этерефицированных аминокислот на аналогичной ХНФ, продемонстрировали критическую роль аминокислотной СООН-группы в хиральном распознавании – этерификация аминокислот приводила к потере энантиоселективности [196].

Яндера с соавт. измеряли изотермы адсорбции энантиомеров фенилглицина на Chirobiotic T [126]. Авторы отмечают, что удерживание и селективность разделения энантиомеров увеличиваются с ростом концентрации метанола или этанола в водно-органических ПФ. Интересно, что адсорбция более слабо удерживаемого L-фенилглицина хорошо описывалась изотермой адсорбции Лэнгмюра, тогда как сильнее удерживаемого D-фенилглицина – изотермой адсорбции би-Лэнгмюра, указывая на взаимодействие D-энантиомера с дополнительными хиральными центрами адсорбции на поверхности селектора. Изотермы адсорбции энантиомеров пролина, аланина и аланилаланина на хиральном адсорбенте на основе тейкопланина были измерены Каваццини и др. [197].

Ристоцетин А (рис. 1.10), иногда называемый ристомицин А, вырабатывается актиномицетами *Nocardia lurida*, которые также продуцируют, но в меньшем количестве, структурно подобное соединение, известное как ристоцетин В, отличающееся строением одного из углеводных остатков [198]. Содержание формы В в коммерческом ристоцитине не превышает 10%. Подобно тейкопланину агликон ристоцетина А состоит из четырех пептидных макроциклов, содержащих 7 бензольных колец и формирующих своеобразный «карман», служащий центром прочного связывания для фрагмента –D-Ala-D-Ala бактериальных мукопептидов [178]. К агликоновой части ковалентно присоединены три углеводных

фрагмента, один из которых тетрасахарид. Молекула содержит две первичных аминогруппы, но в отличие от тейкопланина и ванкомицина не содержит свободной кислотной группы – карбоксильная группа ристоцетина А метилирована. Таким образом, ристоцетин А обладает свойствами слабого анионообменника.

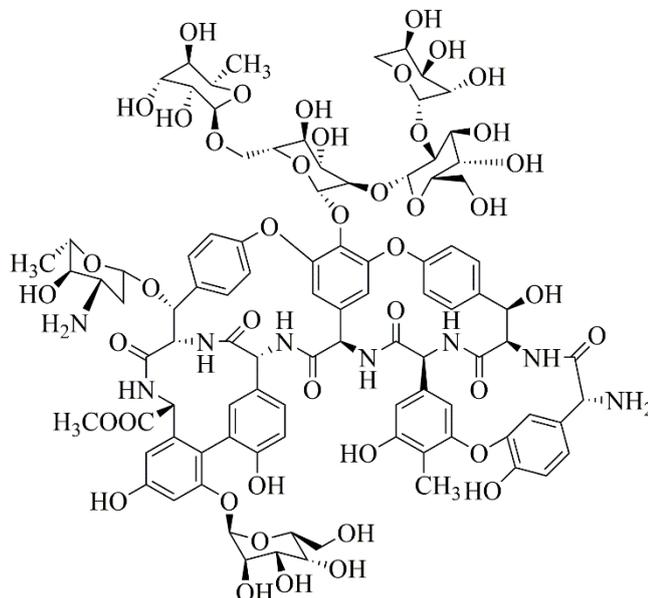


Рис. 1.10. Структурная формула ристоцетина А

Ристоцетин А впервые был использован в качестве хирального селектора Армстронгом с соавт. [176]. Соответствующие ХНФ показали свою эффективность в разделении энантиомеров кислотных, цвиттер-ионных и нейтральных соединений [192; 199–203]. Вильямс с соотр. экспериментально доказали, что удерживание аминокислот и пептидов ристоцетином А осуществляется за счет образования водородных связей и гидрофобных взаимодействий адсорбата с внутренними стенками хирального «кармана» селектора (рис. 1.11), а разделение энантиомеров становится возможным за счет различий в их расположении внутри хирального «кармана» [204].

Армстронг с соавт. также указывали на существенное влияние водородных связей на энантиоразделение в нормально-фазовом режиме [202]. Петер и др. [199; 205; 206] исследовали удерживание 1,2,3,4-тетрагидроизохинолина, γ -бутиролактона и неприродных аминокислот из полярно-органических и водно-органических растворителей и отмечали, что в последнем случае помимо водородных связей на процесс энантиоразделения влияют ион-ионные, гидрофобные и электроориентационные взаимодействия. Гоголишвилли и Решетова, сравнивая закономерности удерживания и термодинамики адсорбции энантиомеров ароматических гидроксикислот и их производных на ХНФ с привитыми антибиотиками ристоцетином А, эремомицином и тейкопланином из водно-этанольных элюентов [207], пришли к выводу, что

ключевую роль в удерживании указанных веществ на ристоцетиновой и эремомициновой колонках играют ионные взаимодействия, тогда как на тейкопланиновой – неионные.

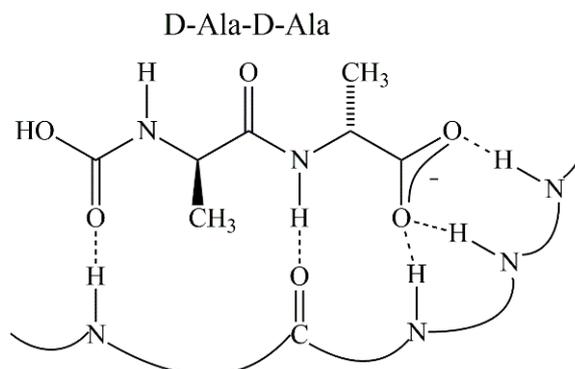


Рис. 1.11. Связывание D-Ala-D-Ala с внутренними стенками хирального «кармана» ристоцетина А

Эремомицин – гликопептидный антибиотик (рис. 1.12), выделенный из культуры *Amycolatopsis orientalis*. Структура агликона эремомицина подобна таковой агликона ванкомицина с тем отличием, что у эремомицина в трехъядерном аминокислотном фрагменте содержится один атом Cl, а у ванкомицина – два (см. рис 1.12 и 1.8). Периферийные группы включают остатки глюкозы и два остатка аминасахара эремозамина. Впервые ХНФ с привитым эремомицином была получена группой Староверова в Московском государственном университете [208]. Они коммерциализовали соответствующую колонку сначала под названием Diaspher-Chiralsel-E (до 2014 г.), а потом под названием Nautilus-E. Эффективность данных колонок для разделения α -аминокислот, α -гидроксикислот и профенов была продемонстрирована в работах [208–211]. Кузнецовым и др. [212] изучено влияние состава ПФ, температуры, pH элюента и строения α -аминокислот на удерживание и разделение их энантиомеров. Авторы предполагали наличие ионных взаимодействий между исследуемыми адсорбатами и поверхностью хирального селектора, на что указывало снижение времени удерживания при добавлении NaH_2PO_4 в ПФ. Хроматографическое поведение и термодинамика адсорбции энантиомеров профенов на ХНФ Diaspher-Chiralsel-E с использованием водно-этанольных ПФ подробно исследована в работе [213]. Авторы отмечают отличие механизма удерживания энантиомеров 2-арилпропановых кислот на эремомициновой ХНФ от такового для гидрофобных обращено-фазовых адсорбентов за счет существенной ионообменной составляющей [83]. Изотермы адсорбции энантиомеров метионина на той же ХНФ описаны моделью би-Лэнгмюра, что указывает на наличие как минимум двух типов адсорбционных центров [214]. В то же время, изотермы адсорбции энантиомеров ибупрофена на обсуждаемой ХНФ имели сложную форму нелэнгмюровского типа с точкой перегиба, что авторами

объяснялось наложением эффекта диссоциации адсорбтива в ПФ на эффект энергетической гетерогенности поверхности неподвижной фазы [215].

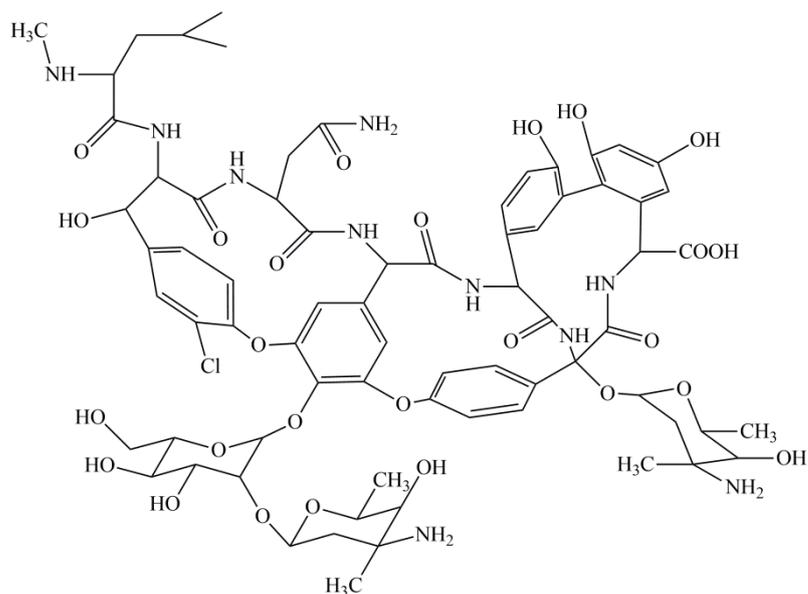


Рис. 1.12. Структурная формула эремомицина

1.4.2. Хиральные неподвижные фазы на основе производных хининовых алкалоидов

Первые попытки использования алкалоидов хинного дерева, иммобилизованных на ионообменных смолах, для разделения оптических изомеров относятся к 1953 году [216]. В 1984 году Петтерсон применил ион-парную жидкостную хроматографию с хинином в качестве противоиона для разделения энантимеров карбоновых и сульфоновых кислот [217]. В это же время Розини с соавт. синтезировали адсорбент на основе силикагеля с привитым хинином [218]. Полученная ХНФ показала ограниченную способность к энантиоразделению ($\alpha = 1.00-1.16$). Впоследствии было предпринято несколько попыток улучшить энантиоселективность привитых хинина и хинидина путем их химической модификации [219]. Прорыв был достигнут Линднером и соавт. в конце 1980-х годов благодаря введению карбаматной группы в структуру селектора: полученные ХНФ показали хорошую разрешающую способность для широкого круга соединений [220]. В 2002 году ХНФ на основе трет-бутилкарбаматных производных хинина и хинидина (рис. 1.13а) были выпущены под названиями Chiralpak QN-AX и Chiralpak QD-AX. Данные колонки широко используются для разделения хиральных кислот, таких как N-замещенные аминокислоты [220–222], арилкарбоновые кислоты [220], гидроксикарбоновые кислоты [223], а также пептидов.

Поскольку Chiralpak QN-AX и Chiralpak QD-AX являются хиральными анионообменниками и имеют ограниченную область применения, их структура была модифицирована для создания цвиттер-ионных хиральных селекторов [224]. Новые ХНФ с

сульфогексилкарбаматным фрагментом коммерчески доступны под названиями CHIRALPAK ZWIX(+) (производное хинина с конфигурацией 1S и 2S в катионообменном центре) и ZWIX(-) (производное хинидина с конфигурацией 1R и 2R в катионообменном центре) (рис. 1.13б). Эти гибридные селекторы сочетают в себе свойства как хиральных анионообменников, так и катионообменников. Кроме того, два первичных ионообменных центра связывания действуют синергетически, обеспечивая хиральное распознавание амфотерных соединений, включая аминокислоты [224–226], аминосульфоновые кислоты, фосфиновые кислоты [227], а также пептиды [225; 228; 229].

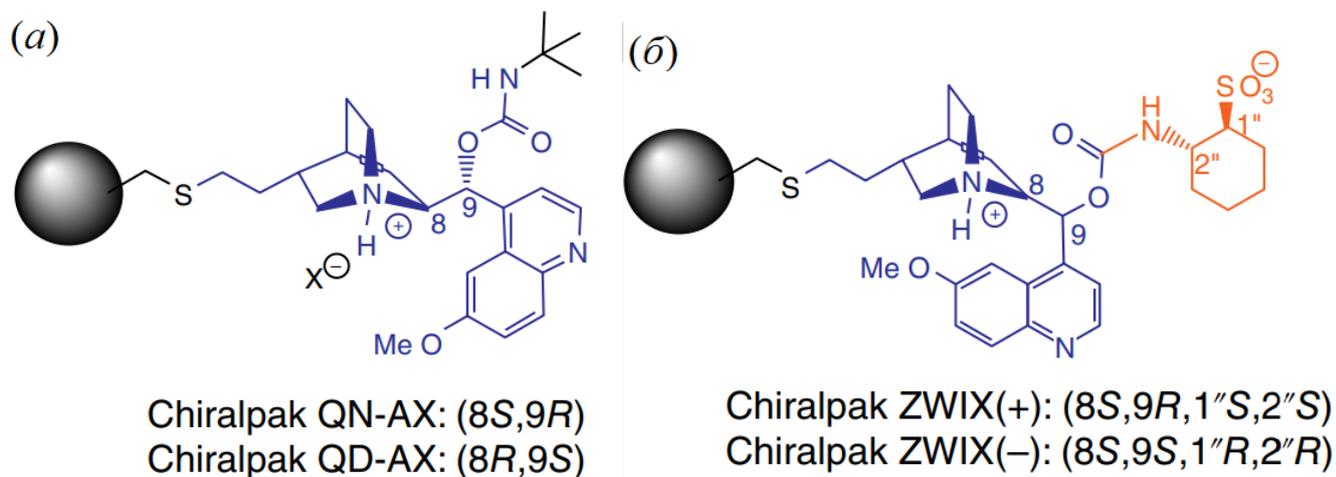


Рис. 1.13. Структуры ХНФ на основе производных хининовых алкалоидов: *a* – Chiralpak QN-AX и Chiralpak QD-AX, *б* – ZWIX(+) и ZWIX(-) [230]

Особое практическое значение имеет нередко наблюдаемое псевдоэнантиомерное поведение ХНФ QN-AX и QD-AX, а также ZWIX(+) и ZWIX(-). Хинин и хинидин являются диастереомерами по отношению друг к другу (конфигурации в положениях 1,3 и 4 идентичны, и противоположны по атомам углерода 8 и 9). С экспериментальной точки зрения селекторы хинин и хинидин ведут себя как энантиомеры, так как порядок выхода энантиомеров меняется при изменении конфигурации алкалоидного фрагмента. Это объясняется влиянием пространственной ориентации функциональных групп и центров первичного взаимодействия при C9, которая имеет решающее значение для механизма хирального распознавания. Возможность обращения порядка выхода энантиомеров зависит от адсорбата и механизма хирального распознавания. Так как хинин и хинидин являются диастереомерами, а не энантиомерами, инверсия порядка выхода при замене хинина на хинидин наблюдается не всегда. Например, для энантиомеров 2-гидроксимасляной кислоты при переходе с ХНФ QD-AX на QN-AX имеет место обращение порядка элюирования, но на ХНФ ZWIX(+) и ZWIX(-) такой картины не наблюдается. В случае винной кислоты порядок выхода энантиомеров остается

неизменным при изменении конфигурации алкалоидного фрагмента на обоих типах колонок [231].

Данный тип ХНФ совместим практически со всеми хроматографическими растворителями, от неполярных (гексан) до высокополярных (ацетонитрил, метанол, вода), включая хлоралканы и тетрагидрофуран. Они успешно использовались для разделения энантиомеров различных соединений в обращенно-фазовом [232], полярно-органическом [233] [234], HILIC [235; 236] и нормально-фазовом [237] режимах.

На цвиттер-ионных ХНФ удерживание электролитов определяется электростатическими взаимодействиями между заряженными функциональными группами адсорбата и ионизированными функциональными группами хирального селектора. Выбор ПФ будет влиять на состав и толщину сольватной оболочки, а, следовательно, и на доступность хиральных центров для растворенных веществ. Селектор на основе хинуклидинового кольца в кислой среде будет действовать как положительно заряженный анионообменный центр. Соответственно, анионные добавки будут действовать как противоионы, вытесняющие адсорбированные вещества с данного центра. Вторым центром ионообменного взаимодействия цветтерионных ХНФ является катионообменный центр, в случае фаз ZWIX – это депротонированный циклогексансульфокислотный фрагмент. Таким образом, удерживание амфолитных адсорбатов будет определяться взаимодействием как с анион- так и катионообменными центрами хирального селектора.

Предпочтительными ПФ при использовании ХНФ на основе хининовых алкалоидов являются неводные полярные органические растворители (метанол или ацетонитрил) в сочетании с кислотными и/или основными модификаторами (полярно-ионный режим). Наилучшей комбинацией является использование MeOH в качестве протонного растворителя (который может подавлять водородные связи) и MeCN в качестве полярного, но апротонного растворителя (может усиливать ионные взаимодействия, но мешает π - π взаимодействиям). Это позволяет уменьшить (подавить) неспецифические гидрофобные взаимодействия с ХНФ, тем самым повышая энантиоселективность.

Чтобы модулировать первичное ионное взаимодействие между хиральным селектором и анализируемым веществом, неводные полярные органические растворители обычно модифицируют добавлением кислоты и/или основания. Добавки влияют на ионное состояние и/или образование ионных пар как хирального селектора, так и аналитов, поэтому анионы и катионы кислотных и основных добавок могут влиять на хроматографические характеристики. Удерживание на ионообменниках удобно регулировать, варьируя концентрацию противоионов: чем выше концентрация противоионов, тем хуже удерживание.

Описываемый класс ХНФ широко используется в фармацевтической промышленности для определения энантиомерной чистоты лекарственных препаратов. Так в работах [238–241] продемонстрировано разделение Fmoc-аминокислот, используемых в качестве строительных блоков для синтеза пептидов, на ХНФ QN/QD-AX и ZWIX(+) и ZWIX(–). Также на данном типе ХНФ осуществлено разделение энантиомеров и диастереомеров ди- и трипептидов [229; 242; 243]. В работе [228] исследована термодинамика адсорбции дипептидов, а также влияние состава ПФ и структуры адсорбатов на их хроматографическое поведение. Авторы отмечают, что стереоселективный механизм удерживания основан на электростатических межмолекулярных взаимодействиях, поддерживаемых дополнительными связями, которые определяются абсолютной конфигурацией хиральных атомов C8 и C9 фрагментов хинина и хинидина. В работе [225] подробно рассмотрены пути оптимизации процесса разделения энантиомеров аминокислот.

Сообщается о способности ХНФ QN-AX, QD-AX, ZWIX(+) и ZWIX(–) к энантиоразделению хиральных гидроксипропановых кислот, которые являются биомаркерами различных заболеваний [223; 231; 244]. Авторы работы [223] исследовали влияние состава ПФ, температуры и скорости потока на разделение энантиомеров 2-гидроксиглутаровой кислоты. Отмечается, что при использовании смесей MeOH–MeCN в качестве ПФ, высокое содержание метанола приводит к значительному снижению удерживания дипептидов, что объясняется большей элюирующей силой метанола как протонного растворителя по сравнению с ацетонитрилом. Причиной этого является его лучшая сольватирующая способность по отношению к полярным адсорбатам. Одновременно с уменьшением времени анализа при увеличении концентрации MeOH ухудшалось разрешение пиков энантиомеров. Авторы объясняли это сильным взаимодействием метанола с адсорбатами, что существенно мешало взаимодействию между селектором и анализируемыми веществами. В работе также исследовано влияние на разделение определяемых энантиомеров типа растворителя (метанол, этанол и пропанол), типа амина (аммиак, диэтиламин, триэтиламин) в качестве добавки в составе элюента, а также концентрации муравьиной кислоты.

ХНФ на основе производных хининовых алкалоидов также успешно применялись для анализа D-аминокислот в биологических жидкостях и тканях [245–249]. ХНФ ZWIX(+) и ZWIX(–) использовались для изучения динамики изомеризации C-концевых пролиновых дипептидов в диапазоне температура от -15°C до $+45^{\circ}\text{C}$ [250]. Также колонки ZWIX(+) и ZWIX(–) использовались для определения структуры липопептидов [251]. В работе [252] показана эффективность указанных ХНФ для хирального разделения серинсодержащих ди-, три- и тетрапептидов. В работе [236] рассматривали возможность энантиоразделения цвиттер-ионных веществ (на примере β -аминокислот) с элюентами, не содержащими ионных добавок.

Авторы наблюдали U-образные зависимости фактора удерживания от содержания органического компонента, как метанола, так и ацетонитрила, в ПФ. Для объяснения удерживания в указанной системе была выдвинута электростатическая модель притяжения-отталкивания (рис. 1.14) [236].

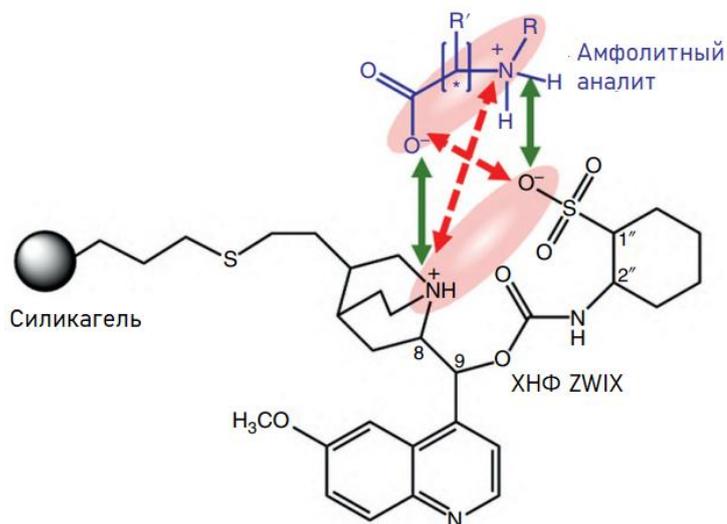


Рис. 1.14. Электростатическая модель притяжения-отталкивания между ХНФ ZWIX и амфолитным анализом. Зеленые стрелки указывают на притягивающие электростатические взаимодействия, красные — на отталкивающие [236]

Жанг и др. [225] измерили кривые ван Деемтера энантиомеров двух аминокислот, триптофана и 2-амино-2-фенилбутановой кислоты, на колонке ZWIX(+) с размером зерен адсорбента 3 мкм. Они обнаружили классическую форму кривых с минимумом в области низких скоростей потока и линейной восходящей ветвью. Графики для оптических антиподов располагались близко друг к другу, указывая на слабую энантиоселективность кинетики адсорбции. Величина приведенной ВЭТТ варьировалась от 3 до 4.3 для слабо удерживаемой 2-амино-2-фенилбутановой кислоты и от 4 до 7 для прочнее удерживаемого триптофана, что несколько выше, чем у ахиральных колонок с таким же зернением неподвижной фазы, но соответствует эффективности хиральных колонок «щеточного» типа.

В целях расширения области применения ХНФ типа ZWIX были синтезированы амфолитные ионообменники ZWIX(+A) и ZWIX(-A) (рис. 1.15). Селекторы указанных адсорбентов отличаются от их аналогов ZWIX(+) и ZWIX(-) природой алкалоидного основания (хинин в (+A), хинидин в (-A) и конфигурацией аминокислотной группы ((R,R) в (+A), (S,S) в (-A)).

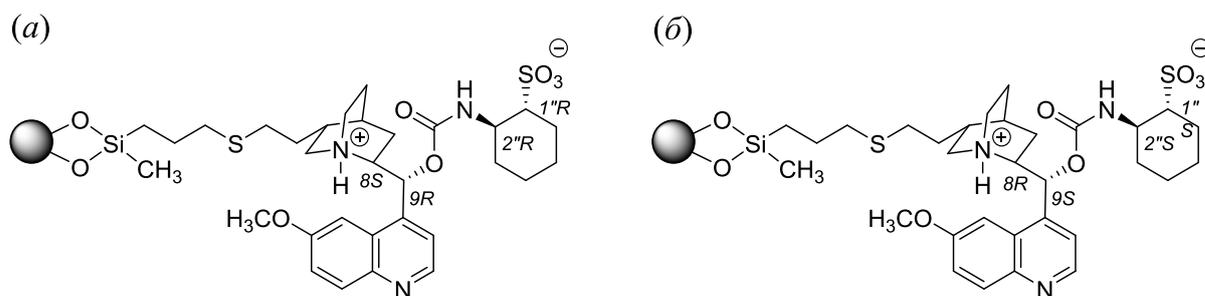


Рис. 1.15. Структурные формулы цвиттер-ионных хиральных неподвижных фаз:

a – ZWIX(+A), *б* – ZWIX(-A)

На указанных адсорбентах продемонстрировано успешное разделение энантиомеров цис- и транс-стереоизомеров циклических β -аминогидроксамовых кислот и родственных им цис- и транс-циклических β -аминокислот [51; 253]. Как и в случае ZWIX(+) и ZWIX(-) на ХНФ ZWIX(+A) и ZWIX(-A) наблюдалось обращение порядка элюирования энантиомеров при изменении конфигурации алкалоидного фрагмента, то есть замены хинина на хинидин.

Несмотря на выполнение большого числа исследований по изучению возможности использования ХНФ на основе аддуктов хинина и хинидина для разделения оптических изомеров, все еще остается непонятной связь структуры данных селекторов с их адсорбционными свойствами, что затрудняет как молекулярный дизайн хиральных селекторов для повышения их разрешающей способности, так и оптимизацию методик разделения. Исследования по влиянию состава ПФ на удерживание и энантиоразделение хиральных веществ на представленных в данной работе ХНФ на основе производных хинина и хинидина отсутствуют.

1.5. Удерживание дипептидов на хиральных неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками

Энантиоразделение дипептидов на ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками тейкопланином и ристоцетином А впервые было осуществлено группой Армстронга [202]. Они обнаружили, что из двух органических компонентов водно-органических ПФ, метанола и ацетонитрила, первый обеспечивал лучшее разделение энантиомеров дипептидов. Авторы использовали как безбуферные ПФ, так и системы с добавкой триэтиламино-ацетатного буфера. Было замечено, что стереоизомеры с D-аминокислотой в С-концевом положении элюируются после соответствующих энантиомеров, т.е. LD после DL, а DD после LL; порядок элюирования диастереомеров может варьироваться в зависимости от дипептида и состава ПФ [82; 190], что согласуется с механизмом связывания, предложенным Вильямсом с соавт. для гликопептидных антибиотиков в растворах [254].

Согласно этому механизму концевая карбоксильная группа в D-конфигурации обладает лучшим стерическим соответствием макроциклическому «карману» антибиотика и удерживается за счет образования трех водородных связей в сочетании с гидрофобным взаимодействием между боковым заместителем аминокислоты и гидрофобной стенкой «кармана» (см. раздел 1.4.1, рис. 1.11). Хотя иммобилизация на твердой поверхности может исказить структуру хирального селектора и затруднить доступ к макроциклической полости, как показывают упомянутые выше экспериментальные данные, энантиоселективность макроциклических антибиотиков в растворах аналогична их энантиоселективности в составе ХНФ.

Исследование механизмов удерживания дипептидов хроматографическими методами дают, однако, более сложную картину, чем описано в работах группы Вильямса [204]. Длительная дискуссия, до настоящего времени не завершенная, велась по вопросу о доминирующем типе взаимодействий при удерживании аминокислот и низкомолекулярных пептидов. Армстронг с соавт. утверждали, что первичное значение имеет кулоновское притяжение между разноименно заряженными ионогенными функциональными группами селектора и селектанда ПФ [190; 202]. Это могут быть аминная группа селектора и карбоксильная группа селектанда, но не исключается ситуация связывания через ионизованную карбоксильную группу селектора, которые имеются у тейкопланина и ванкомицина, и протонированную аминогруппу аминокислоты или пептида.

С другой стороны, Д'Акуарика с соавт. [181], опираясь на вышеупомянутую модель Вильямса и др., утверждали, что доминирующий вклад в удерживание пептидов вносит образование водородных связей между амидными группами внутренней стенки макроцикла и кислородными атомами карбоксильной группы пептидного анализата. Недавнее исследование Решетовой и др. [82] показало, что механизм связывания может отличаться для разных дипептидов и для разных макроциклических антибиотиков. Так в удерживании Leu-Leu и Leu-Gly на ХНФ Chirobiotic T и Chirobiotic R главную роль играют ион-ионные взаимодействия, тогда как в случае Gly-Leu на Chirobiotic T в удерживании L-изомера значительную роль играют ион-ионные взаимодействия, а в удерживании его оптического антипода – неионные взаимодействия. Важным обстоятельством, влияющим на удерживание дипептидов, является их ионизация в ПФ. Оно же объясняет зависимость фактора удерживания дипептидов от pH [82; 255]. Существующие в изоэлектрической точке (pI) в цвиттер-ионной форме дипептиды переходят в катионную/анионную форму при отклонении pH от нее в кислую/основную область. Адсорбционные свойства этих форм могут быть разные. Так, например, сродство различных форм дипептидов по отношению к привитому тейкопланину изменяется в ряду катионы > анионы > цвиттер-ионы, а по отношению к привитому ристоцетину А, являющемуся

в отличие от цвиттер-ионного тейкопланина основанием, ряд средств меняется на анионы > цвиттер-ионы > катионы [82].

Для исследования адсорбции дипептидов на антибиотиковых ХНФ применяли методы нелинейной хроматографии. Так, Каваццини и др. [197], измерили изотермы адсорбции энантиомеров Ala-Ala на ХНФ с привитым тейкопланином и продемонстрировали энергетическую гетерогенность поверхности адсорбента, что указывает на существование различных мод связывания адсорбата с селектором. К аналогичным выводам пришли Аснин с соавт., исследовавшие адсорбцию энантиомеров Gly-Asp на ХНФ с привитым эремомицином с применением метода обратного моделирования [255]. Термодинамика адсорбции дипептидов на ХНФ с привитыми антибиотиками эремомицином и ристоцетином А рассматривалась в диссертации М.В. Степановой [256]. На тех же антибиотиках исследовалось влияние доли органического компонента ПФ на удерживание дипептидов. Установлено, что определяющее влияние на тип зависимости $k(\varphi)$ оказывает липофильность дипептида: липофобные т.е. гидрофильные, дипептиды характеризуются возрастающей зависимостью, липофильные (гидрофобные) – убывающей, а дипептиды с промежуточной липофильностью U-образной зависимостью [256]. Такой характер влияния природы дипептида на вид зависимости $k(\varphi)$ объясняется особенностями сольватации дипептидов в ПФ, и в случае U-образных зависимостей конкурентным влиянием эффектов увеличения элюирующей силы ПФ с ростом доли органического компонента и уменьшением ее десорбирующей активности с уменьшением доли воды. Также в работе показано, что в целом ХНФ с привитым ристоцетином А характеризуется более высокими факторами удерживания дипептидов и лучшим энантиоразделением по сравнению с ХНФ на основе эремомицина [256].

Таким образом, в литературе представлен обширный эмпирический материал о хроматографическом поведении и механизмах удерживания дипептидов на антибиотиковых ХНФ, однако сведений о динамике адсорбции дипептидов на указанной группе адсорбентов в доступной литературе не обнаружено.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1. Реактивы и материалы

2.1.1. Хроматографические колонки

В работе использовались следующие хроматографические колонки:

- Chirobiotic V, Chirobiotic T и Chirobiotic R компании Supelco (США), заполненные силикагелем с привитыми антибиотиками ристоцетином А, тейкопланином или ванкомицином соответственно (рис. 1.8-1.10).
- ZWIX(+A) и ZWIX(-A) – новые некоммерческие колонки, заполненные цвиттер-ионными ХНФ с привитыми к силикагелю хиральными селекторами на основе хининовых алкалоидов. Селекторы в фазах (+A) и (-A) отличаются природой алкалоидного основания (хинин в (+A), хинидин в (-A) и конфигурацией присоединенной к алкалоидному основанию аминокислоты ((R,R) в (+A), (S,S) в (-A)) (рис. 1.15).
- AK56, AK57, AK59 – новые некоммерческие колонки, заполненные цвиттер-ионными ХНФ с привитыми к силикагелю хиральными селекторами на основе аддуктов хинина или хинидина с дипептидами (табл. 2.1). Их структурные формулы представлены на рис. 2.1.

Таблица 2.1

Исследуемые ХНФ на основе аддуктов хининовых алкалоидов и дипептидов

Название колонки	Тип хирального селектора*
AK56	QN-L-Leu-L-Ala
AK57	QN-L-Ala-L-Leu
AK59	QD-L-Ala-L-Leu

*QN – хинин, QD – хинидин.

В таблице 2.2 указаны размеры исследуемых колонок и физико-химические свойства силикагеля, используемого для синтеза насадочных материалов по данным производителя.

Экспериментально измеренные характеристики пористости колонок представлены в таблице 2.3.

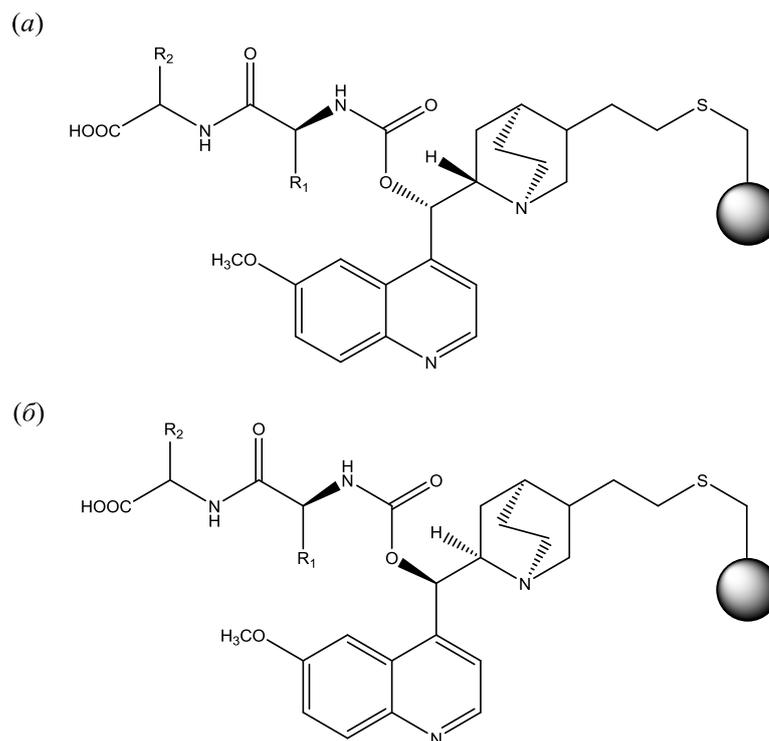


Рис. 2.1. Структуры хиральных селекторов на основе аддуктов хинина (а) или хинидина (б) и дипептидов. Для АК56 $R_1 = (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$, $R_2 = \text{CH}_3$, для АК57 $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$, для АК59 $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$

Таблица 2.2

Характеристики исследуемых колонок

Название колонки	Размер колонки, см	Размер частиц, мкм	Удельная площадь поверхности адсорбента, м ² /г	Размер пор, нм
Chirobiotic R	25 × 0.46	5.0	300	10
Chirobiotic T	25 × 0.46	5.0	300	12
Chirobiotic V	25 × 0.46	5.0	300	10
ZWIX(+A)	15 × 0.3	3.0	310	12.8
ZWIX(-A)	15 × 0.3	3.0	310	12.8
AK56	15 × 0.3	3.1	296	14
AK57	15 × 0.3	3.1	296	14
AK59	15 × 0.3	3.1	296	14

Характеристики пористости исследуемых колонок

Название колонки	Общая пористость доступная для анализируемых веществ ^a	Общая пористость доступная для молекул растворителя ^b	Внешняя пористость	Внутренняя пористость ^a
Chirobiotic R	0.61	0.75	0.40	0.35
Chirobiotic T	0.67	0.77		
Chirobiotic V	0.63	0.73	0.41	0.37
ZWIX(+A)	0.76	0.78		
ZWIX(-A)	0.77	0.78		
AK56	0.73	0.77		
AK57	0.73	0.76	0.37	0.57
AK59	0.75	0.77		

^a по 1,3,5-три-*трет*-бутил-бензолу (см. разд 2.3), ^b по дейтерированному метанолу (см. разд. 2.3).

2.1.2. Реактивы и растворители для приготовления подвижных фаз

Для приготовления подвижных фаз использовали метанол производства «J. T. Baker» (Польша) или «Carlo Erba» (Италия), ацетонитрил производства «J. T. Baker» (Польша), тетрагидрофуран (ТГФ) производства «Вектон» (Россия) или «Carlo Erba» (Италия) и деионизованную воду, подготовленную с помощью системы Millipore Synergy (Millipore, Франция). Растворители фирмы «Вектон» были квалификации «х.ч.», зарубежных производителей – квалификации «для ВЭЖХ». ТГФ от «Вектона» дополнительно очищали перегонкой. Ацетат аммония аналитической чистоты, используемый в качестве модификатора подвижной фазы, был от Acros Organics (Бельгия). Для приготовления ацетатных буферов использовали уксусную кислоту «для ВЭЖХ» и ацетат натрия (> 99%) производства AppliChem (Германия). Для измерения мертвого объема использовали дейтерированный метанол (99 %) от Acros Organics (Бельгия) и 1,3,5-три-*трет*-бутилбензол от Sigma-Aldrich (США). Стандарты высокомолекулярных полистиролов для измерения внешней пористости были произведены фирмой Phenomenex (США).

2.1.3. Дипептиды

В работе были использованы следующие дипептиды: L-Leu-L-Leu (Bachem, Швейцария), D-Leu-D-Leu (Bachem, Швейцария), L-Leu-D-Leu (abcr, Германия), D-Leu-L-Leu (Bachem,

Швейцария), L-Leu-L-Phe (Bachem, Швейцария), D-Leu-L-Phe (перміс, Китай), L-Leu-D-Phe (LeapChem, Китай), D-Leu-D-Phe (LeapChem, Китай), Gly-Gly (Bachem, Швейцария), L-Phe-Gly (перміс, Китай), D-Phe-Gly (перміс, Китай), L-Phe-L-Leu (LeapChem, Китай), D-Phe-D-Leu (LeapChem, Китай), Gly-L-Phe (Bachem, Швейцария), Gly-DL-Phe (TCI, Япония), Gly-D-Leu (TCI, Япония), Gly-L-Leu (MP Biomedicals, Франция), L-Leu-Gly (Sigma-Aldrich, США), D-Leu-Gly (Sigma-Aldrich, США), Ala-Ala (Sigma-Aldrich, США). Чистоту дипептидов контролировали хроматографически. Структуры дипептидов представлены на рис.2.2.

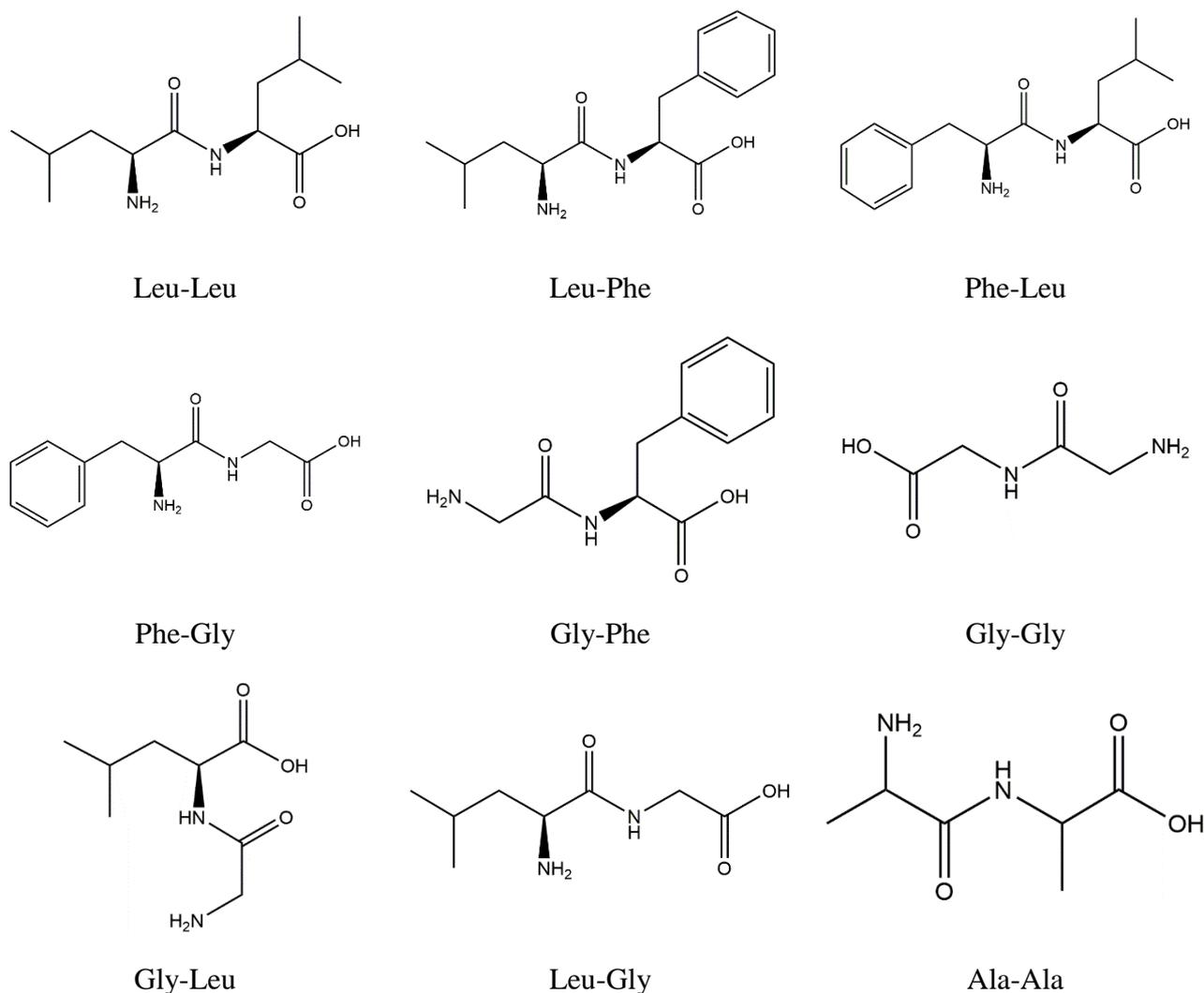


Рис. 2.2. Структура дипептидов

2.2. Оборудование

Эксперименты выполняли на жидкостном хроматографе LC20AD-XR (Shimadzu, Япония), оснащенном прецизионным насосом, рефрактометрическим детектором, диодно-матричным УФ-детектором, автоматическим дозатором и термостатом колонок ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) с использованием программного обеспечения LabSolution того же производителя. pH растворов

определяли рН-метром («Гомельский завод измерительных приборов», Беларусь), откалиброванным по водным стандартным растворам.

2.3. Определение мертвого объема колонки и характеристик пористости слоя неподвижной фазы

Мертвый объем (V_0) колонок измеряли двумя методами: изотопным [257] и по времени выхода неудерживаемого маркера. В первом методе V_0 определяли как удерживаемый объем дейтерированного метанола (объем пробы 2 мкл), элюированного чистым метанолом. Измерения выполняли с помощью рефрактометрического детектора. Во втором методе в качестве неудерживаемого маркера использовали 1,3,5-три-*трет*-бутил-бензол (ТтББ) с концентрацией 0.7 мг/мл, который также элюировали чистым метанолом. Хроматограммы записывали с помощью УФ-детектора. Объем пробы составлял 2 мкл. В значение мертвого объема вносили поправку на внеколоночный объем, измеренный в системе с удаленной колонкой.

Общую пористость (ε_T) определяли через величину V_0 и геометрический объем колонки (V_{col}) как

$$\varepsilon_T = V_0 / V_{col} \quad (2.1)$$

Поскольку использовались две оценки мертвого объема (доступный для ПФ – с дейтерированным метанолом, и доступный для молекул растворенного вещества – с ТтББ) то были получены две оценки общей пористости, приведенные в табл. 2.3.

Внешнюю пористость (ε_e) определяли методом обратной эксклюзионной хроматографии [258] с использованием ТГФ в качестве подвижной фазы и полистиролов с различной молекулярной массой от 309 Да до 1760 кДа в качестве молекул-зондов.

Внутреннюю пористость (ε_i) находили по формуле:

$$\varepsilon_i = (\varepsilon_T - \varepsilon_e) / (1 - \varepsilon_e) \quad (2.2)$$

2.4. Измерение изотерм адсорбции бинарных растворителей на хиральных неподвижных фазах

Изотермы избыточной адсорбции бинарных смесей MeOH–H₂O и MeCN–H₂O измеряли на двух антибиотиковых (Chirobiotic R и Chirobiotic T) и двух цвиттер-ионных (QN-L-Ala-L-Leu (AK57) и ZWIX(-A)) неподвижных фазах методом малых возмущений [259; 260]. Измерения проводили при температуре 25°C и скорости подвижной фазы 1 мл/мин. Чтобы вызвать возмущение в колонку вводили пробы (2 мкл) бинарного растворителя, незначительно отличающегося по составу от состава ПФ. В качестве ПФ использовали смеси, содержащие 0,

0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99, 99.5 и 100 об.% органического растворителя (метанол или ацетонитрил). При использовании в качестве подвижной фазы чистых растворителей, их осушали: ацетонитрил перегонкой над цеолитом 4А, а метанол перегонкой над метилатом магния [261].

Избыточную адсорбцию компонента i (Γ_i) определяли как его избыток в реальной системе, состоящей из твердой и жидкой фаз, по сравнению с его содержанием в гипотетической системе сравнения, в которой концентрация компонента i остается равной его объемной концентрации вплоть до границы раздела фаз [25]. Полагали, что объемы жидкой фазы в реальной системе и системе сравнения совпадают и равны мертвому объему хроматографической колонки (V_0). Такую величину избыточной адсорбции обозначают $\Gamma_i^{(v)}$. Величину избыточной адсорбции для случая, когда равны числа молей жидкой фазы в реальной системе и системе сравнения обозначают $\Gamma_i^{(n)}$. Для бинарного раствора $\Gamma_i^{(v)}$ и $\Gamma_i^{(n)}$ связаны соотношением [262]:

$$\Gamma_i^{(n)} = \Gamma_i^{(v)} - x_i^l(\Gamma_1^{(v)} + \Gamma_2^{(v)}) \quad (2.3)$$

где x_i^l обозначает мольную долю компонента i в жидкой фазе.

Величину избыточной адсорбции находили численным интегрированием зависимости удерживаемого объема возмущения (V_R) от состава ПФ:

$$\Gamma_i^{(v)}(c_i) = \frac{1}{A} \int_0^{c_i} (V_R(c_i) - V_T) dc_i \quad (2.4)$$

где A – площадь поверхности неподвижной фазы, а V_T – термодинамический мертвый объем колонки [260]. Его рассчитывали по уравнению (2.5), используя данные, полученные при измерении изотерм избыточной адсорбции:

$$V_T = \frac{1}{c_i^0} \int_0^{c_i^0} V_R(c_i) dc_i \quad (2.5)$$

где c_i^0 – молярная концентрация чистой жидкости i . В величину V_R вносили поправку на внеколоночный объем, измеряемый в системе без колонки.

Величину полной адсорбции (общее количество вещества i в адсорбционном слое) рассчитывали в рамках модели слоя конечной толщины [262] как

$$Q_i = \Gamma_i^{(v)} + c_i \tau \quad (2.6)$$

где τ – толщина адсорбционного слоя. Этот параметр понимали как расстояние от поверхности твердой фазы до некоторой гипотетической плоскости, ниже которой сосредоточен весь избыток адсорбированного компонента i , а выше – концентрация равна равновесной концентрации в объемной жидкости (c_i). Величину τ оценивали методом Шая-Надя [263].

Метод основан на допущении, что линейный участок избыточной изотермы адсорбции соответствует формированию насыщенного сорбционного слоя компонента i . На этом участке $dQ_i / dc_i = 0$ и $\tau = -(d\Gamma_i^{(v)} / dc_i)$.

Анализ межмолекулярных взаимодействий в адсорбционном слое проводили на основании коэффициентов активности (γ) компонентов раствора. Коэффициенты активности в адсорбционной и жидкой фазе удобно определять исходя из предположения, что $\gamma_i^a(\gamma_i^l) \rightarrow 1$, когда $x_i^a(x_i^l) \rightarrow 1$ (верхние индексы a и l относятся к адсорбционной и жидкой фазам соответственно).

Величину γ^a рассчитывали по алгоритму Ларионова и Майерса [264], который начинается с вычисления логарифма отношения γ_1^a / γ_2^a :

$$\ln \frac{\gamma_1^a}{\gamma_2^a} = \ln \frac{\gamma_1^l}{\gamma_2^l} - \ln \frac{x_1^a x_2^l}{x_2^a x_1^l} + \frac{a_1^*}{t} \frac{\sigma - \sigma_1^0}{RT} - \frac{a_2^*}{t} \frac{\sigma - \sigma_2^0}{RT} \quad (2.7)$$

где σ – поверхностное натяжение на границе раздела фаз жидкость/твердое тело. σ_i^0 – поверхностное натяжение чистой жидкости компонента i на границе с твердым телом. Мольные доли компонентов адсорбционного раствора находили как $x_i^a = Q_i / (Q_1 + Q_2)$. Для расчета третьего и четвертого слагаемых правой части использовались следующие уравнения:

$$\frac{\sigma - \sigma_1^0}{RT} = - \int_1^{x_1^l \gamma_1^l} \frac{\Gamma_1^{(n)}}{x_1^l \gamma_1^l x_2^l} d(x_1^l \gamma_1^l) \quad (2.8a)$$

$$\frac{\sigma - \sigma_2^0}{RT} = - \int_0^{x_1^l \gamma_1^l} \frac{\Gamma_1^{(n)}}{x_1^l \gamma_1^l x_2^l} d(x_1^l \gamma_1^l) \quad (2.8b)$$

Коэффициенты активности в жидкой фазе рассчитывали методом UNIQUAC [265].

Значения избыточной адсорбции $\Gamma_i^{(n)}$ находили из уравнения (2.3) предварительно экспериментально измерив избыточную адсорбцию $\Gamma_i^{(v)}$ для данного значения x_i^l . Отношение γ_1^a / γ_2^a получали из уравнения (2.7). Коэффициенты активности для адсорбционного слоя рассчитывали следующим образом:

$$\ln \gamma_1^a = x_2^a \ln \frac{\gamma_1^a}{\gamma_2^a} + \int_0^{x_1^a} \ln \frac{\gamma_1^a}{\gamma_2^a} dx_1^a \quad (2.9a)$$

$$\ln \gamma_2^a = -x_1^a \ln \frac{\gamma_1^a}{\gamma_2^a} + \int_0^{x_1^a} \ln \frac{\gamma_1^a}{\gamma_2^a} dx_1^a \quad (2.9b)$$

Определенные интегралы в уравнениях (2.8) и (2.9) находили методом трапеций.

2.5. Измерение хроматографического удерживания дипептидов

Закономерности удерживания дипептидов в зависимости от состава ПФ и pH исследовались на ХНФ ZWIX(+A), ZWIX(-A), АК56, АК57, АК59. Экспериментальные данные получали при температуре 25°C, объем проб составлял 2 мкл, скорость ПФ 0.4 или 0.5 мл/мин. Хроматограммы записывали на длине волны 220 нм. Концентрация проб выбиралась таким образом, чтобы обеспечить выполнение измерений в линейной области изотермы адсорбции, и составляла 0.1 – 0.25 мг/мл. Условия линейной адсорбции подтверждались неизменностью времени удерживания при увеличении/уменьшении концентрации образца в 2 раза. Каждое измерение повторяли три раза.

В качестве подвижных фаз использовались:

- Смеси MeOH–H₂O, MeCN–H₂O, MeCN–MeOH (0 – 100 об.% органического компонента);
- Смеси MeOH–H₂O, MeCN–H₂O (0 – 100 об.% органического компонента), модифицированные ацетатом аммония с концентрацией 0.0002 – 0.05 моль/л;
- Водно–метанольные ацетатные буферные смеси, pH которых регулировалась соотношением концентраций ацетата натрия и уксусной кислоты. Сумма их концентраций составляла 0.1 моль/л.

Удерживание веществ характеризовали величиной фактора удерживания (k) [266]:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.10)$$

где t_R – время удерживания анализируемого вещества, t_0 – мертвое время, оцениваемое по времени выхода неудерживаемого маркера ТтББ, элюируемого чистым метанолом [267]. В значения времени удерживания вводилась поправка на внеколоночный объем, измеренный в системе без колонки.

Значения коэффициентов разделения (α) находили по уравнению (1.4).

2.6. Изучение динамики адсорбции

2.6.1. Измерение коэффициентов диффузии дипептидов в подвижных фазах

Коэффициенты молекулярной диффузии (D_m) дипептидов Leu-Leu, Gly-Gly, Leu-Gly, Gly-Leu и Leu-Phe определяли методом Тейлора–Эйриса [268] в смесях MeOH–H₂O, модифицированных ацетатом аммония ($2 \cdot 10^{-4}$ М) с содержанием метанола 10, 40, 80 и 100 об.%. В этом методе образец вводится в длинную капиллярную трубку длиной L , внутренним радиусом R_{tube} и записывается пик выходящего из колонки вещества. В работе использовался капилляр из полиэфирэфиркетона (IDEX Health & Science, США) длиной

1565 см и внутренним радиусом $R_{tube} = 0.02525$ см. Определив первый (μ_1) и второй центральный (μ'_2) моменты пика, можно рассчитать коэффициент диффузии по формуле [268; 269]:

$$D_m = \frac{1}{24} \frac{\mu_1}{\mu'_2} R_{tube} \quad (2.11)$$

Моменты пика находили следующим образом:

$$\mu_1 = \frac{\int R(t)tdt}{\int R(t)dt} \quad (2.12a)$$

$$\mu'_2 = \frac{\int R(t)(t - \mu_1)^2 dt}{\int R(t)dt} \quad (2.12b)$$

где R – отклик детектора, пропорциональный концентрации растворенного вещества на выходе из колонки, t – время.

Интегралы в выражениях (2.12a,b) определяли численным интегрированием методом трапеций. Значения μ_1 и μ'_2 корректировали на вклады от внеколоночного объема, определенные в системе без капилляра. Эксперименты выполняли при температуре 25°C со скоростью потока подвижной фазы 0.1 мл/мин. Объем проб составлял 4 мкл, а концентрация дипептидов 1 мг/мл. Каждое измерение повторяли трижды.

Гидродинамический радиус молекул (r_h) рассчитывали по уравнению Стокса-Эйнштейна, используя экспериментальные значения коэффициентов диффузии:

$$r_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta_B D_m} \quad (2.13)$$

где k_B – постоянная Больцмана, T – температура, η_B – вязкость растворителя. Также для сравнения с экспериментальными значениями радиус молекул был рассчитан с использованием программного обеспечения Chem3D 15.1 (Perkin Elmer, США) после оптимизации геометрии молекулы методом молекулярной механики с использованием силового поля MM2.

2.6.2. Измерение кривых ван Деемтера и определение параметров массопереноса

Кривые ван Деемтера, т.е. зависимости ВЭТТ от скорости ПФ, определяли в диапазоне объемных скоростей потока (F_v) от 0.05 до 2 мл/мин на колонках Chirobiotic R и Chirobiotic V и от 0.05 до 1 мл/мин на колонке АК57. Перечень исследованных веществ, их концентрации и составы ПФ приведены в табл. 2.4.

Экспериментальные условия изучения динамики адсорбции дипептидов

ХНФ	Дипептид	Концентрация дипептида, мг/мл	ПФ
Chirobiotic R	L-Leu-L-Leu D-Leu-L-Leu L-Leu-D-Leu D-Leu-D-Leu Gly-Gly	0.25 мг/мл	MeOH-H ₂ O (10:90, об/об), CH ₃ COONH ₄ (0.0002 моль/л)
	Gly-L-Leu Gly-D-Leu L-Leu-Gly	0.5 мг/мл	MeOH-H ₂ O (80:20, об/об), CH ₃ COONH ₄ (0.0002 моль/л)
Chirobiotic V	L-Leu-L-Leu D-Leu-D-Leu Gly-Gly	0.25 мг/мл	MeOH-H ₂ O (10:90, об/об), CH ₃ COONH ₄ (0.0002 моль/л)
AK57	L-Leu-L-Leu D-Leu-D-Leu L-Leu-L-Phe D-Leu-D-Phe Gly-Gly	0.125 мг/мл	MeOH-H ₂ O (40:60, об/об), CH ₃ COONH ₄ (0.0002 моль/л)

Температура колонок во всех экспериментах составляла 25°C. Концентрация растворенного вещества выбиралась таким образом, чтобы обеспечить высокое отношение сигнал/шум, с одной стороны, и хроматографическое поведение, характерное для бесконечно разбавленных растворов, с другой стороны. Вводимый объем пробы составлял 2 мкл. Каждое измерение повторяли трижды. Записанные хроматограммы корректировали на дрейф нулевой линии с помощью программного обеспечения OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, США). Для каждого пика находили значения первого и второго центрального моментов численным интегрированием по уравнениям (2.12а) и (2.12б) и по уравнению (1.38) рассчитывали величину N и далее по уравнению (1.39) – величину H . Значения моментов пиков корректировали на соответствующие внеколоночные вклады, которые оценивались в системе без колонки.

Известно, что выбор положения границ пика существенно влияет на значение второго момента и, следовательно, на величину ВЭТТ [270; 271]. Чтобы избежать этого осложнения, в расчетах с колонками Chirobiotic R и Chirobiotic V интегрирование выполняли между точками, соответствующим 1% высоты пика [131; 132]. Такой уровень отсечки выше, чем амплитуда шума сигнала, но при этом обеспечивает включение $> 98\%$ площади пика в пределы интегрирования. В расчетах с колонкой АК57 левую (t_1) и правую (t_N) границы пика определяли в соответствии с уравнениями [127]:

$$t_1 = t_R - 1.5(t_R - t_{left}) \quad (2.14)$$

$$t_N = t_R + 2.3(t_R - t_{right}) \quad (2.15)$$

где t_{left} / t_{right} – время элюирования, при котором концентрация образца увеличивалась/уменьшалась до 10% от максимальной высоты пика соответственно. Справедливость метода была продемонстрирована в работе [271].

Дополнительно величину H рассчитывали через число теоретических тарелок $N_{0.5}$, определяемое по известному уравнению, основанному на предположении о гауссовой форме хроматографического пика:

$$N_{0.5} = 5.545 \left(\frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2 \quad (2.16)$$

где t_R – время выхода пика, скорректированное на вклад внеколоночного объема, а $W_{0.5}$ – ширина пика, взятая на половине высоты.

Истинную скорость ПФ определяли как $u = F_v / (S \varepsilon_e)$, где S – площадь поперечного сечения колонки. Поскольку графики строили в приведенных координатах, то величины H и u пересчитывали в их приведенные аналоги h и v по уравнениям (1.44) и (1.45).

Для определения характеристик массопереноса экспериментальные зависимости $h(v)$ аппроксимировали уравнением ван Деемтера-Гиддингса (1.48). В качестве подгоночных параметров выступали коэффициенты B , λ_3 , ω_3 и сумма $(C_s + C_{ads})$. Для коэффициентов λ_1 , λ_2 и ω_1 , ω_2 , описывающих трансканальный и межканальный вклады в вихревую диффузию, использовали значения, установленные Хиревичем и др. [93]: $\lambda_1 = 0.48$, $\omega_1 = 0.0045$ и $\lambda_2 = 0.23$, $\omega_2 = 0.12$. Величину D_{eff} рассчитывали на основании экспериментального значения B по уравнению (1.54). Константу скорости адсорбции оценивали в виде диапазона $(k_{ads})_{min} - (k_{ads})_{max}$ при помощи уравнения (1.51) исходя из следующих соображений. Для определения параметра C_{ads} из экспериментальной суммы $(C_s + C_{ads})$ должна быть вычтена величина C_s . Хотя ее точное значение не может быть установлено на основании полученных данных, но может быть выполнена оценка ее наибольшего и наименьшего значений по уравнениям (1.50) и (1.55) для

двух граничных случаев с $D_{sur} = 0$ и $D_{sur} = D_m$. Эти граничные оценки дают две граничные оценки C_{ads} , и, соответственно, k_{ads} .

Константу адсорбционного равновесия K находили из уравнения, связывающего ее с первым моментом пика и общей пористостью колонки:

$$\mu_1 = \frac{L}{u\varepsilon_e} (\varepsilon_T + (1 - \varepsilon_T)K) \quad (2.17)$$

2.6.3. Математическое моделирование процесса элюирования

Для изучения влияния нелинейной кинетики адсорбции на размывание хроматографических пиков использовался метод численного моделирования процесса элюирования в рамках так называемой общей модели жидкостной хроматографии (general rate model) (см. раздел 1.3.1). Данная модель предполагает простую кинетику адсорбции первого порядка. Дополнительно были рассмотрены две динамические модели хроматографии, предполагающие более сложные схемы кинетики адсорбции: двухцентровую и двухстадийную.

Двухцентровая модель адсорбции

Эта модель предполагает сосуществование на поверхности неподвижной фазы адсорбционных центров двух типов, I и II, различающихся скоростью адсорбции и константами равновесия [272]. Скорость адсорбции на каждом типе центров определяется выражениями:

$$\frac{\partial q_I}{\partial t} = k_{ads,I} (c_p - q_I / K_I) \quad (2.18)$$

$$\frac{\partial q_{II}}{\partial t} = k_{ads,II} (c_p - q_{II} / K_{II}) \quad (2.19)$$

где $k_{ads,I}$ и $k_{ads,II}$ – константы скорости адсорбции для центров типа I и II соответственно; K_I и K_{II} – соответствующие константы адсорбционного равновесия.

Общая скорость адсорбции находится как сумма уравнений (2.18) и (2.19):

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{\partial q_I}{\partial t} + \frac{\partial q_{II}}{\partial t} \quad (2.20)$$

Двухстадийная модель адсорбции

Вильямсон с соавт. [254], исследуя кинетику связывания дипептидов с молекулой ристоцетина А в жидкой фазе, пришли к выводу, что процесс протекает через промежуточное состояние. Сначала молекула субстрата (А) и молекула ристоцетина А (L) взаимодействуют с образованием первичного слабого комплекса субстрат-антибиотик (AL*). Затем следует конформационное изменение, в результате которого улучшается стерическое соответствие

между связывающим центром молекулы антибиотика и молекулы субстрата и образуется прочный комплекс включения (AL). Этот механизм можно представить следующей схемой:



где $k_1(k_{-1})$ и $k_2(k_{-2})$ – константы скорости первой и второй стадии в прямом (обратном) направлении соответственно.

Полное адсорбированное количество вещества А определяется как сумма обеих форм: $q = (AL^*) + (AL)$, где круглые скобки означают текущую (не равновесную) концентрацию. Следовательно, текущая концентрация свободных центров адсорбции определяется выражением

$$(L) = q^* - q = q^* - (AL^*) - (AL) \quad (2.22)$$

где q^* – концентрация адсорбционных центров неподвижной фазы.

Опуская некоторые элементарные математические преобразования, можно прийти к следующей системе кинетических уравнений, описывающих двухстадийную модель кинетики адсорбции:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 c_p (q^* - q) - k_{-1} (AL^*) \quad (2.23)$$

$$\frac{d(AL^*)}{dt} = k_1 c_p (q^* - q) + k_{-2} (AL) - k_{-1} (AL^*) - k_2 (AL^*) \quad (2.24)$$

$$\frac{d(AL)}{dt} = k_2 (AL^*) - k_{-2} (AL) \quad (2.25)$$

Коэффициент аксиальной дисперсии

Для моделирования элюционной кривой с помощью общей динамической модели необходимо задать коэффициент аксиальной дисперсии. Для этой цели часто используются два подхода. Исторически первым и до сих пор наиболее популярным является представление D_{ax} как линейной функции от u [89; 273]:

$$D_{ax} = \kappa_1 D_m + \kappa_2 d_p u \quad (2.26)$$

где κ_1 и κ_2 – геометрические параметры, обычно принимаемые равными $\kappa_1 = 0.7$ и $\kappa_2 = 0.5$ [273; 274].

Другой подход заключается в использовании корреляции Ганна [275]:

$$\frac{D_{ax}}{d_p u} = G_1 + G_2 + \frac{\varepsilon_e}{1.4 ReSc} \quad (2.27)$$

$$G_1 = \frac{ReSc}{4j_1^2(1-\varepsilon_e)}(1-p)^2$$

$$G_2 = \left(\frac{ReSc}{4j_1^2(1-\varepsilon_e)} \right)^2 p(1-p)^3 \times \left[\exp\left(-\frac{4(1-\varepsilon_e)j_1^2}{p(1-p)ReSc} \right) - 1 \right]$$

где $Re = u\varepsilon_e d_p \rho / \eta$ – число Рейнольдса, $Sc = \eta / (\rho D_m)$ – число Шмидта (ρ – плотность, η – вязкость подвижной фазы), $j_1 = 2.405$ – это первый корень функции Бесселя нулевого порядка, $p = 0.17 + 0.33 \exp(-24/Re)$.

Оценка D_{ax} по уравнениям (2.26) и (2.27) приводит к несколько различающимся значениям одного порядка величины. Однако определение подгоночных параметров модели с использованием этих двух выражений для вычисления D_{ax} дает близкие результаты, отличающиеся не более чем на 6%. Поэтому в работе будут приведены только результаты, полученные с помощью корреляции Ганна.

ГЛАВА 3. АДСОРБЦИЯ БИНАРНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА ХИРАЛЬНЫХ НЕПОДВИЖНЫХ ФАЗАХ С ПРИВИТЫМИ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИМИ АНТИБИОТИКАМИ

В жидкостной хроматографии на механизмы удерживания и разделения веществ сильное влияние оказывает строение границы раздела фаз [25; 276; 277]. Известно, что состав адсорбированного слоя отличается от состава в объеме жидкой фазы [25; 259; 278; 279]. Состав адсорбированного слоя определяют путем измерения изотерм избыточной адсорбции [277; 280]. Этот метод применялся для изучения адсорбции водно-органических растворителей на ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками в работах [281; 282; 283]. Представляло интерес рассмотреть адсорбцию смесей MeOH–H₂O и MeCN–H₂O, типичных обращенно-фазных растворителей, на исследуемых ХНФ. К анализу результатов также привлечены полученные ранее данные по адсорбции водно-органических смесей на ХНФ Nautilus E с привитым антибиотиком эремомицином [281]. Стоит отметить, что адсорбция бинарных смесей на ХНФ с тейкопланином (Chirobiotic T) уже была изучена в работе [282], однако приведенные там величины адсорбции имели значения на два порядка ниже, чем обычно наблюдается на полярных адсорбентах, поэтому было решено повторить эти измерения.

Мертвый объем (V_0). На исследуемых колонках V_0 находили тремя разными методами (табл. 3.1.).

Таблица 3.1

Мертвый объем (мл) хроматографических колонок, измеренный разными методами

ХНФ	Изотопный метод	Метод малых возмущений		Удерживание ТтББ
		MeOH–H ₂ O	MeCN–H ₂ O	
Nautilus-E [281]	2.956	2.880	3.045	2.510
Chirobiotic R	3.098	3.077	3.081	2.552
Chirobiotic T	3.209	3.228	3.209	2.783

Расхождения в значениях V_0 , полученных изотопным методом и методом малых возмущений, лежат в пределах 5%, что может объясняться погрешностью эксперимента. Расхождение между значениями, полученными изотопным методом и по удерживанию ТтББ, составляет не менее 12%. Эта относительно большая величина указывает на то, что в колонках присутствует объем, недоступный для молекул ТтББ, но доступный для молекул растворителя. Ранее предполагалось, что этот объем сосредоточен в пространстве между привитыми частицами хирального селектора. Действительно, в работе [281] на примере Nautilus-E было

показано, что среднее расстояние между молекулами соседних селекторов сопоставимо с размером молекулы ТтББ. Другой возможной причиной может быть блокирование пор адсорбента привитыми молекулами хирального селектора. Если в поре размером 10-12 нм (см. табл. 2.1) привитые селекторы (высота с учетом якорной группы 4-5 нм) будут находиться на противоположных стенках поры друг напротив друга, то в пространство между ними молекулы размером порядка диаметра ТтББ пройти не смогут.

3.1. Изотермы избыточной адсорбции воды

Изотермы избыточной адсорбции воды из бинарных растворителей на хиральных адсорбентах показаны на рис. 3.1 в координатах $\Gamma_1^{(n)} - x_1^I$ (индекс «1» обозначает воду, индекс «2» – метанол или ацетонитрил). Все полученные изотермы принадлежат 5 типу по классификации Шая [263], 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 ПФ 0.6–0.75 для смеси MeOH–H₂O и 0.65–0.9 для MeCN–H₂O. Гидрофильность ХНФ увеличивается в ряду: AK57 < ZWIX(-A) < Chirobiotic T < Chirobiotic R < Nautilus-E.

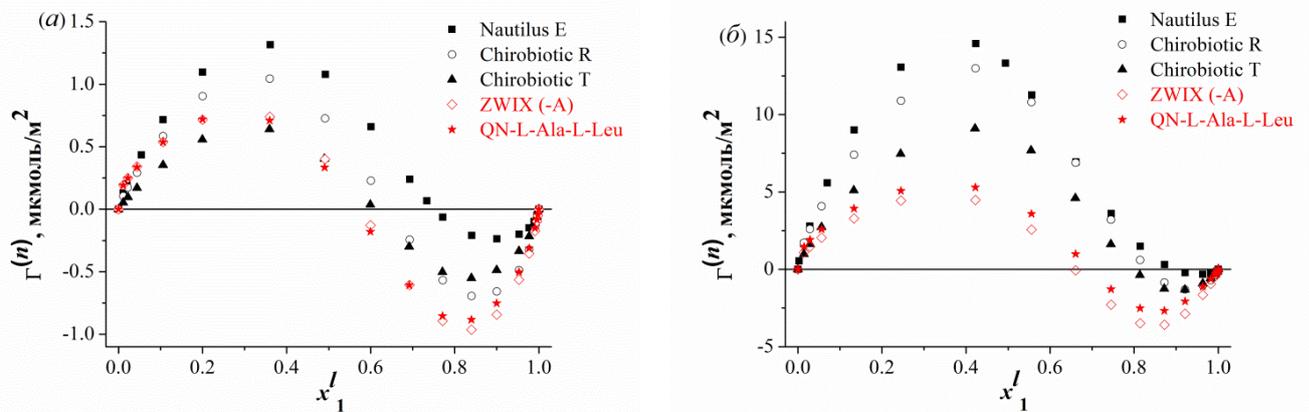


Рис. 3.1 . Изотермы избыточной адсорбции воды из смесей метанол–вода (а) и ацетонитрил–вода (б) на исследуемых ХНФ

Максимум избыточной адсорбции воды из водно-ацетонитрильных смесей на порядок выше, чем из водно-метанольных. Это можно объяснить двумя обстоятельствами. Во-первых, наличие протонодонорной 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. Смесей 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 компонентов [284; 285]. Соответственно, 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 существенному 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. Из таблицы 3.2 видно, что толщина адсорбционного слоя MeCN–H₂O превышает τ для смеси MeOH–H₂O в несколько раз, так как эффект упорядочения для системы ацетонитрил–вода действует, постепенно ослабевая на несколько молекулярных слоев. Такой же эффект наблюдался в работе [286] на полярной ХНФ Whelk-O1.

Таблица 3.2

Толщина адсорбционного слоя τ (нм)

ХНФ	MeOH–H ₂ O	MeCN–H ₂ O
Nautilus-E [281]	0.11	0.94
Chirobiotic R	0.12	1.05
Chirobiotic T	0.10	0.88
ZWIX(–A)	0.14	0.81
AK57	0.13	0.79

Размер компонентов смеси MeOH–H₂O составляет 0.3–0.4 нм, однако из таблицы 3.2 следует, что τ меньше этих значений. Это может быть связано с нарушением допущений, принятых для определения толщины адсорбционного слоя, главным из которых является условие равномерности состава и толщины адсорбционной фазы на поверхности адсорбента. В действительности растворитель заполняет пространство между привитыми молекулами селекторов, то есть толщина адсорбционного слоя над привитыми молекулами и между ними может отличаться. Также на поверхности ХНФ происходит перераспределение компонентов растворителя: молекулы органического компонента предпочтительно сольватируют гидрофобные, а молекулы воды – гидрофильные участки поверхности ХНФ. То есть состав адсорбционного слоя будет отличаться на разных участках 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.

На рис. 3.2 приведены зависимости удерживаемого объема малого возмущения от мольной доли воды в подвижной фазе. Видно, что для смесей MeCN–H₂O удерживаемый объем возмущения резко увеличивается при уменьшении концентрации воды (0.5 об.%, $x_1^I < 0.014$). Рост V_R от x_1^I вблизи чистого органического растворителя наблюдается и для смесей MeOH–H₂O, однако он значительно меньше, чем для водно-ацетонитрильной системы. Логично предположить, что на поверхности исследуемых ХНФ присутствует небольшая фракция сильных брэнстедовских центров, которая дезактивируется присутствием небольшого количества воды в подвижной фазе. Такими центрами могут выступать остаточные силанольные группы. Данный эффект сильнее выражен для системы MeCN–H₂O, потому что в системах MeOH–H₂O метанол сам частично может дезактивировать эти центры.

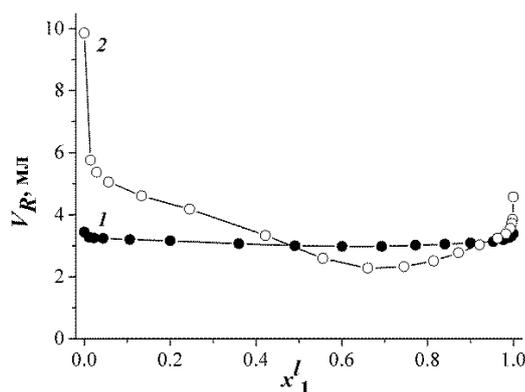


Рис. 3.2. Зависимости удерживаемого объема малого возмущения от мольной доли воды в подвижной фазе для смесей метанол–вода (1) и ацетонитрил–вода (2) на ХНФ Chirobiotic R

3.2. Коэффициенты активности в адсорбционной фазе

На рис. 3.3 и 3.4 представлены зависимости коэффициентов активности компонентов исследуемых смесей от мольной доли воды в объемной фазе и в адсорбционной фазе соответственно.

Для обеих систем бинарных жидкостей наблюдаются отклонения от свойств идеального раствора, но для системы ацетонитрил–вода они выражены сильнее. Это может быть связано с тем, что ацетонитрил не включается в структуры ближнего порядка, образованные водородными связями (как метанол), а агрегируется в кластеры [285].

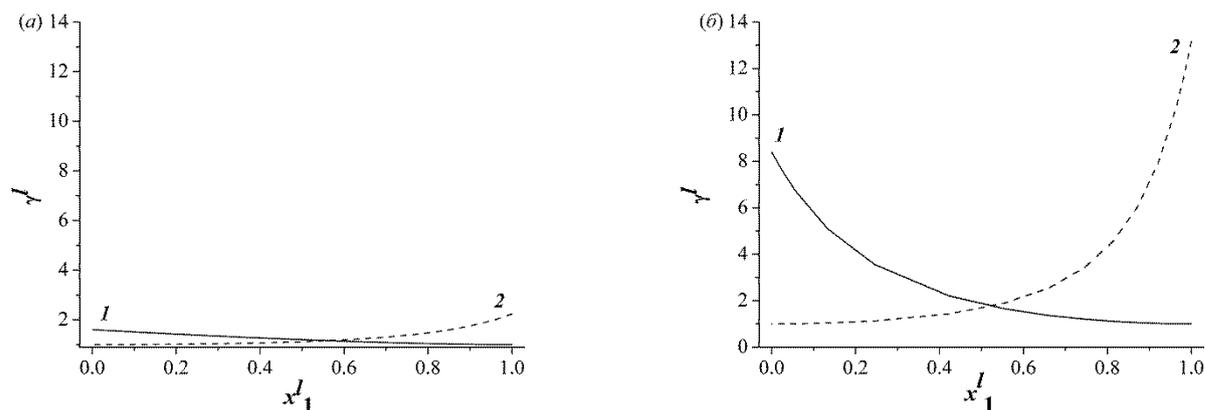


Рис. 3.3. Зависимости коэффициентов активности компонентов раствора (а) вода (1) – метанол (2) и (б) вода (1) – ацетонитрил (2) от мольной доли воды

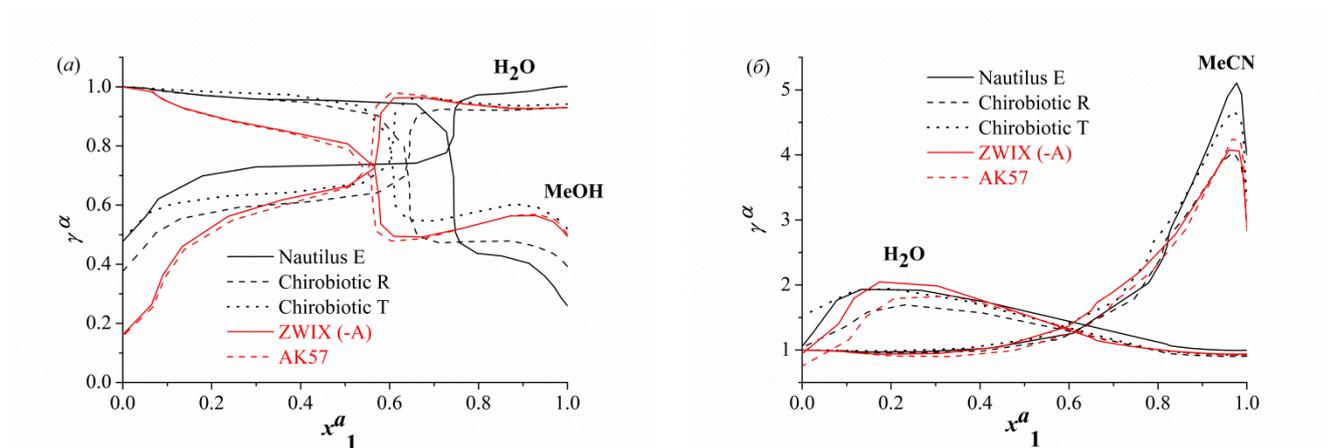


Рис. 3.4. Зависимости коэффициентов активности компонентов адсорбционных растворов метанол–вода (а) и ацетонитрил–вода (б)

На рис. 3.4а видно, что поведение компонентов смеси метанол–вода близко к идеальному ($\gamma^a \approx 1$) в диапазоне от данного чистого растворителя (воды или метанола, для которых $x_1^a = 1$ и $x_1^a = 0$ соответственно) до состава адсорбционного азеотропа. В азеотропной точке зависимости характеризуются резким S-образным уменьшением коэффициентов активности до значений $\gamma_1^a = 0.60\text{--}0.73$ и $\gamma_2^a = 0.43\text{--}0.56$. В некотором диапазоне составов ПФ они остаются относительно постоянными, но продолжают уменьшаться: для воды при $x_1^a < 0.3$, для метанола при $x_1^a > 0.8$. В работе [287] для изотерм избыточной адсорбции наблюдались похожие зависимости γ^a от x^a . Значения $\gamma^a < 1$ говорят о дополнительной стабилизации компонентов смеси в адсорбционной фазе относительно состояния идеального адсорбционного слоя.

Значения коэффициентов активности γ^a для смесей MeCN–H₂O (рис. 3.4б) характеризуются значениями $\gamma^a > 1$, то есть отклонения от идеальности ведут к ослаблению адсорбции относительно состояния идеального адсорбционного слоя. В ацетонитрилсодержащих ПФ на графиках $\gamma^a(x^a)$ нет ярко выраженной особенности в области адсорбционного азеотропа как в метанолсодержащих смесях. Вид графиков в диапазоне $x_1^a \in [0.2; 0.98]$ качественно (но не количественно) напоминает аналогичные кривые для жидкой фазы, где коэффициенты активности H₂O и MeCN монотонно увеличиваются с уменьшением их концентрации (рис. 3.3б). Это может быть связано с толщиной адсорбционного слоя. Для смеси ацетонитрил–вода τ имеет достаточно высокое значение, поэтому свойства адсорбционного слоя в некоторой степени близки свойствам объемной жидкости. Другая картина наблюдается за пределами указанного диапазона (вблизи чистых растворителей): энтропийный фактор, поддерживающий такую толщину адсорбционной фазы для смесей H₂O–MeCN, исчезает, толщина слоя уменьшается, и зависимость γ^a от x^a искажается. Для смесей MeOH–H₂O подобное поведение не наблюдается, так как формируется мономолекулярный слой.

Вид полученных зависимостей может объясняться неидеальным поведением в исследуемых системах, которое объясняется различными нарушениями модели идеального адсорбционного слоя, как со стороны адсорбционной фазы, так и со стороны поверхности адсорбента (энергетическая неоднородность поверхности). Анализ, проведенный в работе [281], показал, что за такую форму графиков (рис. 3.4) отвечает скорее взаимодействие адсорбат–адсорбат, чем адсорбат–адсорбент. Наблюдаемые закономерности можно объяснить структурированием адсорбционного слоя на поверхности ХНФ. Для системы метанол–вода за счет структурирования коэффициенты активности становятся меньше 1 в адсорбированном слое, в то время как в объемной жидкости значения γ больше 1. Для системы ацетонитрил–вода при переходе от объемной жидкости к поверхностному слою γ также существенно уменьшаются.

Таким образом, показано, что исследуемые амфолитные ХНФ с привитыми селекторами на основе макроциклических антибиотиков и производных хининовых алкалоидов в целом можно отнести к гидрофильным материалам. На поверхности адсорбентов формируется мономолекулярный слой при контакте со смесями MeOH–H₂O и полимолекулярный слой со смесями MeCN–H₂O. На всех ХНФ полученные закономерности качественно совпадают, но незначительно отличаются в количественных показателях.

ГЛАВА 4. ХИРАЛЬНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ДИПЕПТИДОВ НА ХИРАЛЬНЫХ НЕПОДВИЖНЫХ ФАЗАХ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНИНОВЫХ АЛКАЛОИДОВ

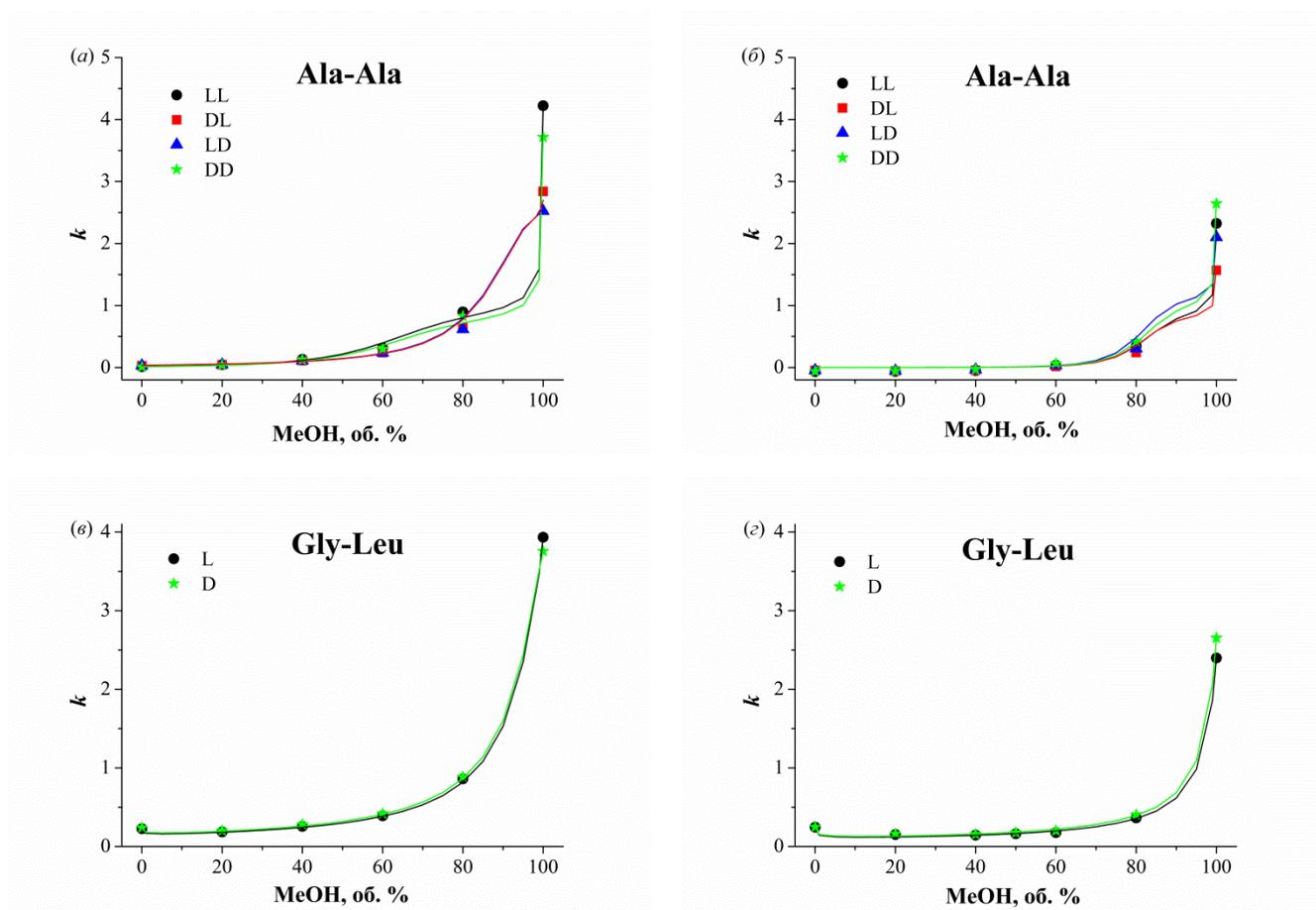
4.1. Удерживание и разделение дипептидов на хиральных неподвижных фазах ZWIX(+A) и ZWIX(-A)

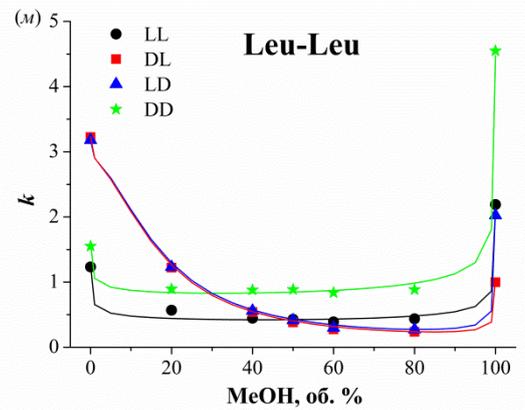
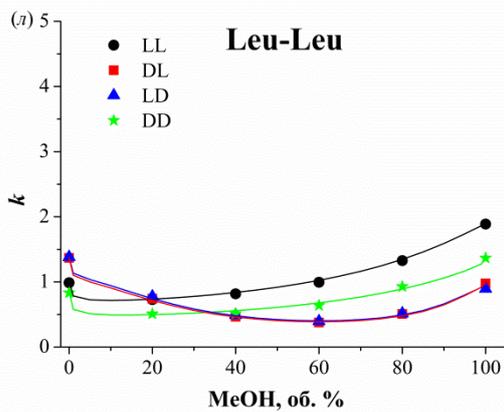
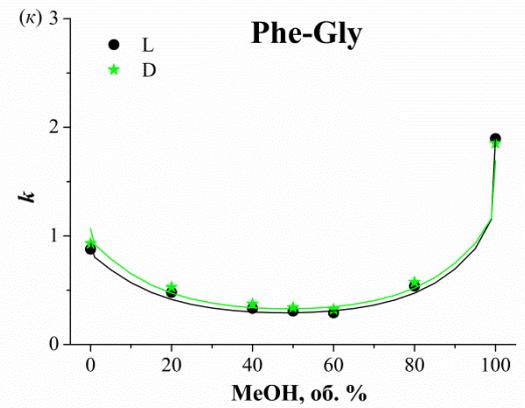
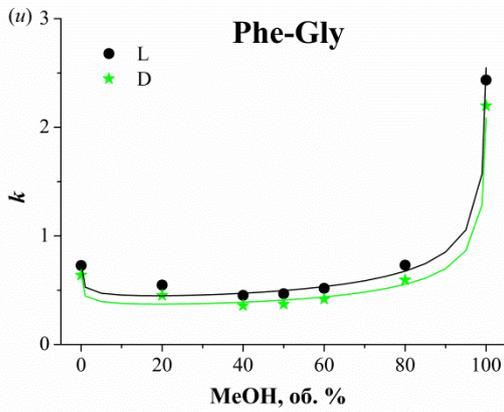
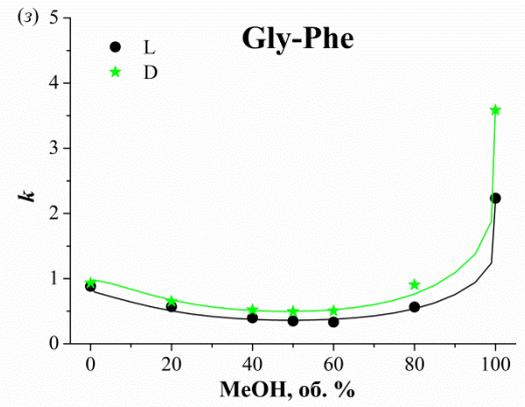
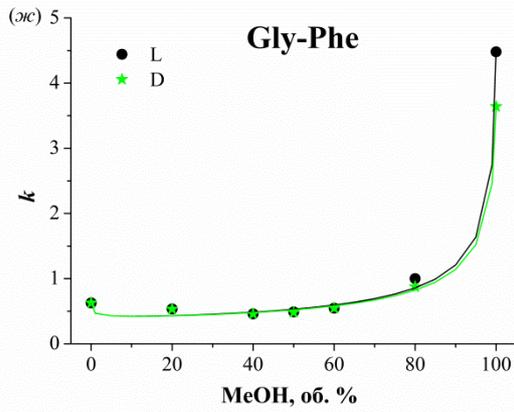
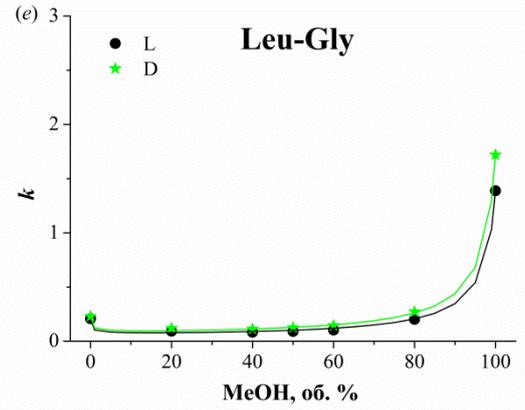
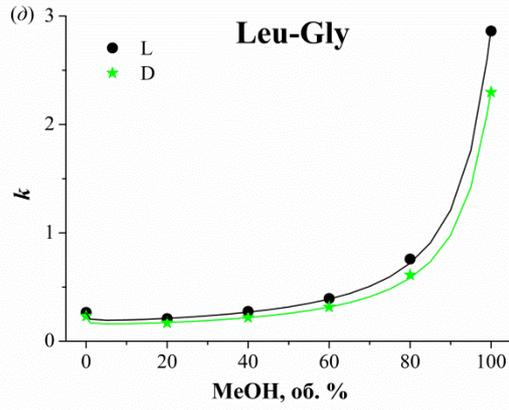
4.1.1. Влияние состава подвижной фазы

Влияние состава ПФ на энантиоселективное удерживание дипептидов на ХНФ ZWIX(+A) и ZWIX(-A) изучалось на примере смесей MeOH-H₂O и MeCN-MeOH, без добавления и с добавлением ацетата аммония (0.05 моль/л) или ацетатных буферных смесей.

4.1.1.1. Метанол-вода

Влияние доли метанола (φ) на удерживание стереоизомеров дипептидов представлено на рис. 4.1, а на разделение энантиомерных пар – в таблицах 4.1 и 4.2.





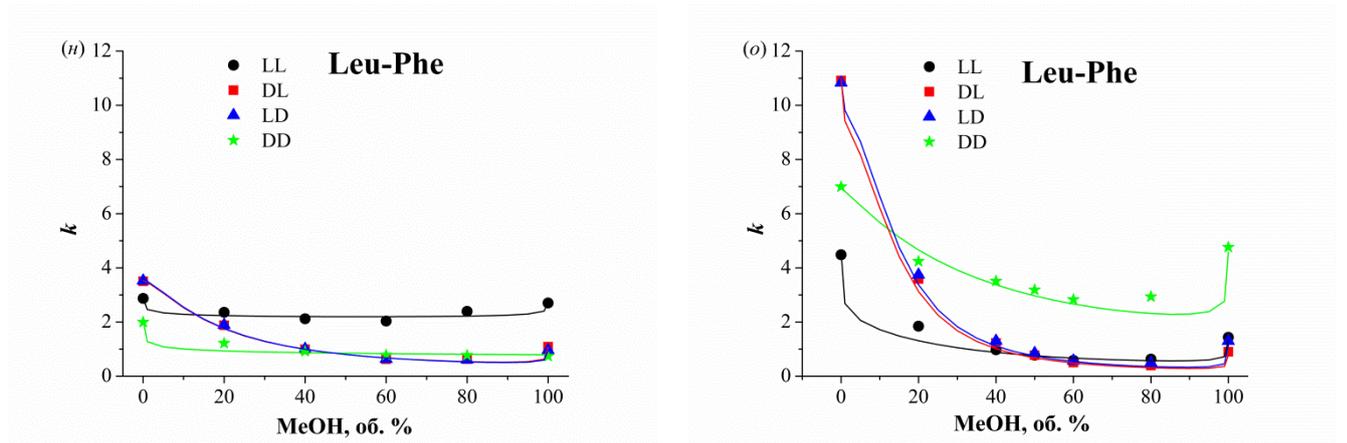


Рис. 4.1. Влияние процентной доли метанола в ПФ на фактор удерживания дипептидов на ХНФ ZWIX(+A) (а, в, д, ж, и, л, н) и ZWIX(-A) (б, г, е, з, к, м, о). Точки – экспериментальные данные, линии – результат аппроксимации уравнением (1.16)

Таблица 4.1

Влияние доли метанола в ПФ на коэффициент разделения дипептидов на ХНФ ZWIX(+A)

Дипептид	MeOH, об. %					
	0	20	40	60	80	100
Ala-Ala						
α (LL/DD)	1.21	1.15	1.06	1.07	1.08	1.14
α (LD/DL)	1.05	1.03	1.02	1.00	0.96	0.89
Gly-Leu						
α (L/D)	0.94	0.91	0.91	0.94	0.97	1.05
Leu-Gly						
α (L/D)	1.15	1.24	1.26	1.25	1.24	1.25
Phe-Gly						
α (L/D)	1.14	1.21	1.26	1.24	1.23	1.11
Gly-Phe						
α (L/D)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.14	1.23
Leu-Leu						
α (LL/DD)	1.19	1.43	1.60	1.56	1.43	1.38
α (LD/DL)	1.01	1.04	1.06	1.05	1.02	0.91
Leu-Phe						
α (LL/DD)	1.44	1.94	2.31	2.61	3.11	3.66
α (LD/DL)	1.01	1.01	1.01	1.01	0.97	0.89

Влияние доли метанола в ПФ на коэффициент разделения дипептидов на ХНФ ZWIX(-A)

Дипептид	MeOH, % (об/об)					
	0	20	40	60	80	100
Ala-Ala						
α (LL/DD)	1.07	1.13	1.58	0.57	0.82	0.88
α (LD/DL)	0.96	0.95	0.80	2.01	1.27	1.34
Gly-Leu						
α (L/D)	0.99	0.94	0.92	0.88	0.90	0.90
Leu-Gly						
α (L/D)	0.90	0.77	0.75	0.71	0.74	0.81
Phe-Gly						
α (L/D)	0.94	0.91	0.89	0.90	0.94	1.02
Gly-Phe						
α (L/D)	0.95	0.87	0.76	0.66	0.62	0.62
Leu-Leu						
α (LL/DD)	0.79	0.64	0.51	0.46	0.49	0.48
α (LD/DL)	0.99	1.01	1.04	1.09	1.16	2.03
Leu-Phe						
α (LL/DD)	0.64	0.43	0.28	0.21	0.21	0.30
α (LD/DL)	0.99	1.04	1.06	1.13	1.26	1.44

Как видно, порядок выхода энантиомеров меняется на обратный при переходе от ZWIX(+A) к ZWIX(-A). Таким образом, данные ХНФ являются по отношению друг к другу псевдоэнантиомерами, т.е., не являясь энантиомерами, ведут себя как энантиомеры. Действительно, селекторы ZWIX(+A) и ZWIX(-A) (рис. 1.15) содержат 7 хиральных центров и конфигурация трех из них совпадает, однако конфигурации хиральных атомов, входящих в важные для энантиоразделения алкалоидный и аминокислотный фрагменты отличаются, что и может давать псевдоэнантиомерный эффект. Аналогичное поведение по отношению к аминокислотам наблюдалось на родственных ХНФ ZWIX(+) и ZWIX(-) [51; 225; 253].

Исследуемые ХНФ проявляют более высокую энантиоселективность по отношению к энантиомерным парам LL/DD, чем к LD/DL. Порядок выхода диастеромеров зависит от состава ПФ. Например, для Leu-Leu и Leu-Phe на ZWIX(+A) порядок выхода в воде DL > LL, а в

метаноле LL > DL. Это отражает факт влияния ПФ на неселективные взаимодействия в системе. (В отличие от энантиомеров, чей порядок выхода определяется только энантиоселективными взаимодействиями, порядок выхода диастереомеров определяется совокупностью энантиоселективных и неселективных взаимодействий). Дипептиды с более крупными боковыми заместителями (Leu-Phe и Leu-Leu) демонстрируют более высокие коэффициенты разделения, чем соединения, полученные заменой одного из аминокислотных остатков на глицил. Однако положение глицильного остатка также имеет значение: дипептиды с С-концевым глицином чаще демонстрируют более высокие коэффициенты разделения.

Хроматографическое поведение дипептидов на исследованных цвиттер-ионных ХНФ в значительной мере определяется их гидрофильностью/гидрофобностью. По этой характеристике исследованные дипептиды условно можно разделить на 3 группы: гидрофильные (Ala-Ala), гидрофобные (Leu-Leu, Leu-Phe) и дипептиды с промежуточной гидрофобностью (Gly-Phe, Phe-Gly, Gly-Leu и Leu-Gly) (табл. 4.3).

Таблица 4.3

Логарифм коэффициента распределения вода-октанол ($\lg P$)^a и растворимость дипептидов в воде и метаноле при комнатной температуре^b.

Дипептид ^c	Ala-Ala	Gly-Leu	Leu-Gly	Phe-Gly	Gly-Phe	Leu-Leu	Leu-Phe	Phe-Leu
$\lg P$	-1.16	-0.09	-0.09	0.29	1.32	1.66	2.10	2.04
Раств-ть в воде, г/л	12.7	12.5	170	> 270	11.4	15.3	4.0	
Раств-ть, в метаноле, г/л	< 0.1	0.6	170	> 270	0.3	2.8	9.6	

^a Рассчитано с помощью ACD/Labs Percepta Platform - PhysChem Module. ^b Данные взяты из работы [288].
^c Дипептиды в L- или LL-форме.

Графики зависимости $k(\varphi)$ для гидрофобных дипептидов на обеих ХНФ имеют U-образную форму, для гидрофильных характеризуются возрастающей зависимостью, а дипептиды с промежуточной гидрофобностью демонстрируют поведение, варьирующееся от близкого для гидрофильных аналитов до близкого для гидрофобных аналитов. В первом случае, характерном для менее гидрофобных Gly-Leu и Leu-Gly, кривые $k(\varphi)$ демонстрируют слабое уменьшение k в начальной части кривой, что отличает их от чисто «гидрофильных» зависимостей. Во втором случае, наблюдающемся для более гидрофобного Phe-Gly, искривление начального участка становится более выраженным, и форма кривой приближается к U-образной. Полученные закономерности объясняются влиянием на удерживание процессов

сольватации дипептидов в ПФ и конкуренции с компонентами растворителя за взаимодействие с активными центрами 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 элюента, и, соответственно, к уменьшению фактора удерживания. Появление U-образной зависимости связано с тем, что с некоторого значения φ начинает сказываться уменьшение в ПФ концентрации воды, более сильного десорбента, чем метанол, что обуславливает увеличение k .

Также для оценки влияния состава ПФ на удерживание дипептидов использовалась расширенная модель Тсуи и др. [32] (см. разд. 1.2.2). Экспериментальные зависимости $k(\varphi)$ аппроксимировали уравнением (1.16), которое имеет шесть подгоночных параметров (x , y , K_s , u , v и произведение $q_A\phi K_A$). Параметры, относящиеся к процессу сольватации (K_s , u , v) одинаковы для энантиомеров, поэтому регрессионные вычисления выполнялись одновременно для обоих энантиомеров, что позволило уменьшить общее количество подгоночных параметров до 9. Математическая форма уравнения (1.16) не позволяет применять его при $C_W = 0$ или $C_O = 0$. Для того, чтобы включить в расчеты экспериментальные данные, полученные с чистыми растворителями (вода и метанол), соответствующие факторы удерживания относили к составу элюента, содержащему 99.99 % об. основного растворителя и 0.01 % об. соразтворителя. Указанный прием оправдывается тем обстоятельством, что факторы удерживания при таком составе ПФ не отличаются заметно от величин k , полученных с чистым растворителем.

Как показано на рис. 4.1 расширенная модель Тсуи и др. достаточно хорошо описывает экспериментальные данные, за исключением случаев L-Leu-L-Phe и D-Leu-D-Phe на обеих колонках. Низкие значения коэффициентов x и y (табл. 4.4 и 4.5) позволяют предположить, что при адсорбции дипептидов на поверхности ХНФ молекулы обоих растворителей не десорбируются, а остаются связанными с хиральным селектором. Что касается взаимодействия молекул растворителя с дипептидами в ПФ (коэффициенты u и v), модель ожидаемо предсказывает лучшую сольватацию липофильных дипептидов метанолом и гидрофильных дипептидов водой.

4.1.1.2. Ацетонитрил–метанол

Использование в качестве ПФ смесей ацетонитрил–метанол приводило к значительному увеличению времени уравнивания колонки, а также к ухудшению воспроизводимости времени удерживания дипептидов при высоком процентном содержании MeCN (суточные колебания t_R составляли около 25%). По этой причине значения фактора удерживания, приведенные в таблице 4.6, следует рассматривать как приблизительные оценки. Тем не менее,

в нескольких повторных экспериментах наблюдались четко прослеживаемые тенденции влияния концентрации MeCN на удерживание дипептидов.

Таблица 4.4

Коэффициенты расширенной модели Тсуи и др. на ХНФ ZWIX(+A)

	$q_A\beta K_{ad}$	x	y	K_s	u	v	R^2
Ala-Ala							
LL	1.40	0.213	0.000	$8 \cdot 10^{-7}$	4.41	0.000	0.998
DD	1.25	0.213	0.000				0.996
DL	2.47	0.017	0.000	0.01	2.19	0.000	0.990
LD	2.47	0.008	0.000				0.995
Gly-Leu							
L	3.75	0.014	0.007	0.12	1.30	0.053	1.000
D	3.81	0.000	0.005				1.000
Leu-Gly							
L	2.93	0.001	0.006	0.17	1.11	0.054	0.999
D	2.40	0.000	0.011				0.999
Phe-Gly							
L	2.77	0.000	0.000	0.74	0.470	0.096	0.982
D	2.32	0.000	0.007				0.982
Gly-Phe							
L	5.05	0.023	0.065	0.75	0.642	0.000	0.995
D	4.61	0.000	0.067				0.996
Leu-Leu							
LL	1.89	0.000	0.000	0.02	1.10	0.108	0.999
DD	1.41	0.013	0.029				0.981
DL	1.08	0.011	0.047	$5 \cdot 10^{-5}$	1.43	2.10	0.998
LD	1.07	0.000	0.043				0.999
Leu-Phe							
LL	4.10	0.028	0.033	0.56	0.000	0.002	0.720
DD	1.72	0.000	0.103				0.849
DL	3.74	0.014	0.000	0.07	0.130	1.36	0.993
LD	3.57	0.000	0.000				0.994

Коэффициенты расширенной модели Тсуи и др. на ХНФ ZWIX(-A)

	$q_A \beta K_{ad}$	x	y	K_s	u	v	R^2
Ala-Ala							
LL	1.07	0.153	0.000	$2 \cdot 10^{-5}$	4.50	0.00	0.994
DD	1.24	0.151	0.000				0.996
DL	0.97	0.107	0.011	$1 \cdot 10^{-5}$	4.75	0.00	0.989
LD	1.31	0.101	0.012				0.995
Gly-Leu							
L	2.47	0.001	0.010	0.36	0.994	0.115	0.999
D	2.66	0.000	0.000				0.999
Leu-Gly							
L	2.24	0.003	0.153	0.587	0.942	0.000	0.999
D	2.69	0.000	0.138				0.999
Phe-Gly							
L	1.20	0.107	0.029	$2 \cdot 10^{-4}$	1.56	1.49	0.997
D	1.23	0.079					0.995
Gly-Phe							
L	1.26	0.123	0.025	$1 \cdot 10^{-4}$	1.54	1.65	0.994
D	1.74	0.143	0.000				0.992
Leu-Leu							
LL	20.83	0.001	0.053	16.30	0.210	0.093	0.950
DD	36.71	0.004	0.000				0.980
DL	2.83	0.000	0.022	0.02	0.294	1.83	1.000
LD	3.84	0.075	0.018				1.000
Leu-Phe							
LL	3.88	0.128	0.114	0.08	0.009	1.14	0.809
DD	10.52	0.104	0.000				0.769
DL	9.02	0.000	0.033	0.03	0.182	2.09	0.997
LD	10.79	0.031	0.023				0.999

Влияние процентной доли ацетонитрила в ПФ на k на ХНФ ZWIX(+A)

Дипептид	MeCN, % (об/об)			
	0	10	30	50
Ala-Ala				
LL	4.2	4.3	5.7	11.9
DD	3.7	4.3	5.8	10.5
DL	2.8	2.9	4.0	7.2
LD	2.5	2.8	3.8	7.5
Leu-Leu				
LL	1.9	1.8	2.2	5.8
DD	1.4	0.9	1.8	4.7
DL	1.0	0.9	1.6	2.9
LD	0.9	0.9	1.7	3.1
Leu-Phe				
LL	2.7	2.3	2.4	5.2
DD	0.7	0.7	1.1	3.1
DL	1.1	1.0	1.6	3.4
LD	1.0	0.9	1.6	3.5

Для гидрофильных стереоизомеров Ala-Ala фактор удерживания растет по мере увеличения содержания ацетонитрила в ПФ. Это объясняется двумя эффектами: ослаблением сольватирующей способности ПФ по отношению к гидрофильным веществам и снижением ее десорбирующей способности по мере увеличения доли апротонного растворителя (MeCN). Для гидрофобных дипептидов (Leu-Leu и Leu-Phe) k сначала снижается, так как элюент, содержащий ацетонитрил, лучше сольватирует эти дипептиды, чем чистый метанол, но по достижению концентрации MeCN выше 30 об.% фактор удерживания начинает расти из-за ослабления десорбирующей способности ПФ. Сильное размытие пиков для всех трех дипептидов указывает на медленную кинетику адсорбции.

4.1.1.3. Буферные системы

Влияние солевой добавки (ацетат аммония) в ПФ на значения k представлено на рис. 4.2. 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.

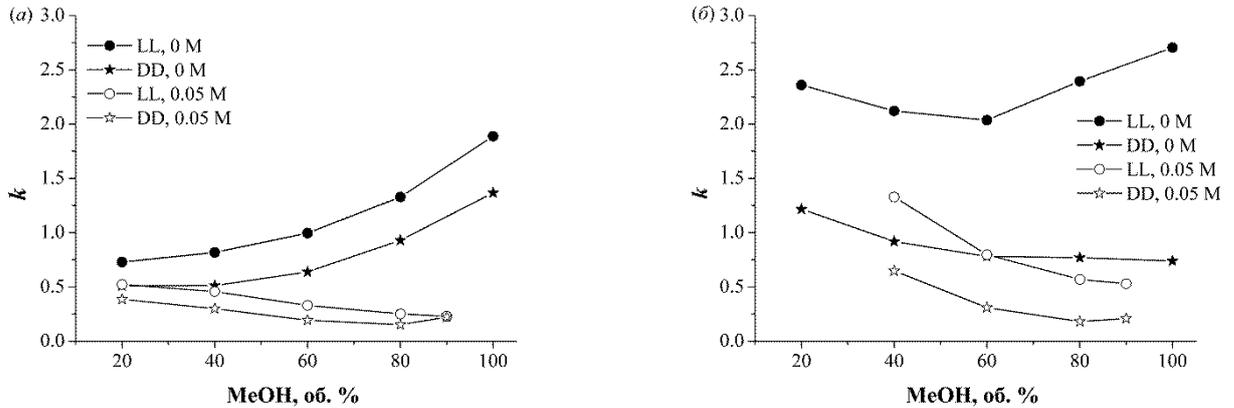


Рис. 4.2. Влияние добавки ацетата аммония в ПФ с различным содержанием MeOH на удерживание энантимеров Leu-Leu и Leu-Phe на ХНФ ZWIX(+A). (а) Leu-Leu (б) Leu-Phe

Влияние pH ПФ на удерживание дипептидов продемонстрировано на рис. 4.3 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. По сравнению с безбуферными системами фактор удерживания уменьшился приблизительно в 2 раза.

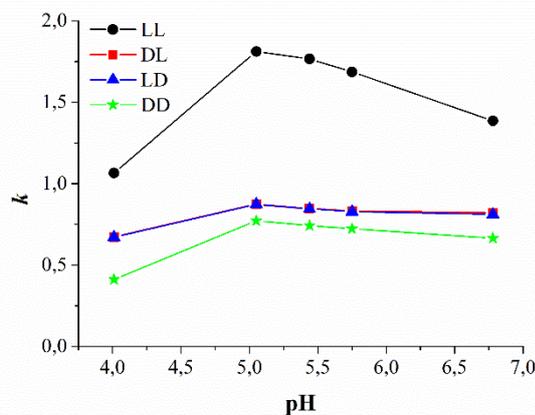


Рис. 4.3. Влияние pH элюента на фактор удерживания Leu-Phe. ХНФ: ZWIX(+A). ПФ: 0.1 M ацетатный буфер, MeOH:H₂O (40:60)

Leu-Phe может существовать в нескольких ионных формах: катионной ($\text{NH}_3^+—\text{R}—\text{COOH}$), цвиттер-ионной ($\text{NH}_3^+—\text{R}—\text{COO}^-$) и анионной ($\text{NH}_2—\text{R}—\text{COO}^-$). Полностью нейтральные молекулы ($\text{NH}_2—\text{R}—\text{COOH}$) присутствуют в растворах дипептидов в незначительных концентрациях и их наличием пренебрегают. Соотношение долей указанных форм изменяется с изменением pH согласно кривым, показанным на рис. 4.4.

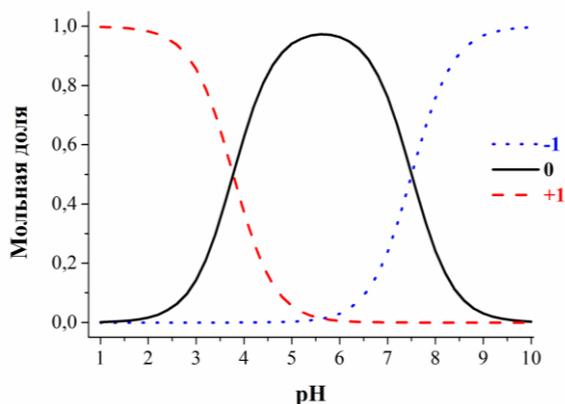


Рис. 4.4. Влияние pH на мольную долю различных ионных форм Leu-Phe в растворителе MeOH:H₂O (40:60)

Сравнение зависимостей на рис. 4.3 и рис. 4.4 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.

* * *

Полученные данные показывают, что хиральные селекторы типа ZWIX(A) проявляют низкую или умеренную энантиоселективность по отношению к стереоизомерам исследуемых веществ; лучшее энантиоразделение наблюдается для дипептидов с крупными заместителями в боковых цепочках. Частицы ZWIX(+A) и ZWIX(-A) ведут себя как псевдоэнантиомерные селекторы по отношению к дипептидам, что характерно для лигандов такой природы. Помимо сродства аналита к селектору удерживание дипептидов определяется процессами сольватации в элюенте, поэтому гидрофобность дипептидов существенно влияет на характер зависимости фактора удерживания от состава подвижной фазы. Для гидрофобных соединений характерны U-образные зависимости фактора удерживания от процентного содержания метанола, а для гидрофильных – монотонно возрастающие зависимости.

4.2. Удерживание и разделение дипептидов на хиральных неподвижных фазах АК56, АК57, АК59

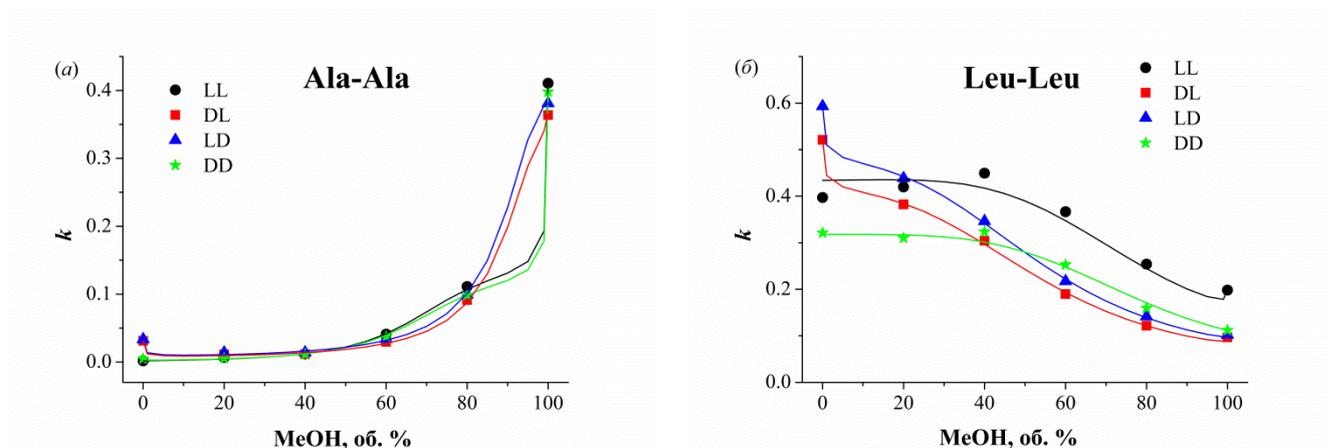
Другой группой исследованных цвиттер-ионных селекторов были аддукты хинина или хинидина с дипептидами L-Ala-L-Leu и L-Leu-L-Ala. Соответствующие ХНФ получили обозначения АК56 (QN-L-Leu-L-Ala), АК57 (QN-L-Ala-L-Leu) и АК59 (QD-L-Ala-L-Leu). Сравнение неподвижных фаз АК56 и АК57 позволило изучить влияние позиционной изомерии дипептидного фрагмента, а неподвижных фаз АК57 и АК59 – конфигурации алкалоидного фрагмента на хроматографические свойства указанной группы хиральных селекторов.

4.2.1. Влияние состава подвижной фазы

Ниже обсуждаются результаты исследований, выполненных при использовании ПФ на основе бинарных растворителей вода-метанол и вода-ацетонитрил. Все исследованные ПФ содержали $2 \cdot 10^{-4}$ М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Такая небольшая добавка электролита не влияла на удерживание, но способствовала быстрому установлению равновесия в колонке.

4.2.1.1. Метанол–вода

Зависимости фактора удерживания исследуемых дипептидов от доли метанола в ПФ на ХНФ АК56 (QN-L-Leu-L-Ala) представлены на рис. 4.5. Показано, что, как и в случае с ХНФ типа ZWIX(A), вид зависимости фактора удерживания от объемной доли метанола в ПФ определяется гидрофобностью аналита. Для относительно гидрофильного дипептида Ala-Ala зависимость возрастающая, для гидрофобных дипептидов Leu-Leu, Leu-Phe и Phe-Leu – убывающая, а для дипептидов с промежуточной гидрофобностью зависимость имеет U-образный характер (Gly-Leu/Leu-Gly) или вид убывающей зависимости с подъемом при $\varphi > 80$ % (Gly-Phe/Phe-Gly).



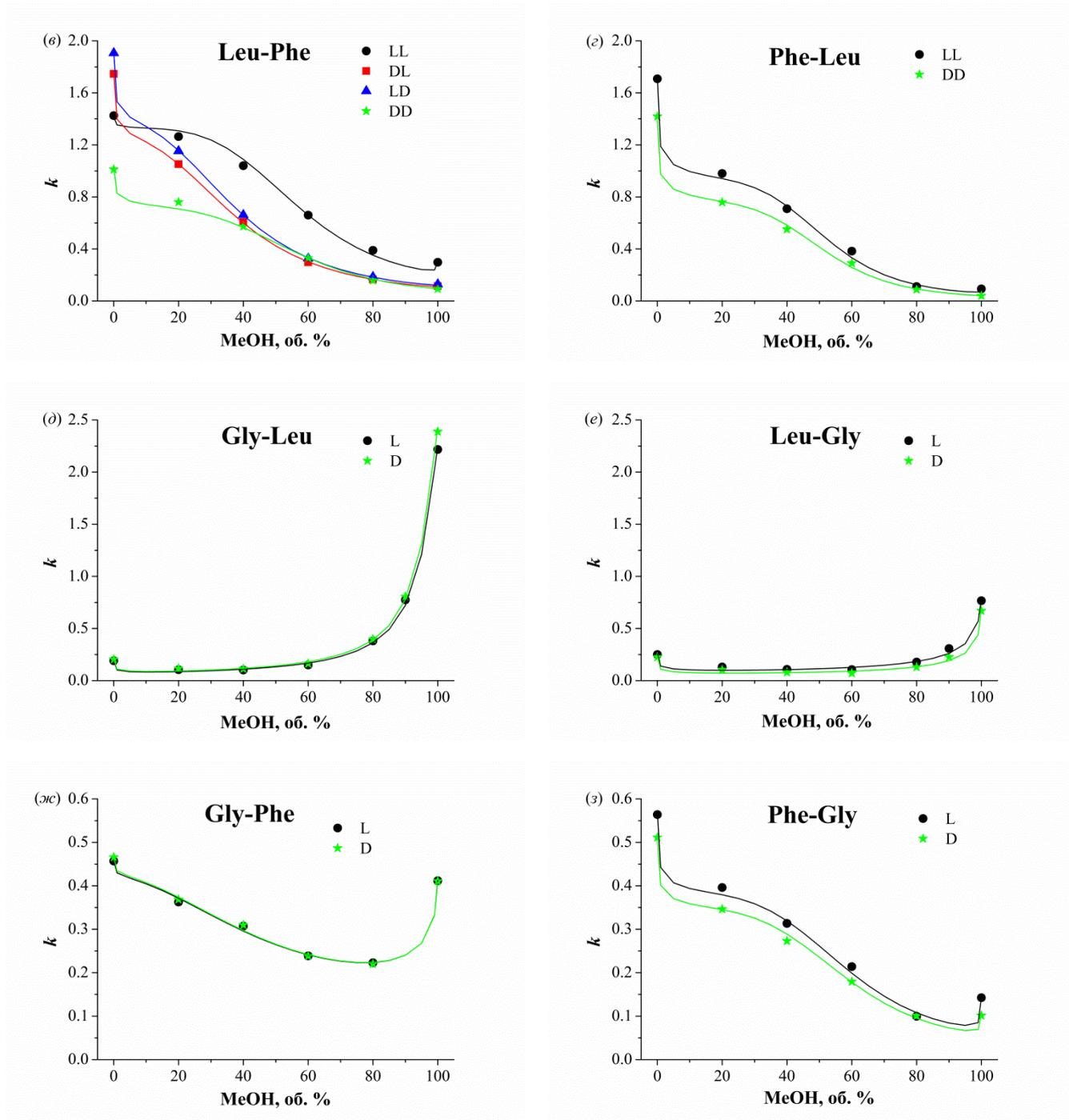


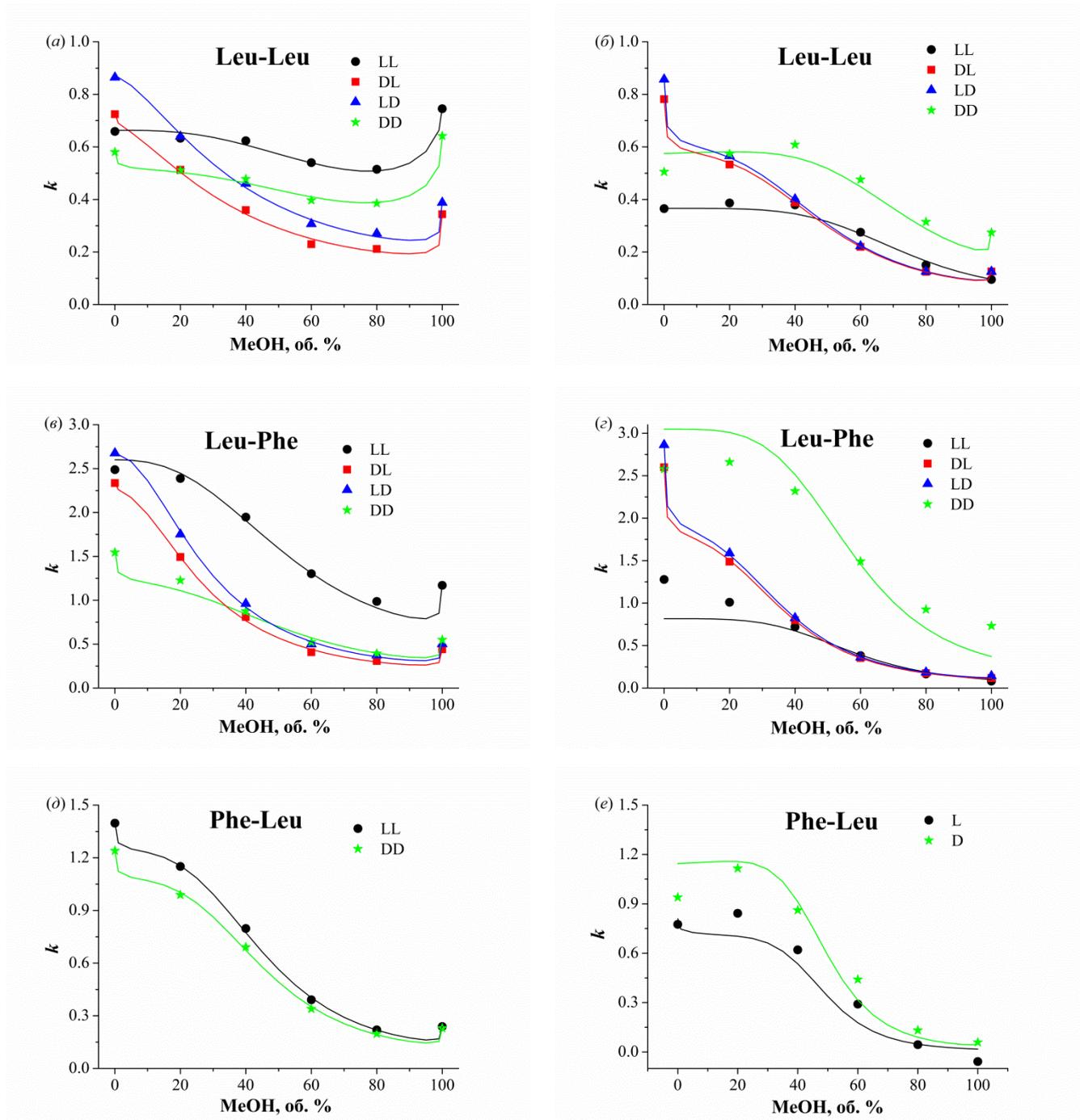
Рис. 4.5. Влияние доли метанола в ПФ на фактор удерживания дипептидов на ХНФ АК56. (а) Ala-Ala, (б) Leu-Leu, (в) Leu-Phe, (г) Phe-Leu, (д) Gly-Leu, (е) Leu-Gly, (ж) Gly-Phe, (з) Phe-Gly.

Точки – экспериментальные данные, линии – результат аппроксимации уравнением (1.16)

Интересно, что для энантиомерной пары LL/DD Leu-Leu зависимость проходит через слабо выраженный максимум и далее падает. Такое поведение для L-Leu-L-Leu и D-Leu-D-Leu скорее всего обусловлено особенностями адсорбционного взаимодействия. Позиционная изомерия дипептидов, исследованная на парах Leu-Phe/Phe-Leu, Gly-Leu/Leu-Gly и Gly-Phe/Phe-Gly не оказывает существенного влияния на удерживание и не изменяет тип зависимостей $k(\varphi)$.

Однако в случае пар Gly-Leu/Leu-Gly и Gly-Phe/Phe-Gly остаток гидрофобных аминокислот (Leu и Phe) в С-терминальном положении дипептида приводит к более сильному связыванию с ХНФ в области чистого органического растворителя. Коэффициент разделения энантиомеров выше для более гидрофобных дипептидов и повышается с увеличением доли метанола в ПФ, достигая для пары энантиомеров LL/DD значений 1.8 в случае Leu-Leu и значений 3.2 в случае Leu-Phe. Энантиомерные пары LD/DL характеризуется низкими значениями α для всех исследованных дипептидов, также как и глицилсодержащие дипептиды.

На рис. 4.6 представлены зависимости факторов удерживания дипептидов от доли метанола на ХНФ АК57 (QN-L-Ala-L-Leu) и АК59 (QD-L-Ala-L-Leu).



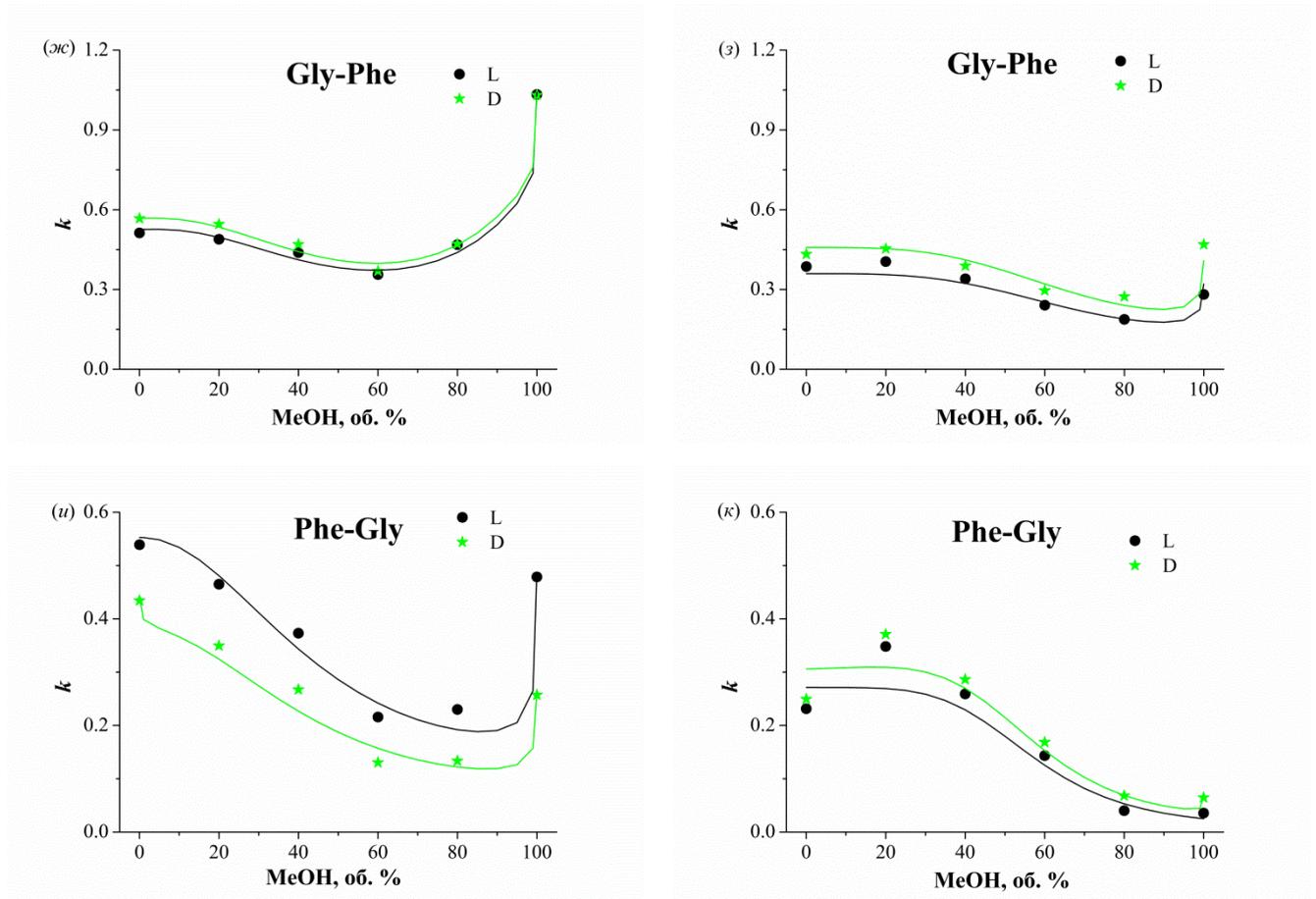


Рис. 4.6. Влияние доли метанола в ПФ на фактор удерживания дипептидов на ХНФ АК57 (а, в, д, ж, и) и АК59 (б, г, е, з, к). Точки – экспериментальные данные, линии – результат аппроксимации уравнением (1.16)

На данных ХНФ также наблюдается обращение порядка элюирования энантиомеров при изменении конфигурации алкалоидного фрагмента, т.е. замены QN на QD как и на ХНФ семейства ZWIX [51; 225; 253]. Из полученных зависимостей видно, что на обеих исследуемых ХНФ достигается разделение энантиомерной пары LL/DD Leu-Leu и Leu-Phe практически во всем диапазоне концентраций MeOH в ПФ, однако разделение пары LD/DL невозможно. В целом пара LL/DD Leu-Phe характеризуется большим коэффициентом разделения, чем LL/DD Leu-Leu. Также на ХНФ АК57 достигается разделение энантиомеров Phe-Gly. Энантиоразделение остальных дипептидов на данных ХНФ невозможно. Коэффициент α энантиомеров дипептидов, которые возможно разделить на данных ХНФ, повышается с увеличением доли метанола в ПФ.

Вид кривых $k(\varphi)$ на ХНФ АК57 и АК59 сложнее, чем на ХНФ АК56. Все исследуемые дипептиды на ХНФ с селектором QN-L-Ala-L-Leu характеризуются убывающей зависимостью k от φ с незначительным подъемом фактора удерживания при увеличении содержания метанола выше 80 об.%. Для дипептидов, содержащих остаток глицина, скачок k в области чистого

органического растворителя более ярко выражен. Этот возрастающий участок можно объяснить уменьшением сольватирующей способности элюента по отношению к поверхности адсорбента, что эквивалентно уменьшению ее десорбирующей способности, при уменьшении содержания воды ниже 20 об.%. На ХНФ с привитым QD-L-Ala-L-Leu энантиомерная пара LD/DL Leu-Leu и все стереоизомеры (кроме DD) Leu-Phe характеризуются убывающей зависимостью $k(\varphi)$, у пары LL/DD Leu-Leu и D-Leu-D-Phe зависимость проходит через слабо выраженный максимум и далее падает. Для дипептидов Phe-Leu, Gly-Phe, Phe-Gly зависимости k от φ имеют возрастающие и убывающие участки: k возрастает при увеличении MeOH от 0 до 20 об. % и далее падает. Для Gly-Phe также наблюдается увеличение фактора удерживания при элюировании чистым органическим растворителем. В целом отличие кривых $k(\varphi)$ для этих двух ХНФ не носит принципиального характера и может быть объяснено небольшими различиями вкладов десорбции элюента с поверхности неподвижной фазы и энергии образования адсорбционного комплекса в общую свободную энергию адсорбции (см. раздел 1.2.8.1).

Сравнение зависимостей $k(\varphi)$ на рис. 4.5 и 4.6(a, в, д, ж, и) показывает влияние позиционной изомерии катионообменного дипептидного фрагмента (L-Leu-L-Ala в АК56 и L-Ala-L-Leu в АК57) 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.

На всех исследуемых ХНФ на основе хинина/хинидина с дипептидами полученные экспериментальные зависимости k от φ также были аппроксимированы уравнением (1.16) (рис. 4.5 и 4.6). Модель удовлетворительно описывает зависимости $k(\varphi)$ на ХНФ АК56 и АК57. На ХНФ АК59 зависимости фактора удерживания дипептидов от доли метанола в ПФ описываются моделью менее точно. Очевидно, что в этом случае допущения, принятые при выводе уравнения (1.16), выполняются в той мере, какая требуется для высокого качества подгонки. Наиболее важным в рассматриваемой ситуации является допущение о существовании адсорбата в одной ионной форме. В действительности дипептиды в зависимости от pH ПФ могут существовать в нескольких ионных формах, которые могут характеризоваться разным сродством к адсорбционным центрам (см. разд. 4.1.1.3). В рассматриваемых условиях

нейтральной pH среды, до 40% дипептида может находиться в анионной форме, тогда как основная масса адсорбтива будет цвиттер-ионом. Расширение используемой модели для двух ионных форм дипептидов невозможно, поскольку это потребовало бы недопустимо большого количества подгоночных параметров. Возникает вопрос: почему на ХНФ АК56 и АК57 с селектором на основе хинина расширенная модель Тсуи и др. позволяет описывать экспериментальные данные с высокой степенью совпадения, а на ХНФ АК59 с селектором на основе хинидина – нет? Возможно, изменение конфигурации селектора при замене хинина на хинидин делает его более чувствительным к наличию или отсутствию заряда на аминной группе дипептида.

На данных ХНФ как и на ХНФ типа ZWIX(A) коэффициенты x и y близки к нулю (табл. 4.7-4.9), что формально говорит об отсутствии десорбции молекул воды и метанола с поверхности ХНФ при адсорбции дипептидов. Возможно, это свидетельствует о том, что число молекул растворителя, связанных со свободным селектором и с адсорбционным комплексом близко. Т.е. десорбированные молекулы растворителя сольватируют адсорбционный комплекс. Число молекул метанола и воды (кажущееся), вступающих в сольватационное взаимодействие с исследуемыми дипептидами (параметры u и v), согласуется с гидрофильностью дипептидов. Более гидрофильные Ala-Ala, Leu-Gly и Gly-Leu лучше сольватируются водой (u высокое, v низкое), а более гидрофобные Leu-Leu, Leu-Phe, Phe-Leu, Phe-Gly, Gly-Phe – метанолом (u низкое, v высокое).

Таблица 4.7

Коэффициенты расширенной модели Тсуи и др. на ХНФ АК56

	$q_A \beta K_{ad}$	x	y	K_s	u	v	R^2
Ala-Ala							
LL	0.18	0.165	0.000	$7 \cdot 10^{-6}$	3.91	0.00	1.000
DD	0.23	0.172	0.000				1.000
DL	0.35	0.014	0.010	0.01	2.05	0.21	1.000
LD	0.38	0.000	0.000				1.000
Gly-Leu							
L	3.52	0.000	0.140	0.23	1.298	0.000	0.999
D	3.80	0.000	0.141				1.000
Leu-Gly							
L	0.79	0.000	0.000	0.33	0.723	0.180	0.989
D	0.66	0.025	0.028				0.991

	$q_A\beta K_{ad}$	x	y	K_s	u	v	R^2
Phe-Gly							
L	0.65	0.116	0.054	$2 \cdot 10^{-5}$	0.000	3.89	0.996
D	0.54	0.090	0.052				0.998
Gly-Phe							
L	0.429	0.004	0.013	$7 \cdot 10^{-4}$	0.53	1.94	0.995
D	0.431	0.003	0.015				0.996
Leu-Leu							
LL	0.49	0.030	0.000	$5 \cdot 10^{-6}$	0.000	3.98	0.941
DD	0.32	0.000	0.000				0.986
DL	0.46	0.022	0.035	$5 \cdot 10^{-4}$	0.000	2.77	0.999
LD	0.51	0.013	0.033				1.000
Leu-Phe							
LL	1.67	0.056	0.009	$4 \cdot 10^{-5}$	0.000	3.71	0.996
DD	0.78	0.000	0.046				0.996
DL	1.32	0.003	0.048	$2 \cdot 10^{-3}$	0.010	2.64	1.000
LD	1.46	0.004	0.047				1.000
Phe-Leu							
LL	1.40	0.069	0.079	$5 \cdot 10^{-6}$	0.000	4.69	0.998
DD	0.87	0.000	0.077				0.998

Таблица 4.8

Коэффициенты расширенной модели Тсуи и др. на ХНФ АК57

	$q_A\beta K_{ad}$	x	y	K_s	u	v	R^2
Phe-Gly							
L	0.60	0.021	0.000	$2 \cdot 10^{-3}$	0.267	2.08	0.971
D	0.39	0.000	0.021				0.960
Gly-Phe							
L	0.71	0.074	0.000	$2 \cdot 10^{-6}$	1.63	2.67	0.994
D	0.73	0.064	0.000				0.994

	$q_A \beta K_{ad}$	x	y	K_s	u	v	R^2
Leu-Leu							
LL	0.70	0.013	0.000	$8 \cdot 10^{-6}$	0.73	2.92	0.981
DD	0.58	0.028	0.018				0.991
DL	0.72	0.000	0.000	$2 \cdot 10^{-2}$	0.12	1.51	0.996
LD	0.87	0.016	0.010				0.997
Leu-Phe							
LL	2.60	0.000	0.000	$7 \cdot 10^{-4}$	0.12	2.54	0.996
DD	1.29	0.008	0.037				0.985
DL	2.31	0.007	0.007	$1.4 \cdot 10^{-2}$	0.10	1.95	0.999
LD	2.66	0.000	0.000				0.999
Phe-Leu							
LL	1.72	0.080	0.019	$5 \cdot 10^{-4}$	0.000	3.08	0.999
DD	1.58	0.092	0.021				0.999

Таблица 4.9

Коэффициенты расширенной модели Тсуи и др. на ХНФ АК59

	$q_A \beta K_{ad}$	x	y	K_s	u	v	R^2
Phe-Gly							
L	0.27	0.000	0.000	$5 \cdot 10^{-6}$	0.000	4.50	0.903
D	0.44	0.090	0.000				0.904
Gly-Phe							
L	0.36	0.000	0.000	$8 \cdot 10^{-6}$	0.35	3.56	0.895
D	0.46	0.000	0.000				0.825
Leu-Leu							
LL	0.37	0.000	0.000	$3 \cdot 10^{-6}$	0.000	4.34	0.988
DD	0.75	0.066	0.000				0.914
DL	0.79	0.068	0.044	$4 \cdot 10^{-4}$	0.000	3.08	1.000
LD	0.82	0.065	0.051				1.000

	$q_{A\beta}K_{ad}$	x	y	K_s	u	v	R^2
Leu-Phe							
LL	0.82	0.000	0.000	$2 \cdot 10^{-5}$	0.000	3.98	0.936
DD	3.05	0.000	0.000				0.997
DL	1.98	0.015	0.055	$1 \cdot 10^{-3}$	0.003	2.94	1.000
LD	2.22	0.031	0.063				1.000
Phe-Leu							
LL	0.73	0.000	0.018	$9 \cdot 10^{-7}$	0.000	5.49	0.954
DD	1.60	0.084	0.000				0.970

4.2.1.2. Ацетонитрил–вода

Влияние содержания ацетонитрила на удерживание стереоизомеров дипептидов Leu-Leu и Leu-Phe на ХНФ АК56 показано на рис. 4.7. 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. 4.5). 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.

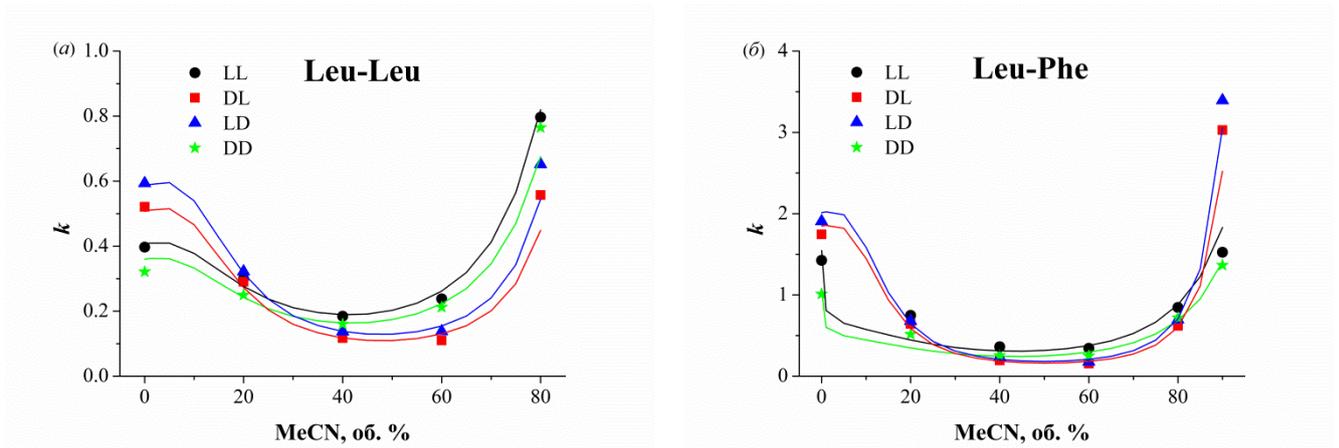


Рис. 4.7. Влияние доли ацетонитрила в ПФ на фактор удерживания дипептидов на ХНФ АК56. (а) Leu-Leu, (б) Leu-Phe. Точки – экспериментальные данные, линии – результат аппроксимации уравнением (1.16)

Зависимости фактора удерживания на ХНФ АК56 от процентной доли ацетонитрила в ПФ удовлетворительно аппроксимируются уравнением (1.16) (рис. 4.7). Коэффициенты x для дипептидов Leu-Leu и Leu-Phe в смесях MeCN–H₂O заметно выше, чем в смесях MeOH–H₂O, хотя все еще меньше единицы (табл. 4.10). При этом в сольватации обоих дипептидов участвуют как молекулы воды, так и молекулы ацетонитрила (в среднем по 2-3 молекулы первого и второго растворителя).

Таблица 4.10

Коэффициенты расширенной модели Тсуи и др. на ХНФ АК56

	$q_A \beta K_{ad}$	x	y	K_s	u	v	R^2
Leu-Leu							
LL	9.90	0.795	0.000	$2 \cdot 10^{-6}$	2.518	2.559	0.995
DD	7.32	0.750	0.000				0.985
DL	13.98	0.825	0.000	$2 \cdot 10^{-6}$	2.400	3.120	0.968
LD	18.33	0.826	0.000				0.976
Leu-Phe							
LL	9.85	0.683	0.142	$1 \cdot 10^{-6}$	2.430	2.624	0.940
DD	6.93	0.662	0.123				0.972
DL	13.99	0.504	0.000	$1 \cdot 10^{-6}$	2.648	3.278	0.978
LD	18.33	0.550	0.000				0.991

* * *

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 ХНФ 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 анализита 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.

ГЛАВА 5. ДИНАМИКА АДСОРБЦИИ ДИПЕПТИДОВ

5.1. Коэффициенты молекулярной диффузии дипептидов в водно-метанольных растворах

Коэффициент молекулярной диффузии является важным параметром, влияющим на скорость процессов массопереноса в колонке. Знание этой величины необходимо для расчета приведенной скорости потока ПФ, а также для вычислений по уравнениям (1.49) – (1.51). В табл. 5.1 приведены экспериментальные значения указанной характеристики для Leu-Leu, Gly-Gly, Leu-Phe, Gly-Leu и Leu-Gly, а также величины гидродинамических радиусов молекул, рассчитанных по уравнению Стокса-Эйнштейна с использованием экспериментальных значений D_m и молекулярные радиусы исследованных дипептидов, полученные путем оптимизации геометрии молекул методом молекулярной механики.

Таблица 5.1

Экспериментальные значения D_m и радиусы молекул дипептидов

Дипептид	Доля метанола в ПФ, %	D_m^a , см ² /с	$D_m \cdot \eta_B$, см ² ·мПа	Гидродинамический радиус, нм	Молекулярный радиус, нм
Leu-Leu	10	$4.72 \cdot 10^{-6}$	$5.21 \cdot 10^{-6}$	0.42	0.48
	40	$3.32 \cdot 10^{-6}$	$5.44 \cdot 10^{-6}$	0.40	
	80	$4.71 \cdot 10^{-6}$	$5.14 \cdot 10^{-6}$	0.43	
	100	$8.60 \cdot 10^{-6}$	$4.65 \cdot 10^{-6}$	0.47	
Gly-Gly	10	$6.77 \cdot 10^{-6}$	$7.47 \cdot 10^{-6}$	0.29	0.38
	40	$4.61 \cdot 10^{-6}$	$7.55 \cdot 10^{-6}$	0.29	
Leu-Phe	40	$3.30 \cdot 10^{-6}$	$5.41 \cdot 10^{-6}$	0.40	0.50
Gly-Leu	10	$5.41 \cdot 10^{-6}$	$5.97 \cdot 10^{-6}$	0.37	0.43
	80	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$5.43 \cdot 10^{-6}$	0.40	
Leu-Gly	10	$5.32 \cdot 10^{-6}$	$5.87 \cdot 10^{-6}$	0.37	0.47
	80	$5.03 \cdot 10^{-6}$	$5.49 \cdot 10^{-6}$	0.40	

^aПогрешность значений D_m не превышала 0.2 %.

Коэффициент диффузии зависит от состава ПФ, однако произведение $D_m \cdot \eta_B$ должно быть инвариантно относительно изменения этого состава, если гидродинамический радиус молекулы остается постоянным (см. уравнение (2.13)). Как видно из таблицы постоянства данного произведения не наблюдается, что указывает на зависимость величины r_h от состава

растворителя. Гидродинамические радиусы совпадают по порядку величины с ван-дер-ваальсовыми радиусами, рассчитанными методом молекулярной механики, хотя и несколько ниже этих значений. Логично предположить, что молекулы дипептидов в растворе окружены нестабильной сольватной оболочкой. В противном случае гидродинамический радиус был бы заметно больше молекулярного радиуса.

5.2. Анализ кривых ван Деемтера

Традиционным методом изучения динамики адсорбции в хроматографии является анализ кривых ван Деемтера. Об особенностях динамики адсорбции говорит как сама форма кривых, так и численные значения параметров уравнения, которые связаны с характеристиками массопереноса выражениями, зависящими от выбранной динамической модели (в представленной работе выбрана так называемая GR модель). В нижеследующих разделах рассматриваются кривые ван Деемтера, полученные для дипептидов на колонках Chirobiotic R (разд. 5.2.1 и 5.2.2), Chirobiotic V (разд. 5.2.2) и AK57 (разд. 5.2.3). Все эксперименты выполнялись с ПФ на основе бинарного растворителя MeOH-H₂O, содержащего 0.2 мМ ацетата аммония – добавки, обеспечивающей воспроизводимость свойств неподвижной фазы. Долю метанола выбирали из соображений достижения максимальной энантиоселективности по отношению к исследуемым дипептидам на данной колонке. Составы ПФ для каждого эксперимента представлены в табл. 2.4.

5.2.1. Gly-Leu и Leu-Gly на колонке Chirobiotic R

Исследовалось динамическое поведение обоих энантиомеров Gly-Leu и L-Leu-Gly. Энантиомеры Gly-Leu не разделяются на данной ХНФ ($\alpha = 1.3$), первым элюируется L-форма [289]. Энантиомеры Leu-Gly, позиционного изомера Gly-Leu, практически не делятся [289] и элюируются близко к слабо удерживаемому Gly-L-Leu. В то же время, термодинамические характеристики адсорбции Gly-L-Leu и L-Leu-Gly различаются, что указывает на различие режимов связывания этих двух дипептидов хиральным селектором [289]. Таким образом, сравнение динамического поведения Gly-D-Leu и Gly-L-Leu, с одной стороны, и Gly-L-Leu и L-Leu-Gly, с другой стороны, позволит лучше понять механизмы размывания пика в хиральной хроматографии и, в частности, влияние связывания селектор-селектанд на динамику адсорбции в хиральных колонках.

На рис. 5.1 представлены кривые ван Деемтера исследуемых соединений. Хотя выполнялись две серии измерений с интервалом в 2-4 недели, на графике представлен только один набор данных, поскольку межсуточная воспроизводимость кривых не превышала погрешности определения h .

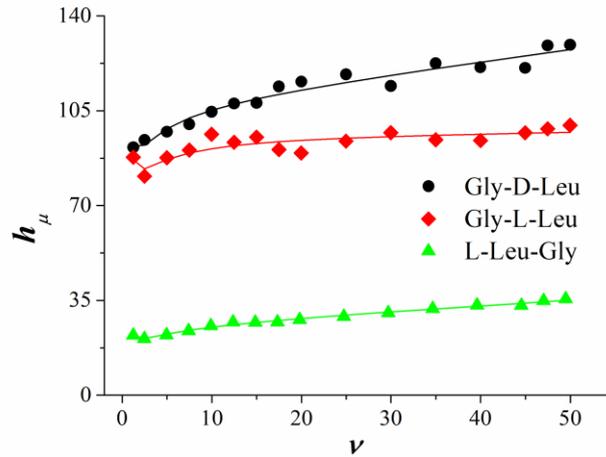


Рис. 5.1. Зависимости ван Деемтера для Gly-L-Leu, Gly-D-Leu и L-Leu-Gly на ХНФ Chirobiotic R. Точки – экспериментальные данные, линии – аппроксимация уравнением ван Деемтера-Гиддингса. ПФ: MeOH–H₂O (80:20, об/об), CH₃COONH₄ (0.0002 моль/л)

Для Leu-Gly относительное стандартное отклонение (ОСО) величины ВЭТТ не превышало 5%. Для обоих энантиомеров Gly-Leu, ОСО составляло менее 10%. Указанная дисперсия данных для энантиомеров Gly-Leu объясняет наличие заметных флуктуаций экспериментальных точек относительно линии аппроксимации на соответствующих графиках ван Деемтера (рис. 5.1). В случае Leu-Gly точки практически лежат на аппроксимационной линии. Меньший разброс данных для Leu-Gly объясняется меньшим хвостом его пиков, поскольку колебания сигнала на хвостовой части пика существенно влияют на значение μ'_2 .

Этот эффект продемонстрирован на рис. 5.2, где показаны два последовательно записанных пика Gly-L-Leu. Хроматограммы визуально совпадают в масштабе графика, однако увеличение (см. вставку) демонстрирует едва заметные различия в профилях хвоста пика, что приводит к значительным различиям в абсциссах предела высоты пика в 1%. Эти незначительные различия, однако, приводят к заметному расхождению в ВЭТТ – значения h для этих пиков отличаются на 20%.

Экспериментальные данные хорошо аппроксимируются уравнением (1.48). На рис. 5.1 видно, что все графики ван Деемтера имеют необычную выпуклую вверх форму, хотя кривизна графика не является сильной и едва различима в случае слабо удерживаемых Gly-L-Leu и L-Leu-Gly. Для двух последних соединений наблюдается начало возрастающей B/ν -ветви кривой ван Деемтера при $\nu < 2.5$. Экспериментальные параметры массопереноса, относящиеся к продольной диффузии (B) и трансколочной вихревой диффузии (λ_3, ω_3), необычайно высоки

(табл. 5.2), в то время как кинетические коэффициенты C ($C_s + C_{ads}$) имеют обычные для хиральной хроматографии значения [131; 133; 139; 255; 290].

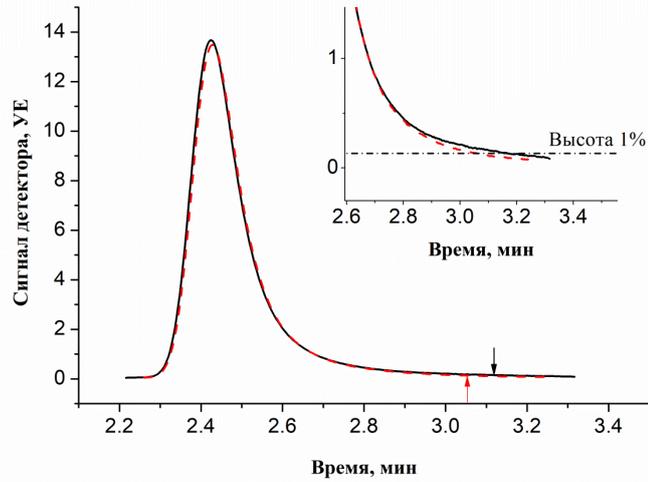


Рис. 5.2. Последовательно записанные хроматограммы Gly-L-Leu при скорости потока 1.8 мл/мин. Стрелками отмечен правый предел пика для первой (красная) и второй (черная) хроматограмм. На вставке показан увеличенный вариант хвостовой части с 2.6 до 3.4 мин.

Пунктирной горизонтальной линией на вставке показан 1% высоты пика

Таблица 5.2

Константы адсорбционного равновесия и коэффициенты уравнения ван Деемтера-Гиддингса

Дипептид	K , $\text{см}^3/\text{см}^3$	B	λ_3	ω_3	$C_s + C_{ads}$	D_{eff}/D_m	$(k_{ads})_{min}^a$, с^{-1}	$(k_{ads})_{max}^b$, с^{-1}
Gly-D-Leu	3.60	58	58	80	0.270	5.9	76	133
Gly-L-Leu	1.14	63	52	60	0.041	12.0	236	$< 0^c$
L-Leu-Gly	1.02	14	12	13	0.193	2.9	35	51

^aВычислено из предположения, что $D_{sur} = D_m$; ^bвычислено из предположения, что $D_{sur} = 0$; ^cотрицательное значение появилось из-за небольшой экспериментальной суммы $C_s + C_{ads} = 0.04$, поскольку C_s , рассчитанный для ситуации, когда $D_{sur} = 0$, составил 0.08. Соответственно, $C_{ads} = 0.04 - 0.08 < 0$.

Если пренебречь поверхностной диффузией, верхний теоретический предел коэффициента B , равного в данном случае $2(\gamma_e + F_e \varepsilon_i \gamma_i)$, должен составлять около 2. Эта оценка получена в предположении, что $\gamma_e = 0.65$ [98], а $\gamma_i = \gamma_{i,0} = 0.72$ [291]; произведение $F_e \varepsilon_i$ для современных хроматографических колонок близко к 0.5. Экспериментальные значения во много раз превышают указанный предел даже для слабо удерживаемых соединений (табл. 5.2). Это можно было бы объяснить влиянием поверхностной диффузии. Действительно, поверхностная диффузия должна увеличивать D_i и, следовательно, D_{eff} . Этот эффект, однако, имеет свой предел, поскольку отношение D_{sur}/D_m не может превышать 1 [92; 292].

Представленные данные показывают, что это отношение должно лежать в диапазоне от 6.5 до 28, чтобы соответствовать экспериментальным значениям коэффициента B . Таким образом, поверхностная диффузия сама по себе не может объяснить наблюдаемые результаты. Должен существовать дополнительный источник размывания хроматографической полосы, способствующий увеличению коэффициента продольной диффузии. Для объяснения были предложены две гипотезы. Первая из них [132] указывает на более сложную зависимость терма транслоночной вихревой диффузии от скорости потока, чем это предполагается функцией Гиддингса [293; 294]. Если часть этой зависимости пропорциональна $1/v$, то эта часть может быть объединена с термом B/v . Вторая гипотеза [139; 295] рассматривает медленную кинетику адсорбции/десорбции как причину необычного динамического поведения в хиральных системах. Кажущиеся константы скорости адсорбции действительно относительно низки. Оценки максимальной и минимальной k_{ads} для исследуемых дипептидов представлены в таблице 5.2. Аналогичные значения были получены для адсорбции различных хиральных аналитов на ХНФ щеточного типа [131; 132; 286]. Более медленная кинетика адсорбции наблюдалась на объемных полимерных ХНФ [296; 297] и наоборот более быстрая на ХНФ с полимерным покрытием Lux-Cellulose [298]. Быстрая адсорбция предполагает, что k_{ads} составляет порядка 10^3 - 10^4 с^{-1} [299]. Значения констант скорости адсорбции, приведенные в таблице 5.2, меньше примерно в 10-100 раз, хотя и не являются исключительно низкими. В работе [296] сообщалось о $k_{ads} \approx 0.5$ с^{-1} для S-энантиомера основания Трегера на ХНФ на основе триацетата целлюлозы. Однако соответствующий график ван Деемтера имел классическую линейную Cv -ветвь. Следовательно, медленная кинетика адсорбции сама по себе не может объяснить выпуклую форму восходящей ветви кривой ван Деемтера. Должен существовать механизм, который нарушал бы линейную зависимость кинетического C -терма от скорости потока.

Сравнение результатов, полученных с энантиомерами Gly-Leu, показывает, что более сильно удерживаемый D-энантиомер характеризуется большим размыванием хроматографической полосы, чем L-энантиомер. Это различие обусловлено кинетическим термом, поскольку параметры аксиальной дисперсии (B , λ_3 и ω_3) для энантиомеров сопоставимы. Разница в коэффициенте C в 6.8 раз частично объясняется отличием в факторе $[k_1/(1 + k_1)]^2$, который примерно в 2 раза больше для Gly-D-Leu, чем для Gly-L-Leu. Тем не менее, существует заметное различие в кинетических термах этих оптических антиподов, указывающее на то, что скорость связывания D-формы ниже, чем L-формы. Образование более прочного комплекса D-энантиомера с хиральным селектором требует дополнительного времени для оптимизации положения адсорбата внутри хирального кармана. Следует отметить, что этот

вывод основан на сравнении коэффициентов C , а не на значениях k_{ads} (табл. 5.2), которые являются приблизительными оценками и показывают лишь порядок величины.

График ван Деемтера для L-Leu-Gly лежит значительно ниже графика для Gly-L-Leu (рис. 5.1) 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 5.2, могут создать впечатление, что продольная диффузия и вихревая диффузия ответственны за отличие в динамике адсорбции этих веществ. Но физико-химические свойства, определяющие продольную и вихревую диффузию этих дипептидов, одинаковы, тогда как способы связывания селектора с хиральными молекулами, определяющие кинетику адсорбции, могут отличаться. Это подтверждает приведенную выше гипотезу о том, что параметры B , λ_3 и ω_3 являются кажущимися коэффициентами, каким-то образом связанными с эффектами, возникающими в результате медленной кинетики адсорбции.

Вильямсон с соавт. в работе [254] сообщали, что для образования комплекса пептид-ристоцетин А важна С-концевая аминокислота, поскольку ее карбоксильная группа отвечает за связывание с антибиотиком. Алкильная боковая группа аминокислоты в D-положении точно комплементарна структуре хирального кармана. Положение боковой группы в L-энантиомере разрушила бы оптимальную конфигурацию, но как указывает относительно большое размывание хроматографического пика Gly-L-Leu, образование слабого адсорбционного комплекса все еще характеризуется относительно медленной кинетической стадией. С-концевой глицин L-лейцилглицина не должен приводить к сильному связыванию из-за существенной свободы движений благодаря своему маленькому размеру [254]. Вполне вероятно, что этот дипептид взаимодействует с периферическими группами ристоцетина А, а не входит в его центр связывания. Но даже если это произойдет, то процесс будет быстрым и стерически беспрепятственным.

Таким образом, тот факт, что зависимости ван Деемтера Gly-L-Leu и L-Leu-Gly (оба слабо удерживаются на ХНФ Chirobiotic R) сильно отличаются, подтверждает предположение о различных способах связывания этих дипептидов с селектором. Предположительно оба энантиомера Gly-Leu образуют комплекс включения с привитым фрагментом ристоцетина А (слабый для L- и сильный для D-энантиомера) через карбоксильную группу, входящую в хиральный карман, тогда как с Leu-Gly имеет место слабое и стерически беспрепятственное взаимодействие с этим фрагментом. Выпуклая вверх форма кривых ван Деемтера не может быть объяснена только медленной кинетикой адсорбции/десорбции. Два эмпирических факта указывают на то, что такая форма обусловлена взаимным влиянием кинетики адсорбции/десорбции и вихревой диффузии:

1. Явление наблюдается или сильнее выражено для соединений, характеризующихся заметным удерживанием и, в случае пары энантиомеров, для более сильно 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.

5.2.2. Leu-Leu и Gly-Gly на колонках Chirobiotic R и Chirobiotic V

В предыдущем разделе была выдвинута гипотеза о том, что необычный вид кривых ван Деемтера удерживаемых дипептидов на ХНФ обусловлен влиянием медленной кинетики адсорбции на процессы вихревой диффузии. Для подтверждения этой гипотезы было необходимо сравнить динамическое поведение дипептидов на колонках с ХНФ, отличающихся кинетикой связывания адсорбата с селектором, но с одинаковой морфологией зерен адсорбента и структурой слоя неподвижной фазы, что должно гарантировать одинаковые характеристики вихревой диффузии. Если на таких колонках экспериментальные показатели вихревой диффузии (коэффициенты A - и B -термов) будут существенно отличаться, гипотеза будет подтверждена.

Исследуемый класс антибиотиковых ХНФ марки Chirobiotic предоставляет такую возможность, поскольку для их изготовления используют один тип силикагеля с одинаковыми характеристиками пористости, одну методику синтеза, колонки набивают одним и тем же способом на однотипном оборудовании. Это должно обеспечивать одинаковую плотность насадки, одинаковые *истинные* значения геометрических характеристик слоя насадки, коэффициентов λ и ω и внешнего и внутреннего факторов обструкции. Константы скорости адсорбции при этом должны зависеть от природы хирального селектора. Следовательно, процессы массообмена, не связанные с взаимодействием адсорбата с хиральным селектором в соответствующих колонках, будут одинаковыми, а различие в графиках ван Деемтера будет объясняться кинетикой адсорбции. Вильямсон с соавт. установили, что способ связывания ристоцетина А и ванкомицина с ди- и трипептидами одинаков, но скорость процесса существенно различается [254]. Благодаря более гибкой структуре активного центра ванкомицина он связывает и высвобождает пептиды, оканчивающиеся на D-аминокислоты у C-конца в 100-10000 раз быстрее, чем ристоцетин А. Соответствующие колонки Chirobiotic V и Chirobiotic R были выбраны для исследования. В качестве модельных дипептидов использовали LL- и DD-Leu-Leu (удерживаемые маркеры) и Gly-Gly (слабо удерживаемый маркер).

Результаты измерений приведены на рис. 5.3. Нижние индексы « μ » и «0,5» обозначают значения h , рассчитанные через моменты пика или ширину на половине высоты соответственно.

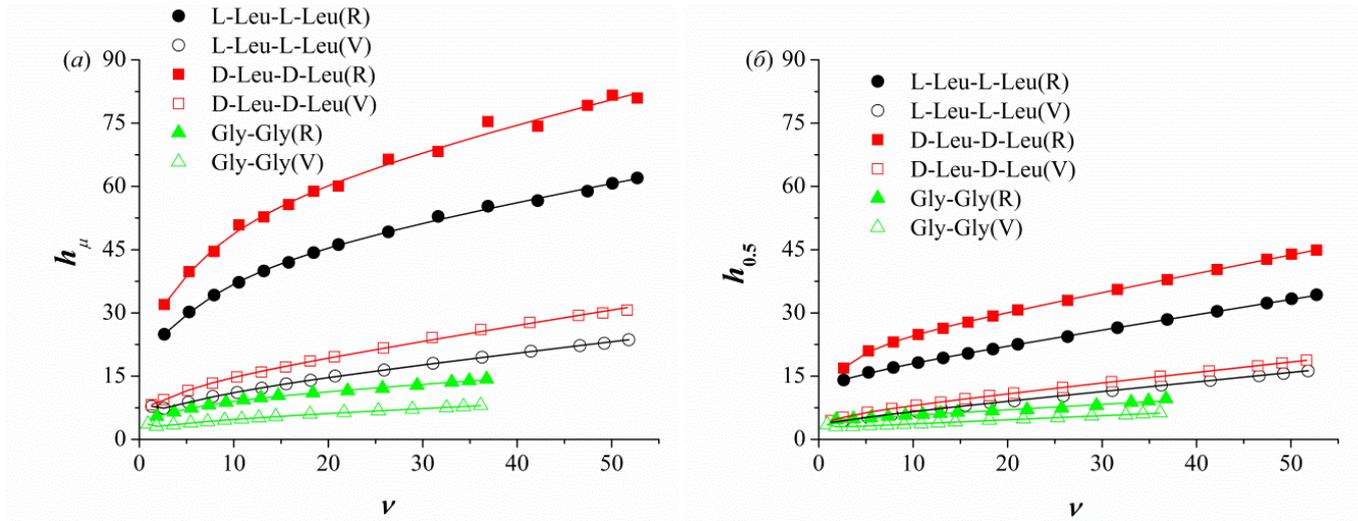


Рис. 5.3. Зависимости приведенной ВЭТТ, рассчитанной через моменты пика (а) и ширину на половине высоты (б) в зависимости от приведенной скорости потока для L- Leu-L-Leu, D-Leu-D-Leu и Gly-Gly на ХНФ Chirobiotic R и Chirobiotic V. Точки – экспериментальные данные, линии – аппроксимация уравнением ван Деемтера-Гиддингса. ПФ: MeOH–H₂O (10:90, об/об), CH₃COONH₄ (0.0002 моль/л)

Кривые h_μ расположены выше кривых $h_{0.5}$. Это связано с тем, что $h_{0.5}$ основан на модели симметричного гауссова пика, тогда как реальные пики ассиметричны и характеризуются «хвостом», который тем более выражен, чем сильнее удерживается элюируемое вещество (рис. 5.4). Очевидно, что в величине $h_{0.5}$ занижен вклад источников ассиметричного размывания хроматографических полос, особенно тех, которые приводят к сильному размыванию пиков, таких как внутривещная диффузия и медленная кинетика адсорбции.

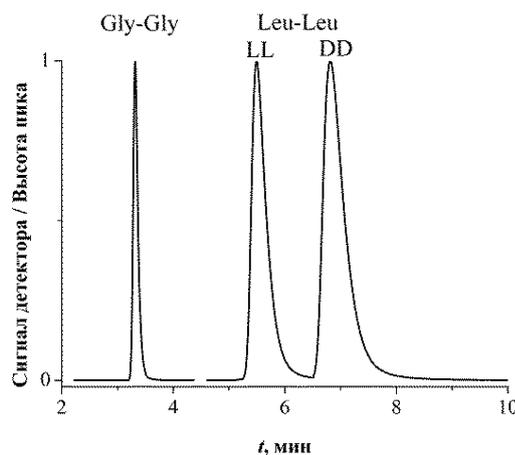


Рис. 5.4. Хроматограммы Gly-Gly и энантимеров Leu-Leu, демонстрирующие прогрессирующее ассиметричное размывание пика по мере увеличения удерживания на ХНФ Chirobiotic R при скорости потока 1 мл/мин. Для удобства хроматограммы представлены в нормализованной шкале сигнала

К появлению хвоста пика могут приводить несколько факторов. Их подразделяют на термодинамические (нелинейность изотермы адсорбции [300]) и кинетические. Поскольку в экспериментах использовались небольшие количества адсорбата, которые соответствовали линейной области изотермы адсорбции, то термодинамический фактор можно исключить. Одной из вероятных кинетических причин размывания хвоста пика называют наличие в колонке небольшой доли высокоаффинных адсорбционных центров, характеризующихся медленной кинетикой адсорбции/десорбции [272]. Действительно, поверхность ХНФ обычно неоднородна, и на ней могут присутствовать участки быстрой и медленной адсорбции [55; 61]. Однако Ямадзаки [301] показал, что гетерогенная кинетика адсорбции приводит к ассиметричным пикам, но не должна приводить к отклонению от классической формы кривых ван Деемтера. То есть центры медленной адсорбции с высоким сродством к субстрату могут объяснить хвост пика, но не могут объяснить необычное поведение зависимостей ван Деемтера, если только они не влияют на другие термы уравнения (1.48), кроме коэффициента C_{ads} .

Кривые $h_{\mu} - \nu$ для энантиомеров Leu-Leu на колонке Chirobiotic V лежат заметно ниже соответствующих кривых на колонке Chirobiotic R (рис. 5.3а). Хотя сохраняется выпуклая вверх форма, но она менее выражена, чем на ристоцетиновой колонке. Для слабо удерживаемого Gly-Gly кривая, полученная на Chirobiotic R, сохраняет выпуклую вверх форму, в то время как кривая, измеренная на Chirobiotic V, имеет обычную форму и при низких скоростях потока даже наблюдается начало восходящей ветви, характерной для классического графика ван Деемтера. Интересно, что выпуклость плохо различима для кривых $h_{0.5}$ ван Деемтера, измеренных на колонке с привитым ристоцетином (для всех веществ кроме D-Leu-D-Leu) и практически отсутствует на колонке Chirobiotic V (рис. 5.3б). Можно сделать вывод, что выпуклые вверх кривые ван Деемтера обусловлены факторами, вызывающими асимметрию пиков. А поскольку из этих факторов только кинетика связывания отличается на колонках Chirobiotic R и Chirobiotic V, последнее можно рассматривать как основную причину наблюдаемых необычных форм кривых ван Деемтера.

Коэффициенты B , λ_3 и ω_3 , измеренные на Chirobiotic R, больше, чем измеренные на Chirobiotic V (табл. 5.3). Это касается даже Gly-Gly, хотя на обеих колонках он почти не адсорбируется. Такое расхождение нельзя объяснить разным удерживанием дипептидов. Значения B с поправкой на удерживание, $B/(2 \cdot (1 + k_1)) = D_{eff}/D_m$, выше для Chirobiotic R, чем для Chirobiotic V. Параметры трансколоночной дисперсии λ_3 и ω_3 могут зависеть от удерживания, однако теоретически трансколоночная часть ВЭТТ должна уменьшаться, а не увеличиваться с коэффициентом удерживания [302]. Таким образом, различие в некинетических термах ВЭТТ, т.е. $A(\nu) + B/\nu$ следует приписать различиям в кинетике связывания дипептидов с ристоцетином

А и ванкомицином, так как физико-химические свойства, определяющие продольную и вихревую диффузию на этих двух колонках одинаковы.

Таблица 5.3

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	$C_s + C_{ads}$	D_{eff}/D_m	$(k_{ads})_{min}, \text{с}^{-1}$	$(k_{ads})_{max}, \text{с}^{-1}$
Chirobiotic V								
L-Leu-L-Leu	1.57	5.1	5.1	2.7	0.245	0.82	40	65
D-Leu-D-Leu	1.86	4.5	6.8	4.6	0.322	0.61	35	51
Gly-Gly	0.49	2.3	2.0	1.4	0.095	0.56	36	56
Chirobiotic R								
L-Leu-L-Leu	1.91	20	26	9	0.275	2.86	44	76
D-Leu-D-Leu	2.77	23	30	13	0.500	2.51	31	42
Gly-Gly	0.46	3.1	4.8	2.9	0.119	0.83	28	40

Следует отметить, что кинетический терм $(C_s + C_{ads})v$, хотя и несколько отличается для исследуемых колонок, не может объяснить расхождение соответствующих кривых ван Деемтера. Смещение между двумя кривыми для одного и того же анализа наблюдается при низких скоростях потока, когда кинетический терм имеет незначительное влияние. Полученные результаты можно объяснить следующим образом. Потеря эффективности колонки Chirobiotic R происходит либо из-за вихревой диффузии (терм A) или диффузии в твердой фазе (терм B) вследствие интерференции кинетики образования адсорбционного комплекса и процессов массопереноса, ответственных за термы A и B . Возможный механизм указанного явления раскрыли Фелетти с соавт. [139], которые посредством прямых измерений D_{eff} продемонстрировали, что, если более сильно удерживаемый энантиомер пары демонстрирует необычную форму кривой ван Деемтера, миграция этого энантиомера через неподвижную фазу затруднена по сравнению с более слабо удерживаемым энантиомером. Это должно приводить к накоплению энантиомера на внешней поверхности частицы неподвижной фазы. Как следствие этого, локальная концентрация анализа может выйти за пределы линейного диапазона изотермы адсорбции, нарушая тем самым одно из предположений, лежащих в основе уравнения ван Деемтера.

Кинетический коэффициент $C = C_s + C_{ads}$ объединяет эффекты внутрипоровой диффузии и кинетики адсорбции. Первый вклад для одного и того же растворенного вещества в двух

колонках должен быть одинаковым, поскольку насадочные материалы были приготовлены с использованием одного и того же носителя (силикагеля), и диаметры пор были одинаковыми. Следовательно, наблюдаемые различия в коэффициентах C объясняются кинетикой адсорбции. Можно видеть (табл. 5.3), что кинетические коэффициенты, полученные на колонке Chirobiotic R, больше, чем на колонке Chirobiotic V. Поскольку C_{ads} обратно пропорционален константе скорости адсорбции, эти результаты ожидаемо демонстрируют более медленную кинетику адсорбции дипептидов на ХНФ на основе ристоцетина А. Наибольшее расхождение наблюдается для D-Leu-D-Leu. Этот энантиомер адсорбируется медленнее, чем его LL-антипод на обеих колонках, но его взаимодействие с ристоцетином А особенно стерически затруднено из-за жесткой структуры селектора [254]. Поэтому ему требуется больше времени для встраивания в хиральную полость селектора. Более гибкая структура хирального кармана ванкомицина [254] позволяет адсорбционному комплексу с DD-энантиомером формироваться быстрее. Комплементарность L-Leu-L-Leu с хиральной полостью у обоих антибиотиков не идеальна; следовательно, кинетика связывания относительно быстрая на обеих ХНФ, и разница между коэффициентами C этого энантиомера для этих двух колонок невелика.

Слабо удерживаемый Gly-Gly также характеризуется различными значениями кинетического терма C , что указывает на то, что кинетика адсорбции для этого дипептида не является бесконечно быстрой ($C_{ads} \neq 0$). Его интервальные оценки константы скорости адсорбции по порядку величины совпадают с таковыми для энантиомеров Leu-Leu. Вильямсон с соавт. показали, что даже небольшие молекулы, имеющие группу $-COOH$, связываются с антибиотиками ванкомицинового ряда, проникая в карман, образованный основной цепью антибиотика, содержащей три соседствующих амидных группы, которые образуют водородные связи с карбоксилат-анионом [254]. Следовательно, молекула Gly-Gly должна преодолеть кинетический барьер, отличный от ванкомицина и ристоцетина А, чтобы внедрить свою карбоксилатную группу внутрь связывающего кармана, несмотря на то что образующаяся связь является слабой.

5.2.3. Leu-Leu, Leu-Phe и Gly-Gly на колонке AK57

Динамика адсорбции на ХНФ с привитыми аддуктами хинина/хинидина и дипептидов ранее не исследовалась. В представленной работе для изучения этого класса адсорбентов была выбрана ХНФ AK57 с селектором QN-L-Ala-L-Leu, обеспечивающая достаточную энантиоселективность по отношению к энантиомерам Leu-Leu и Leu-Phe, выбранным в качестве тестовых дипептидов. Так же был изучен Gly-Gly как пример слабо удерживаемого аналита. Результаты измерений в виде кривых ван Деемтера представлены на рис. 5.5. Как видно, зависимости $h(v)$ для всех дипептидов (кроме Gly-Gly) имеют обычную форму и только

для Gly-Gly наблюдаются выпуклые вверх графики. На антибиотиковых ХНФ наблюдалась противоположная картина: для Gly-Gly выпуклость была менее выражена.

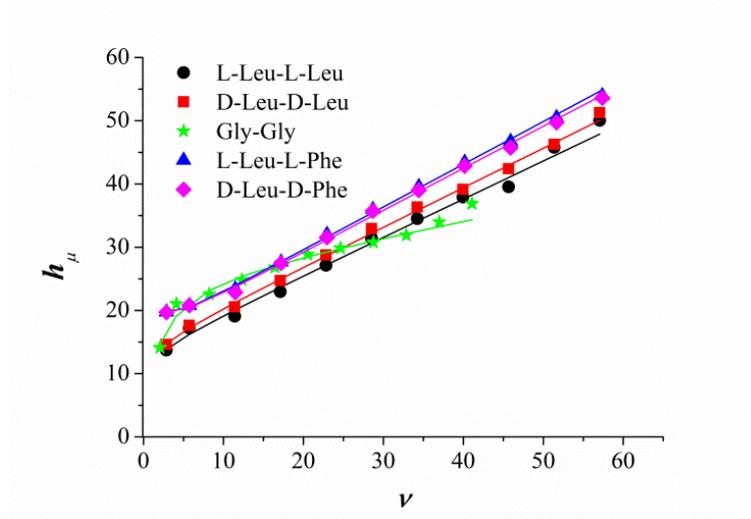


Рис. 5.5. Зависимости приведенной ВЭТТ от приведенной скорости потока для Gly-Gly и энантиомерных пар LL/DD Leu-Leu и Leu-Phe на ХНФ АК57. ПФ: MeOH–H₂O (40:60, об/об), CH₃COONH₄ (0.0002 M)

Так же обращает на себя внимание тот факт, что кривые ван Деемтера на рис. 5.5 расположены близко друг к другу, а кривые, относящиеся к энантиомерам, практически совпадают. О совпадении кривых ван Деемтера энантиомеров аминокислот на цвиттерионной колонке ZWIX(+) сообщали Линднер с сотр. [225]. На антибиотиковых колонках наблюдались значительные различия как между энантиомерами, так и между дипептидами. Значения h изменяются от ~15 при низкой скорости потока до ~50 при высокой скорости потока. По порядку величины это соответствует эффективности колонки Chirobiotic R по отношению к слабоудерживаемым дипептидам, но выше таковой Chirobiotic R по отношению к более прочно удерживаемым дипептидам, для которых на последней колонке $h > 50$ (эффективность колонки тем выше, чем меньше ВЭТТ). Стоит, однако, отметить, что размер частиц АК57 (3 мкм) меньше такового для ХНФ Chirobiotic (5 мкм), поэтому некоторое повышение эффективности ожидалось, но, как отмечалось выше, оно наблюдается только для относительно прочно удерживаемых аналитов. Более того, для слабо удерживаемых аналитов при высокой скорости потока значения приведенной ВЭТТ колонки АК57 превышают этот показатель антибиотиковых колонок. Это связано с тем, что наклон кривых ван Деемтера для АК57 выше, чем для Chirobiotic R и V.

Сравнивая кинетику массопереноса на цвиттерионной неподвижной фазе АК57 и на антибиотиковых ХНФ, следует учитывать, что указанные материалы отличаются размером пор и внутренней пористостью. Эти характеристики у АК57 (поры 14 нм, $\varepsilon_i = 0.57$) выше, чем у

адсорбентов марки Chirobiotic (поры 10 нм, $\varepsilon_i = 0.35$). Можно было бы предположить, что более высокая эффективность первого адсорбента обусловлена лучшими условиями для внутрипоровой диффузии. Это обстоятельство, однако, не играет значимой роли. В противном случае хроматографическая эффективность адсорбентов Chirobiotic R и V была бы близкой, поскольку у них пористость и размеры пор одинаковы, но, как показано, в предыдущем разделе ВЭТТ на этих ХНФ отличаются более чем в 2 раза.

В таблице 5.4 представлены параметры уравнения ван Деемтера-Гиддингса. Показатели массопереноса, относящиеся к трансколоночной вихревой диффузии (λ_3, ω_3) на данной колонке, как и на антибиотиковых колонках, имеют высокие значения и обуславливают характерную для ХНФ низкую начальную (т.е. при $v \approx 0$) эффективность колонки [131; 286]. Коэффициенты B для Gly-Gly и D-Leu-D-Leu близки к нулю, что является кажущимся результатом (B не может быть меньше $2(\gamma_e + F_e\gamma_i\varepsilon_i) \approx 2$) и связано со взаимной корреляцией подгоночных параметров термов аксиальной дисперсии (B, λ_3, ω_3). У L-Leu-L-Leu, который удерживается сильнее, чем его DD-энантиомер, B имеет близкое к физически обоснованному значение, и для сильно удерживаемых энантиомеров Leu-Phe величины B значительно больше 2.

Таблица 5.4

Константы адсорбционного равновесия и коэффициенты уравнения ван Деемтера-Гиддингса на ХНФ АК57 для Gly-Gly и энантиомерных пар LL/DD Leu-Leu и Leu-Phe

Дипептид	K , см ³ /см ³	B	λ_3	ω_3	$C_s + C_{ads}$	D_{eff}/D_m	$(k_{ads})_{min}$, с ⁻¹	$(k_{ads})_{max}$, с ⁻¹
L-Leu-L-Leu	1.71	1.5	6.5	188	0.50	0.24	29	31
D-Leu-D-Leu	1.33	0.03	7.1	205	0.52	0.01	20	21
L-Leu-L-Phe	4.59	12.1	6.9	58	0.56	1.13	68	73
D-Leu-D-Phe	2.15	9.2	7.5	71	0.55	1.31	34	36
Gly-Gly	0.20	0.0	13.2	20	0.21	0.00	3	3

Константы скорости адсорбции дипептидов на АК57 ниже таковых для неподвижных фаз марки Chirobiotic, но имеют один порядок величины (за исключением Gly-Gly) и близки значениям, известным для других ХНФ щеточного типа [132]. Линднер и др. объясняли *относительно* высокое кинетическое сопротивление массопереносу для ионных соединений на хининовых цвиттерионных адсорбентах сильным ион-ионным взаимодействием между противоположно заряженными группами адсорбата и селектора [225]. Авторы не пояснили, о какой из стадий кинетического процесса идет речь, но очевидно, имелась в виду стадия

десорбции, потому что сильное кулоновское притяжение затрудняет десорбцию и способствует адсорбции. Заметим, что этот механизм не может иметь места для пептидов на антибиотиковых селекторах, поскольку в этом случае связывание обеспечивается не за счет образования солевых мостиков, как на производных хининовых алкалоидов [60; 219; 243], а за счет образования водородных связей между карбоксильной группой адсорбата и амидными группами хирального селектора (см. раздел 1.4.1).

Гипотеза о значимой роли десорбционного замедления объясняет слабые различия в эффективности массопереноса исследованных веществ. Действительно, константы скорости десорбции ($k_{des} = k_{ads}/K$) мало отличаются друг от друга (табл. 5.5). Для антибиотиковых ХНФ

Таблица 5.5
Оценки константы скорости десорбции на ХНФ АК57

Дипептид	$(k_{des})_{min},$ с ⁻¹	$(k_{des})_{max},$ с ⁻¹
L-Leu-L-Leu	17	18
D-Leu-D-Leu	15	16
L-Leu-L-Phe	15	16
D-Leu-D-Phe	16	17
Gly-Gly	15	15

различие констант скорости десорбции дипептидов заметно больше. Например, отношение $(k_{des})_{max}$ для пары энантиомеров лейциллейцина составляет 2.7 на Chirobiotic R и 1.5 на Chirobiotic V. При этом константы скорости адсорбции на антибиотиковых фазах меньше для прочнее удерживаемого энантиомера, а на АК57 – для слабее удерживаемого энантиомера (на обеих ХНФ это DD-энантиомер). Все вышесказанное свидетельствует о том, что влияние процессов адсорбции и десорбции на общее торможение массопереноса на этих двух типах ХНФ разное.

Вклад полного адсорбционного процесса (включающего адсорбцию и десорбцию) в общее сопротивление массопереносу описывается в рамках принятой GR-модели одним коэффициентом C_{ads} и совмещен с вкладом внутриводной диффузии C_s , поскольку оба вклада линейно зависят от скорости потока. Этот суммарный вклад монотонно возрастает от ~10 % при $v = 3$ до ~70 % при $v = 59$ для обоих энантиомеров Leu-Leu и Leu-Phe, тогда как вклады продольной (B/v) и вихревой диффузии соответственно уменьшаются, причем вклад термина B/v быстро падает почти до нуля (рис. 5.6). В случае слабо удерживаемого Gly-Gly, кинетический вклад увеличивается только до 28%. Вклад продольной диффузии формально равен нулю, но, очевидно, что он смешан с вкладом вихревой диффузии, который уменьшается от 97 до 72% (рис. 5.7). Именно высокой долей вихревой диффузии, зависимость которой от скорости потока описывается выпуклой функцией, объясняется наблюдаемый на рис. 5.5 вид кривой ван Деемтера для Gly-Gly.

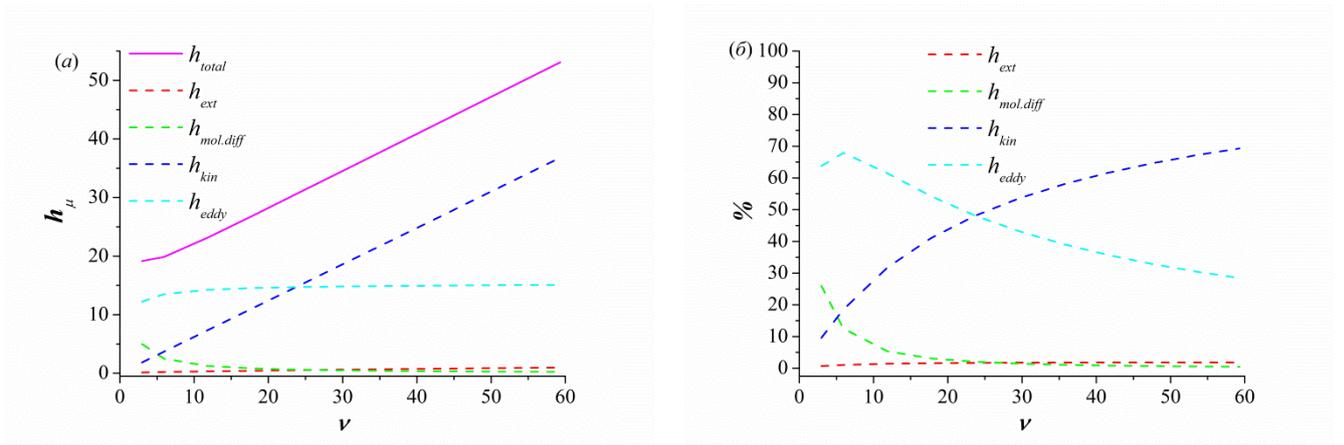


Рис. 5.6. Вклады в абсолютных (а) и относительных (б) величинах кинетики массопереноса (h_{kin}), внешней диффузии (h_{ext}), вихревой диффузии (h_{eddy}) и молекулярной диффузии ($h_{mol.diff}$) в приведенную ВЭТТ (h_{total}) для L-Leu-L-Phe на ХНФ АК57

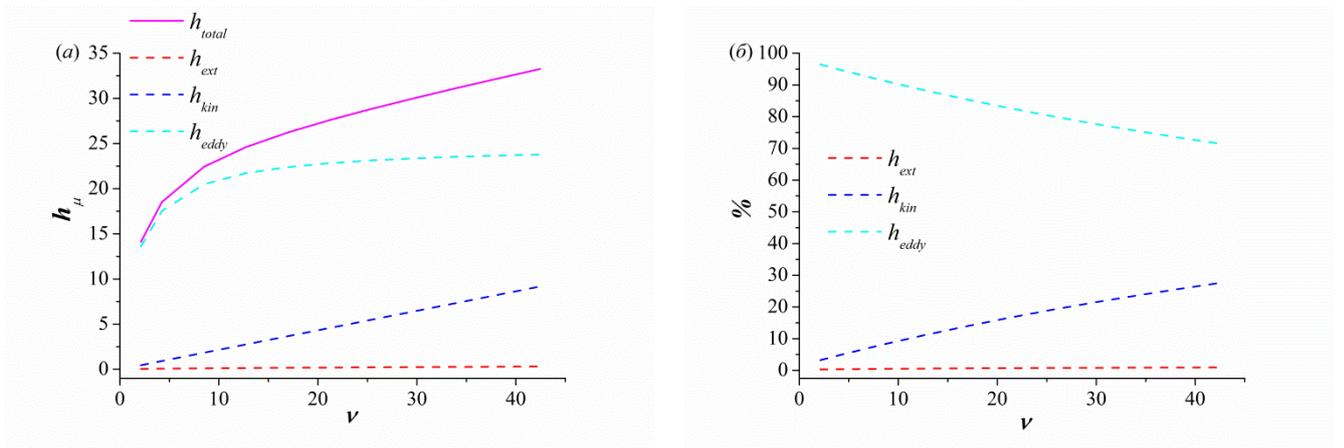


Рис. 5.7. Вклады в абсолютных (а) и относительных (б) величинах кинетики массопереноса (h_{kin}), внешней диффузии (h_{ext}), вихревой диффузии (h_{eddy}) и молекулярной диффузии ($h_{mol.diff}$) в приведенную ВЭТТ (h_{total}) для Gly-Gly на ХНФ АК57

При некоторой оптимальной скорости потока (ν_{opt}), при которой вклады кинетического сопротивления массопереносу и продольной диффузии малы, размывание хроматографических пиков обеспечивается процессами вихревой диффузии. В описанных экспериментах минимальная исследованная скорость потока близка оптимальной величине (ν_{min} мала настолько, что даже если ν_{opt} не совпадает с ν_{min} , можем считать, что $\nu_{opt} \approx \nu_{min}$, на основании того, что $0 < \nu_{opt} \leq \nu_{min}$). Считается, что предел величины h при такой скорости потока на ахиральных колонках равен 1.5 [303]. Графики на рис. 5.5 показывают, что минимальные значения приведенной ВЭТТ в несколько раз превышают эту величину, причем для сильнее удерживаемых LL/DD лейцилфенилаланинов h_{min} на треть больше, чем для слабее удерживаемых лейциллейцинов. Для колонки Chirobiotic R (в случае Leu-Leu) это превышение

еще больше. Однако для слабо удерживаемого Gly-Gly величина h_{min} на Chirobiotic R сопоставима с таковой на АК57, а на Chirobiotic V этот показатель в 4.6 раз меньше, чем на АК57. Таким образом, исследованные хиральные колонки характеризуются размытием пика большим, чем типовые ахиральные колонки, и это превышение *формально* ассоциировано с фактором вихревой диффузии. Это известный результат в хиральной хроматографии [131; 139; 286]. Непонятна была причина появления этого эффекта. Сравнение динамического поведения рассмотренных колонок показывает, что причина заключается в медленной (относительно типичных ахиральных колонок) кинетике связывания адсорбата хиральным селектором, причем замедленной может быть как стадия адсорбции, так и стадия десорбции. Этот кинетический эффект проявляется не непосредственно, через коэффициент C_{ads} , а опосредованно, через влияние на интенсивность вихревой или продольной диффузии. В последнем случае это влияние может осуществляться через величину D_{eff} (см. уравнение (1.53)), в состав которой входит коэффициент поверхностной диффузии, величина которого зависит от энергии адсорбционной связи [304]. В случае вихревой диффузии ее вклад в ВЭТТ может быть сложным образом связан с характеристическим временем и частотой актов адсорбции, как было предположено Гритти на основании стохастической теории эффективности колонок [305]. Этот же автор указывал на возможность связи между скоростью массопередачи и величиной трансколоночного вклада в h_{eddy} (см. раздел 1.3.1) в рамках классической теории эффективности колонок [294].

Если мы принимаем, что величина h_{eddy} зависит от кинетики адсорбции, необходимо объяснить, почему при сопоставимых величинах коэффициентов C у АК57 и Chirobiotic R (у АК57 они даже выше) вклад вихревой диффузии в размытие пиков на АК57 заметно ниже. По-видимому, важную роль в этом играют размер пор и внутренняя пористость [137], которые больше у АК57. Облегчение диффузии внутрь пор способствует релаксации концентрационных градиентов, обуславливающих вихревую диффузию.

5.3. Численное моделирование

Вышеприведенные результаты показывают, что наблюдаемое динамическое поведение дипептидов связано с кинетикой адсорбции. Однако само по себе замедление адсорбционной стадии не должно искажать вид графика ван Деемтера, но должно вести к изменению наклона восходящей ветви этого графика (увеличение коэффициента C_{ads}) без изменения ее асимптотически линейного характера. Можно предположить, что появление выпуклых вверх кривых связано с нелинейной кинетикой адсорбции. Действительно, искривление восходящей Cv -ветви возможно, если коэффициент $C = C_s + C_{ads}$ станет функцией v . Выяснить, будет ли такой эффект иметь место можно с помощью решения обратной задачи хроматографии. Для

этого необходимо оценить качество аппроксимации экспериментальных кривых элюирования, полученных при разных скоростях потока, моделями хроматографии, включающими нелинейную кинетику адсорбции. Если численное решение будет (1) описывать экспериментальные профили пиков и (2) кинетические параметры адсорбции будут инвариантны относительно изменения скорости потока, то гипотезу о влиянии нелинейной кинетики адсорбции на форму кривой ван Деемтера можно считать обоснованной.

Вычисления выполнялись для экспериментальных хроматограмм Gly-L/D-Leu и L-Leu-Gly на колонке Chirobiotic R, полученных в ходе измерения кривых ван Деемтера, описанных в разделе 5.2.1. В качестве модели хроматографии была выбрана наиболее общая GR модель (уравнения (1.59) – (1.60)). Кинетическое уравнение этой модели (1.61), предполагающее линейную кинетику адсорбции последовательно заменяли уравнениями двухцентрковой (2.18) – (2.20) или двухстадийной (2.23) – (2.25) моделей адсорбции. Функцию $D_{ax}(u)$ в уравнении (1.59) описывали корреляцией Ганна (2.28). В предварительных расчетах также использовали линейную зависимость D_{ax} от u (2.27), но результаты не отличались принципиально от полученных с формулой Ганна.

Пример аппроксимации экспериментальных данных результатами расчетов с применением указанных кинетических моделей приведен на рис. 5.8.

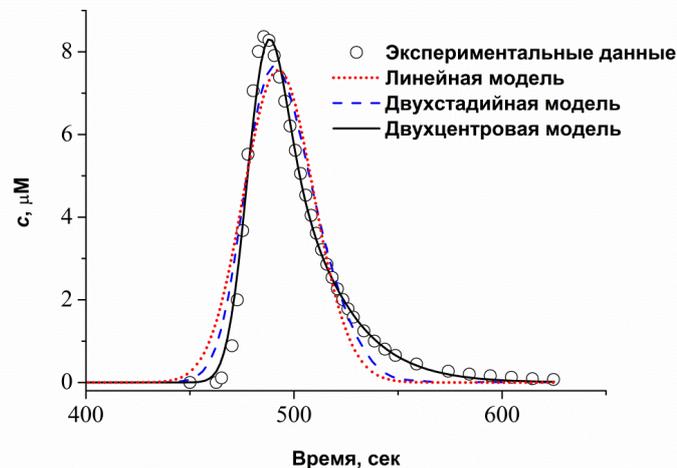


Рис. 5.8. Хроматограммы Gly-D-Leu, полученные экспериментально (кружки) и рассчитанные теоретически (линии). Скорость ПФ 1 мл/мин. Применяемые кинетические модели адсорбции: линейная (красная пунктирная линия), двухстадийная (синяя пунктирная линия), двухцентрковая (черная сплошная линия)

Как видно, линейная и двухстадийная модели не могут описать экспериментальную хроматограмму. В последнем случае использовались разные начальные значения подгоночных кинетических параметров, но алгоритм оптимизации неизменно приводил к быстрой первой

стадии и медленной второй стадии. Это указывает на то, что медленная кинетика адсорбции/десорбции на однородной поверхности адсорбента сама по себе не может объяснить хвост пика даже для последовательного процесса связывания. Напротив, гетерогенная двухцентровая модель может описать хвост пика. Форнштедт и др. [272] также отмечали, что двухцентровая модель может объяснить появление размытого хвоста. Тем не менее, данная модель не удовлетворяет второму условию – инвариантности параметров модели относительно скорости потока. В таблице 5.6 приведены значения этих параметров для различных расходов ПФ.

Таблица 5.6

Параметры двухцентровой модели

v	5	12.5	25	50
F_v , мл/мин	0.2	0.5	1	2
Gly-L-Leu				
K_I , см ³ /см ³	1.004	1.025	1.049	1.099
K_{II} , см ³ /см ³	0.080	0.075	0.071	0.055
$k_{ads,I}^a$, 1/сек	65	65	65	65
$k_{ads,II}$, 1/сек	0.0053	0.0096	0.0107	0.0094
ОСО ^b , %	3.4	2.3	1.7	1.5
Gly-D-Leu				
K_I , см ³ /см ³	3.402	3.418	3.444	3.444
K_{II} , см ³ /см ³	0.183	0.177	0.165	0.124
$k_{ads,I}^a$, 1/сек	300	300	300	300
$k_{ads,II}$, 1/сек	0.0038	0.0077	0.0119	0.0136
ОСО ^b , %	1.9	2.0	2.8	3.5
L-Leu-Gly				
K_I , см ³ /см ³	0.877	0.891	0.940	0.922
K_{II} , см ³ /см ³	0.103	0.086	0.070	0.125
$k_{ads,I}^a$, 1/сек	170	170	170	170
$k_{ads,II}$, 1/сек	0.0382	0.0742	0.097	0.974
ОСО ^b , %	2.6	2.3	2.5	2.7

^aПараметр фиксировался на заданном значении при всех скоростях потока. ^bОСО – относительное стандартное отклонение между подгоночным и экспериментальным профилями пиков.

В этих расчетах мы сохраняли скорость адсорбции постоянной для центров быстрой адсорбции ($k_{ads,I}$); регулируемые параметры были K_I , K_{II} и $k_{ads,II}$. Это было сделано потому что в ходе предварительного моделирования было обнаружено, что параметр $k_{ads,I}$ колеблется вокруг некоторого среднего значения при изменении v . При этом коэффициент $k_{ads,II}$ всегда демонстрировал тенденцию к увеличению с v независимо от начального значения этого подгоночного параметра (вычисления выполнялись с разными начальными значениями подгоночных параметров для проверки сходимости решения).

Как видно, константа скорости для центров медленной адсорбции ($k_{ads,II}$) увеличивается с ростом v . Соответствующая константа адсорбционного равновесия K_{II} также изменяется, но более медленно по отношению к $k_{ads,II}$. Оба коэффициента не могут быть функциями скорости потока. Их зависимость от этого параметра свидетельствует о неадекватности применяемой динамической модели к реальным процессам массообмена в колонке. Другими словами, нелинейная кинетика адсорбции в рамках принятых модельных допущений не может объяснить необычное поведение кривых ван Деемтера.

Таким образом, ни одна из рассмотренных кинетических моделей не объясняет наблюдаемые экспериментальные результаты. Можно предположить, что более сложные кинетические модели могли бы описать полученные данные, однако более вероятно в связи с недавними исследованиями [294; 302], что аксиальные и радиальные неоднородности в насадочном слое, которыми пренебрегают в общей (GR) модели жидкостной хроматографии, приводят к сложной взаимосвязи между кинетикой адсорбции и вихревой диффузией (частью аксиальной дисперсии), что в конечном итоге приводит к наблюдаемым кривым ван Деемтера. В классической теории ван Деемтера-Клинкенберга-Зюйдервега эти процессы массообмена рассматриваются как независимые.

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 цвиттерионных 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IUPAC-IUB: Nomenclature of α -amino acids // *Biochemistry*, 1975. Vol. 14. P. 449–462.
2. Пастер Л. Избранные труды. [ред.] Имшенецкий А.А. М.: Академии наук СССР, 1960. Т. 1. 1011 с.
3. Gal J. Chiral drugs from a historical point of view. [eds.] Francotte E., Lindner W. *Chirality in drug research*. Weinheim: Wiley–VCH, 2006. P. 3–25.
4. Cushny A.R. *Biological relations of optically isomeric substances*. Baltimor: The Williams & Wilkins comp., 1926. 80 p.
5. Orzylowski M., Fujiwara E., Mousseau D.D., Baker G.B. An overview of the involvement of D-serine in cognitive impairment in normal aging and dementia // *Front. Psychiatry*, 2021. Vol. 12. N 754032.
6. Genchi G. An overview on D-amino acids // *Amino Acids*, 2017. Vol. 49. P. 1521–1533.
7. Francotte E.R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers // *J. Chromatogr. A*, 2001. Vol. 906. P. 379–397.
8. Berkecz R., Tanács D., Péter A., Ilisz I. Enantioselective liquid chromatographic separations using macrocyclic glycopeptide-based chiral selectors // *Molecules*, 2021. Vol. 26. N 3380.
9. Lammerhofer M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 2010. Vol. 1217. P. 814–856.
10. Easson L.H., Stedman E. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. Molecular dissymmetry and physiological activity // *Biochem. J.*, 1933. Vol. 27. P. 1257–1266.
11. Ogston A.G. Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements // *Nature*, 1948. Vol. 963. P. 963.
12. Dalgliesh C.E. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms // *J. Chem. Soc.*, 1952. P. 3940–3942.
13. Wilcox P.E., Heidelberger C., Potter V.R. Chemical preparation of asymmetrically labeled citric acid¹ // *J. Am. Chem. Soc.*, 1950. Vol. 72. P. 5019–5024.
14. Mesecar A.D., Koshland Jr D.E. A new model for protein stereospecificity // *Nature*, 2000. Vol. 403. P. 614–615.

15. Mesecar A.D., Koshland Jr D.E. Sites of binding and orientation in a four-location model for protein stereospecificity // *IUBMB Life*, 2000. Vol. 49. P. 457–466.
16. Bentley R. Diastereoisomerism, contact points, and chiral selectivity: a four-site saga // *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003. Vol. 414. P. 1–12.
17. Salem L., Chapuisat X., Segal G., Hiberty C.P., Minot C., Leforestier C., Sautet P. Chirality forces // *J. Am. Chem. Soc.*, 1987. Vol. 109. P. 2887–2894.
18. Topiol S., Sabio M. Interactions between eight centers are required for chiral recognition // *J. Am. Chem. Soc.*, 1989. Vol. 111. P. 4109–4110.
19. Topiol S. A general criterion for molecular recognition: implications for chiral interactions // *Chirality*, 1989. Vol. 1. P. 69–79.
20. Jozwiak K., Moaddel R., Ravichandran S., Plazinska A., Kozak J., Patel S., Yamaguchi R., Wainer I.W. Exploring enantiospecific ligand–protein interactions using cellular membrane affinity chromatography: Chiral recognition as a dynamic process // *J. Chromatogr. B*, 2008. Vol. 875. P. 200–207.
21. Pirkle W.H., Pochapsky T.C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers // *Chem. Rev.*, 1989. Vol. 89. P. 347–362.
22. Davankov V.A. The nature of chiral recognition: is it a three-point interaction? // *Chirality*, 1997. Vol. 9. P. 99–102.
23. Davankov V.A., Kurganov A.A. The role of achiral sorbent matrix in chiral recognition of amino acid enantiomers in ligand-exchange chromatography // *Chromatographia*, 1983. Vol. 17. P. 686–690.
24. Сычев К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М.: Техносфера, 2010. 272 с.
25. Киселев А.В. Межмолекулярные взаимодействия в адсорбции и хроматографии. М.: Высш. шк., 1986. 360 с.
26. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Зинатне, 1988. 390 с.
27. Snyder L.R. Principles of adsorption chromatography. New York: Marcel Dekker, 1968. P. 185–239.
28. Soczewinski E. Solvent composition effects in thin-layer chromatography systems of the type silica gel-electron donor solvent // *Anal. Chem.*, 1969. Vol. 41. P. 179–182.

29. Snyder L.R., Poppe H. Mechanism of solute retention in liquid–solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation: Competition versus “sorption” // *J. Chromatogr. A*, 1980. Vol. 184. P. 363–413.
30. Gyimesi-Forrás K., Maier N.M., Kokosi J., Gergely A., Lindner W. Enantiomer separation of imidazo–quinazoline–dione derivatives on quinine carbamate-based chiral stationary phase in normal phase mode // *Chirality*, 2009. Vol. 21. P. 199–207.
31. Ланин С.Н., Никитин Ю.С. Прогнозирование удерживания в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Межмолекулярные взаимодействия в подвижной фазе // *Журн. аналит. химии*, 1991. Т. 46. №. 10. С. 1971–1980.
32. Tsui H.W., Kuo C.H., Huang Y.C. Elucidation of retention behaviors in reversed–phase liquid chromatography as a function of mobile phase composition // *J. Chromatogr. A*, 2019. Vol. 1595. P. 127–135.
33. Степанова М.В., Аснин Л.Д., Ботева А.А. Закономерности энантиоселективного удерживания хиральных оксазолопирролохинолонов на неподвижной фазе с привитым антибиотиком ристоцетином А из водно-метанольных растворов // *Журн. физ. хим.*, 2023. Т. 97, № 2. С. 293–300.
34. Lochmuller C.H., Wilder D.R. The sorption behavior of alkyl bonded phases in reverse–phase, high performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. Sci.*, 1979. Vol. 17. P. 574–579.
35. Martire D.E., Boehm R.E. Unified theory of retention and selectivity in liquid chromatography. 2. Reversed-phase liquid chromatography with chemically bonded phases // *J. Phys. Chem.*, 1983. Vol. 87. P. 1045–1062.
36. Dill K.A. mechanism of solute retention in reversed-phase liquid chromatography // *J. Phys. Chem.* 1987. Vol. 91. P. 1980–1988.
37. Bohmer M.R., Tijssen R., Koopal L.K. Partitioning and adsorption of chain molecules at chemically modified surfaces in reversed phase liquid chromatography // *J. Phys. Chem.* Vol. 95. P. 6285–6297.
38. Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R. Systematic approach to optimizing resolution in reversed-phase liquid chromatography, with emphasis on the role of temperature // *J. Chromatogr. A*, 1979. Vol. 185. P. 153–177.
39. Sinanoglu O. Solvent effects on molecular associations. [eds.] Pullman B. *Molecular associations in biology*. New York: Elsevier, 1968. 571 p.

40. Horvath C., Melander W., Molnar I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 1976. Vol. 125. P. 129–156.
41. Melander W.R., Corradini D., Horváth C. Salt-mediated retention of proteins in hydrophobic-interaction chromatography: application of solvophobic theory // *J. Chromatogr. A*, 1984. Vol. 317. P. 67–85.
42. Vailaya A. Fundamentals of reversed phase chromatography: Thermodynamic and exothermodynamic treatment // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2005. Vol. 28. P. 965–1054.
43. Moldoveanu S.C., Caiali E., David V. Results from solvophobic theory applied to methylene selectivity in reversed-phase HPLC // *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2018. Vol. 41. P. 24–32.
44. Carr P.W., Li J., Dallas A.J., Eikens D.I., Tan L.C. Revisionist look at solvophobic driving forces in reversed-phase liquid chromatography// *J. Chromatogr. A*, 1993. Vol. 656. P. 113–133.
45. Снайдер Л.Р., Киркланд Д.Д., Долан Д.У. Введение в современную жидкостную хроматографию. [ред.] Бару М.Б., Важенина И.В., Староверов С.М. М.: Техносфера, 2020. С. 382–383.
46. Долгоносков А.М., Сенявин М.М., Волощик И.Н. Ионный обмен и ионная хроматография. М.: Наука, 1993. 222 с.
47. Самсонов Г.В., Меленовский А.Т. Сорбционные и хроматографические методы физико-химической биотехнологии. Ленинград: Наука, 1956. 229 с.
48. Lajkó G., Grecsó N., Megyesi R., Forró E., Fülöp F., Wolrab D., Lindner W., Péter A., Ilisz I. Enantioseparation of β -carboline derivatives on polysaccharide- and strong cation exchanger-based chiral stationary phases. A comparative study // *J. Chromatogr. A*, 2016. Vol. 1467. P. 188–198.
49. Hoffmann C.V., Laemmerhofer M., Lindner W. Novel strong cation-exchange type chiral stationary phase for the enantiomer separation of chiral amines by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2007. Vol. 1161. P. 242–251.
50. Orosz T., Grecso N., Lajko G., Szakonyi Z., Fulop F., Armstrong D.W., Ilisz I., Peter A. Liquid chromatographic enantioseparation of carbocyclic β -amino acids possessing limonene skeleton on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases // *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 2017. Vol. 145. P. 119–126.
51. Grecsó N., Forró E., Fülöp F., Péter A., Ilisz I., Lindner W. Combinatorial effects of the configuration of the cationic and the anionic chiral subunits of four zwitterionic chiral stationary

phases leading to reversal of elution order of cyclic β -amino acid enantiomers as ampholytic model compounds // *J. Chromatogr. A*, 2016. Vol. 1467. P. 178–187.

52. Uccello-Barretta G., Bertucci C., Domenici E., Salvadori P. Conformational and dynamic changes of d-and l-tryptophan due to stereoselective interaction with human serum albumin, as revealed by proton-selective relaxation rate measurements // *J. Am. Chem. Soc.*, 1991. Vol. 113. P. 7017–7019.

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

54. Akasaka K., Gyimesi-Forrás K., Lämmerhofer M., Fujita T., Watanabe M., Harada N., Lindner W. Investigations of molecular recognition aspects related to the enantiomer separation of 2-methoxy-2-(1-naphthyl) propionic acid using quinine carbamate as chiral selector: an NMR and FT-IR spectroscopic as well as X-ray crystallographic study // *Chirality*, Vol. 17. P. 544–555.

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

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

57. Fornstedt T., Sajonz P., Guiochon G. Thermodynamic study of an unusual chiral separation. Propranolol enantiomers on an immobilized cellulose // *J. Am. Chem. Soc.*, 1997. Vol. 119. P. 1254–1264.

58. Asnin L., Kaczmarek K., Felinger A., Gritti F., Guiochon G. Adsorption of the enantiomers of 3-chloro-1-phenyl-propanol on silica-bonded chiral quinidine carbamate // *J. Chromatogr. A*, 2006. Vol. 1101. P. 158–170.

59. Gotmar G., Asnin L.D., Guiochon G. Adsorption of the enantiomers of 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)-ethanol on silica-bonded chiral quinidine-carbamate // *J. Chromatogr. A*, 2004. Vol. 1059. P. 43–52.

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

61. Asnin L. Adsorption models in chiral chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2012. Vol. 1269. P. 3–25.
62. Fornstedt T., Götmar G., Andersson M., Guiochon G. Dependence on the mobile-phase pH of the adsorption behavior of propranolol enantiomers on a cellulase protein used as the chiral selector // *J. Am. Chem. Soc.*, 1999. Vol. 121. P. 1164–1174.
63. Götmar G., Albareda N.R., Fornstedt T. Investigation of the heterogeneous adsorption behavior of selected enantiomers on immobilized α_1 -acid glycoprotein // *Anal. Chem.*, 2002. Vol. 74. P. 2950–2959.
64. Lindholm J., Fornstedt T. Investigation of the adsorption behaviour of a chiral model compound on a tartardiamide-based network-polymeric chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2005. Vol. 1095. P. 50–59.
65. Энгельгардт Х. Жидкостная хроматография при высоких давлениях. М.: Мир, 1980. 245 с.
66. Kostova A., Bart H.J. Preparative chromatographic separation of amino acid racemic mixtures: I. Adsorption isotherms // *Sep. Purif. Tech.*, 2007. Vol. 54. P. 340–348.
67. Seidel-Morgenstern A., Guiochon G. Modelling of the competitive isotherms and the chromatographic separation of two enantiomers // *Chem. Eng. Sci.*, 1993. Vol. 48. P. 2787–2797.
68. Mihlbachler K., Kaczmarski K., Seidel-Morgenstern A., Guiochon G. Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Tröger's base enantiomers on an amylose-based chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2002. Vol. 955. P. 35–52.
69. Asnin L., Kaczmarski K., Guiochon G. The adsorption of naproxen enantiomers on the chiral stationary phase Whelk-O1 under reversed-phase conditions: The effect of buffer composition // *J. Chromatogr. A*, 2010. Vol. 1217. P. 7055–7064.
70. Asnin L. D., Guiochon G. Retention of Naproxen enantiomers on the chiral stationary phase Whelk-O1 under reversed-phase conditions. A reconsideration of the adsorption mechanism in the light of new experimental data // *J. Chromatogr. A*, 2010. Vol. 1217. P. 1709–1711.
71. Asnin L., Sharma K., Park S.W. Chromatographic retention and thermodynamics of adsorption of dipeptides on a chiral crown ether stationary phase // *J. Sep. Sci.*, 2011. Vol. 34. P. 3136–3144.
72. Chervenak M.C., Toone E.J. A direct measure of the contribution of solvent reorganization to the enthalpy of ligand binding // *J. Am. Chem. Soc.*, 1994. Vol. 116. P. 10533–10539.

73. Gasparrini F., Misiti D., Still W.C., Villani C., Wennemers H. Enantioselective and Diastereoselective Binding Study of Silica Bound Macrobicyclic Receptors by HPLC // *J. Org. Chem.*, 1997. Vol. 62. P. 8221–8224.
74. Asnin L.D., Kopchenova M.V., Vozisov S.E., Klochkova M.A., Klimova Y.A. Enantioselective retention mechanisms of dipeptides on antibiotic-based chiral stationary phases. II. Effect of the methanol content in the mobile phase // *J. Chromatogr. A*, 2020. Vol. 1626. N 461371.
75. Liu L., Guo Q.X. Isokinetic relationship, isoequilibrium relationship, and enthalpy–entropy compensation // *Chem. Rev.*, 2001. Vol. 101. P. 673–696.
76. Inoue Y., Hakushi T. Enthalpy-entropy compensation in complexation of cations with crown ethers and related ligands // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1985. P. 935–946.
77. Haroun M., Ravelet A., Grosset C., Villet A., Peyrin E. Thermodynamic origin of the chiral recognition of tryptophan on teicoplanin and teicoplanin aglycone stationary phases // *J. Sep. Sci.*, 2005. Vol. 28. P. 409–420.
78. Horvath C., Melander W., Molnar I. Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases // *Anal. Chem.*, 1977. Vol. 49. P. 142–154.
79. Bosch E., Espinosa S., Roses M. Retention of ionizable compounds on high–performance liquid chromatography III. Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile–water mobile phases // *J. Chromatogr. A*, 1998. Vol. 824. P. 137–146.
80. Gagliardi L.G., Castells C.B., Ràfols C., Rosés M., Bosch E. Modeling retention and selectivity as a function of pH and column temperature in liquid chromatography // *Anal. Chem.*, 2006. Vol. 78. P. 5858–5867.
81. Kazakevich Y.V. High–performance liquid chromatography retention mechanisms and their mathematical descriptions // *J. Chromatogr. A*, 2006. Vol. 1126. P. 232–243.
82. Reshetova E.N., Kopchenova M.V., Vozisov S.E., Vasyanin A.N., Asnin L.D. Enantioselective retention mechanisms of dipeptides on antibiotic-based chiral stationary phases: Leucyl–leucine, glycyl–leucine, and leucyl–glycine as case studies // *J. Chromatogr. A*, 2019. Vol. 1602. P. 368–377.
83. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Влияние ионного состава подвижной фазы на хроматографическое удерживание энантиомеров профенов на хиральном адсорбенте с привитым антибиотиком эремомицином // *Журн. физ. химии*, 2011. Т. 85. С. 1552–1557.

84. Рачинский В.В. Введение в общую теорию динамики сорбции и хроматографии. М.: Наука. 1964. 136 с.
85. Giddings J.C., Dynamics of Chromatography. Part I, Principles and Theory. Marcel Dekker, New York, NY, 1965.
86. Gritti F., Guiochon G. A protocol for the measurement of all the parameters of the mass transfer kinetics in columns used in liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2010. Vol. 1217. P. 5137–5151.
87. Eon C.H. Comparison of broadening patterns in regular and radially compressed large-diameter columns // *J. Chromatogr. A*, 1978. Vol. 149. P. 29–42.
88. Martin A.J., Synge R.L. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins // *Biochem. J.*, 1941. Vol. 35. P. 1358–1368.
89. Van Deemter J.J., Zuiderweg F.J., Klinkenberg A.V. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography // *Chem. Eng. Sci.*, 1956. Vol. 5. P. 271–289.
90. Gritti F., Guiochon G. The van Deemter equation: Assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2013. Vol. 1302. P. 1–13.
91. Knox J.H. Practical aspects of LC theory // *J. Chromatogr. Sci.*, 1977. Vol. 15. P. 352–364.
92. Gritti F., Guiochon G. Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency // *J. Chromatogr. A*, 2012. Vol. 1221. P. 2–40.
93. Khirevich S., Daneyko A., Höltzel A., Seidel-Morgenstern A., Tallarek U. Statistical analysis of packed beds, the origin of short-range disorder, and its impact on eddy dispersion // *J. Chromatogr. A*, 2010. Vol. 1217. P. 4713–4722.
94. Felinger A., Guiochon G. Comparison of the kinetic models of linear chromatography // *Chromatographia*, 2004. Vol. 60. P. S175–S180.
95. Horvath C., Lin H.J. Movement and band spreading of unadsorbed solutes in liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1976. Vol. 126. P. 401–420.
96. Miyabe K., Ando M., Ando N., Guiochon G. External mass transfer in high performance liquid chromatography systems // *J. Chromatogr. A*, 2008. Vol. 1210. P. 60–67.
97. Miyabe K., Kawaguchi Y., Guiochon G. Kinetic study on external mass transfer in high performance liquid chromatography system // *J. Chromatogr. A*, 2010. Vol. 1217. P. 3053–3062.

98. Knox J.H., Scott H.P. B and C terms in the Van Deemter equation for liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1983. Vol. 282. P. 297–313.
99. Brenner H., Gaydos L.J. The constrained Brownian movement of spherical particles in cylindrical pores of comparable radius: models of the diffusive and convective transport of solute molecules in membranes and porous media // *J. Colloid Interface Sci.*, 1977. Vol. 58. P. 312–356.
100. Ma Z., Whitley R.D., Wang N.H. Pore and surface diffusion in multicomponent adsorption and liquid chromatography systems // *AIChE J.*, 1996. Vol. 42. P. 1244–1262.
101. Golshan-Shirazi S., Guiochon G. Comparison of the various kinetic models of non-linear chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1992. Vol. 603. P. 1–11.
102. Kaczmarski K., Antos D., Sajonz H., Sajonz P., Guiochon G. Comparative modeling of breakthrough curves of bovine serum albumin in anion-exchange chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2001. Vol. 925. P. 1–17.
103. Guiochon G., Felinger A., Shirazi D.G., Katti A. 2006. The mass balance equation of chromatography and its general properties. In: *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, New York, p. 19–66.
104. Лукин В.Д. Регенерация адсорбентов. [ред.] В. Д. Лукин, И. С. Анцыпович. Л.: Химия, 1983. 216 с.
105. Morbidelli M., Servida A., Storti G., Carra S. Simulation of multicomponent adsorption beds. Model analysis and numerical solution // *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 1982. Vol. 21. P. 123–131.
106. Morbidelli M., Storti G., Carra S., Niederjaufer G., Pontoglio A. Study of a separation process through adsorption of molecular sieves: application to a chlorotoluene isomers mixture // *Chem. Eng. Sci.*, 1984. Vol. 39. P. 383–393.
107. Акулов А.К., Гребенников С.Ф., Пахомов Ю.И. Моделирование динамики адсорбции на активированных углеродных волокнах // *Журн. прикл. химии.*, 1986. Т. 59. № 6. С. 1236–1240.
108. Glueckauf E., Coates J.I. 241. Theory of chromatography. Part IV. The influence of incomplete equilibrium on the front boundary of chromatograms and on the effectiveness of separation // *J. Chem. Soc. (Resumed)*, 1947. P. 1315–1321.
109. Ma Z., Guiochon G. Application of orthogonal collocation on finite elements in the simulation of non-linear chromatography // *Comput. Chem. Eng.*, 1991. Vol. 15. P. 415–426.

110. Lin B., Ma Z., Guiochon G. Influence of calculation errors in the numerical simulation of chromatographic elution band profiles using an ideal or semi-ideal model // *J. Chromatogr. A*, 1989. Vol. 484. P. 83–102.
111. Czok M., Guiochon G. The physical sense of simulation models of liquid chromatography: propagation through a grid or solution of the mass balance equation // *Anal. Chem.*, 1990. Vol. 62. P. 189–200.
112. Villadsen J.V., Stewart W. Solution of boundary-value problems by orthogonal collocation // *Chem. Eng. Sci.*, 1967. Vol. 22. P. 1483–1501.
113. Gardini L., Servida A., Morbidelli M., Carra S. Use of orthogonal collocation on finite elements with moving boundaries for fixed bed catalytic reactor simulation // *Comput. Chem. Eng.*, 1985. Vol. 9. P. 1–17.
114. Yu Q., Wang N.H. Computer simulations of the dynamics of multicomponent ion exchange and adsorption in fixed beds—gradient-directed moving finite element method // *Comput. Chem. Eng.*, 1989. Vol. 13. P. 915–926.
115. Kaczmarski K., Mazzotti M., Storti G., Morbidelli M. Modeling fixed-bed adsorption columns through orthogonal collocations on moving finite elements // *Comput. Chem. Eng.*, 1997. Vol. 21. P. 641–660.
116. Shipilova O., Sainio T., Haario, H. Particle transport method for simulation of multicomponent chromatography problems // *J. Chromatogr. A*, 2008. Vol. 1204. P. 62–71.
117. Crétier G., Macherel L., Rocca J.L. Preparative liquid chromatography I. Influence of column efficiency on optimum injection conditions under isocratic elution // *J. Chromatogr. A*, 1992. Vol. 590. P. 175–188.
118. Гусак А.А. Высшая математика. Минск: Тетра Системс, 2000. Т. 2. 544 с.
119. Горелов Ю.Н. методы решения обыкновенных дифференциальных уравнений (метод Рунге - Кутты): учеб. пособие. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2006. 48 с.
120. Пименов, В. Г. Численные методы в 2 ч. Ч. 2: учебное пособие для вузов / В.Г. Пименов, А.Б. Ложников. Москва: Издательство Юрайт, 2024. 107 с.
121. Rizzi A.M. Band broadening in high-performance liquid chromatographic separations of enantiomers with swollen microcrystalline cellulose triacetate packings: I. Influence of capacity factor, analyte structure, flow velocity and column loading // *J. Chromatogr. A*, 1989. Vol. 478. P. 71–86.

122. Oliveros L., Minguillon C., Billaud C. Resolution of several racemic 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-ones by high-performance liquid chromatography on a chiral silica-bonded stationary phase // *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1992. Vol. 10. P. 925–930.
123. Marle I., Jönsson S., Isaksson R., Pettersson C., Pettersson G. Chiral stationary phases based on intact and fragmented cellobiohydrolase I immobilized on silica // *J. Chromatogr. A*, 1993. Vol. 648. P. 333–347.
124. Schleimer M., Pirkle W. H., Schurig V. Enantiomer separation by high-performance liquid chromatography on polysiloxane-based chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 1994. Vol. 679. P. 23–34.
125. Duan G., Ching C.B., Swarup S. Kinetic and equilibrium study of the separation of propranolol enantiomers by high performance liquid chromatography on a chiral adsorbent // *Chem. Eng. J.*, 1998. Vol. 69. P. 111–117.
126. Jandera P., Bačková, V., Felinger A. Analysis of the band profiles of the enantiomers of phenylglycine in liquid chromatography on bonded teicoplanin columns using the stochastic theory of chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2001. Vol. 919. P. 67–77.
127. Gritti F., Guiochon G. Mass transfer mechanism in chiral reversed phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2014. Vol. 1332. P. 35–45.
128. Geibel C., Dittrich K., Woiwode U., Kohout M., Zhang T., Lindner W., Lämmerhofer M. Evaluation of superficially porous particle based zwitterionic chiral ion exchangers against fully porous particle benchmarks for enantioselective ultra-high performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2019. Vol. 1603. P. 130–140.
129. Roy D., Armstrong D. W. Fast super/subcritical fluid chromatographic enantioseparations on superficially porous particles bonded with broad selectivity chiral selectors relative to fully porous particles // *J. Chromatogr. A*, 2019. Vol. 1606. N 360339.
130. Schmitt K., Woiwode U., Kohout M., Zhang T., Lindner W., Lämmerhofer M. Comparison of small size fully porous particles and superficially porous particles of chiral anion-exchange type stationary phases in ultra-high performance liquid chromatography: effect of particle and pore size on chromatographic efficiency and kinetic performance // *J. Chromatogr. A*, 2018. Vol. 1569. P. 149–159.
131. Asnin L., Sharma K., Park, S.W. A study of mass transfer kinetics of alanyl-alanine on a chiral crown ether stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2011. Vol. 1218. P. 5263–5272.

132. Asnin L.D., Boteva A.A., Krasnykh O.P., Stepanova M.V., Ali I. Unusual van Deemter plots of optical isomers on a chiral brush-type liquid chromatography column // *J. Chromatogr. A*, 2019. Vol. 1592. P. 112–121.
133. Da Silva I.J., De Veredas V., Carpes M.J.S., Santana C.C. Chromatographic separation of bupivacaine enantiomers by hplc: parameters estimation of equilibrium and mass transfer under linear conditions // *Adsorption*, 2005. Vol. 11. P. 123–129.
134. Barhate C.L., Wahab M.F., Breitbach Z.S., Bell D.S., Armstrong D. W. High efficiency, narrow particle size distribution, sub-2 μm based macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases in HPLC and SFC // *Anal. Chim. Acta*, 2015. Vol. 898. P. 128–137.
135. Patel D.C., Breitbach Z.S., Wahab M.F., Barhate C.L., Armstrong D.W. Gone in seconds: praxis, performance, and peculiarities of ultrafast chiral liquid chromatography with superficially porous particles // *Anal. Chem.*, 2015. Vol. 87. P. 9137–9148.
136. Huber J.F.K. High efficiency, high speed liquid chromatography in columns // *J. Chromatogr. Sci.*, 1969. Vol. 7. P. 85–90.
137. Gritti F., Guiochon G. The quantitative impact of the mesopore size on the mass transfer mechanism of the new 1.9 μm fully porous Titan-C18 particles II–Analysis of biomolecules // *J. Chromatogr. A*, 2015. Vol. 1392. P. 10–19.
138. Grushka E., Snyder L.R., Knox, J.H. Advances in band spreading theories // *Chromatogr. Sci.*, 1975. Vol. 13. P. 25–37.
139. Felletti S., De Luca C., Lievore G., Chenet T., Chankvetadze B., Farkas T., Cavazzini A., Catani M. Shedding light on mechanisms leading to convex-upward van Deemter curves on a cellulose tris (4-chloro-3-methylphenylcarbamate)-based chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2020. Vol. 1630. N 461532.
140. Neue U. D., Kele M., Bunner B., Kromidas A., Dourdeville T., Mazzeo J.R., Grumbach E.D., Sepra S., Wheat T.E., Hong P., Gilar M. Ultra-performance liquid chromatography technology and applications // *Adv. Chromatogr.*, 2009. Vol. 48. P. 99–104.
141. Ali I., Saleem K., Hussain I., Gaitonde V.D., Aboul-Enein H.Y. Polysaccharides chiral stationary phases in liquid chromatography // *Sep. Purif. Rev.*, 2009. Vol. 38. P. 97–147.
142. Ribeiro J., Tiritan M.E., Pinto M.M., Fernandes C. Chiral stationary phases for liquid chromatography based on chitin-and chitosan-derived marine polysaccharides // *Symmetry*, 2017. Vol. 9. P. 190.

143. Chen X., Yamamoto C., Okamoto Y. Polysaccharide derivatives as useful chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography // *Pure Appl. Chem.*, 2007. Vol. 79. P. 1561–1573.
144. Berthod A. *Chiral Recognition in Separation Methods*, Springer, 2010.
145. Ali I., Aboul-Enein H.Y. Impact of immobilized polysaccharide chiral stationary phases on enantiomeric separations // *J. Sep. Sci.*, 2006. Vol. 29. P. 762–769.
146. Ali I., Aboul-Enein H.Y. Immobilized polysaccharide CSPs: an advancement in enantiomeric separations // *Curr. Pharm. Anal.*, 2007. Vol. 3. P. 71–82.
147. Francotte E., Wolf R.M., Lohmann D., Mueller R. Chromatographic resolution of racemates on chiral stationary phases: I. Influence of the supramolecular structure of cellulose triacetate // *J. Chromatogr. A*, 1985. Vol. 347. P. 25–37.
148. Fan X., Cao L., Geng L., Ma Y., Wei Y., Wang Y. Polysaccharides as separation media for the separation of proteins, peptides and stereoisomers of amino acids // *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021. Vol. 186. P. 616–638.
149. Lipka E., Dascalu A.E., Messara Y., Tsutsqiridze E., Farkas T., Chankvetadze B. Separation of enantiomers of native amino acids with polysaccharide-based chiral columns in supercritical fluid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2019. Vol. 1585. P. 207–212.
150. Fong G.W., Grushka E. Effects of pH, ionic strength, and organic modifier on the chromatographic behavior of amino acids and peptides using a bonded peptide stationary phase // *Anal. Chem.*, 1978. Vol. 50. P. 1154–1161.
151. Kikta Jr E.J., Grushka E. Bonded peptide stationary phases for the separation of amino acids and peptides using liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1977. Vol. 135. P. 367–376.
152. Howard W.A., Hsu T.B., Rogers L.B., Nelson D.A. Characterization of a chiral tripeptide stationary phase for the liquid chromatographic separation of chiral dipeptides // *Anal. Chem.*, 1985. Vol. 57. P. 606–610.
153. Bhushan R., Kumar R. Analytical and preparative enantioseparation of dl-penicillamine and dl-cysteine by high-performance liquid chromatography on α -acid glycoprotein and β -cyclodextrin columns using ninhydrin as a reversible tagging reagent // *J. Chromatogr. A*, 2009. Vol. 1216. P. 3413–3417.

154. Tang M., Zhang J., Zhuang S., Liu W. Development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic separation // *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2012. Vol. 39. P. 180–194.
155. Bressolle F., Audran M., Pham T.N., Vallon J.J. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 1996. Vol. 687. P. 303–336.
156. Mitchell C.R., Armstrong D.W. Cyclodextrin-based chiral stationary phases for liquid chromatography: a twenty-year overview // *Chiral separations: methods and protocols*, 2004. P. 61–112.
157. Kučerová G., Procházková H., Kalíková K., Tesařová E. Sulfobutylether- β -cyclodextrin as a chiral selector for separation of amino acids and dipeptides in chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2016. Vol. 1467. P. 356–362.
158. Remsburg J.W., Armstrong D.W., Peter A., Toth G. LC enantiomeric separation of unusual amino acids using cyclodextrin-based stationary phases // *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 2007. Vol. 31. P. 219–230.
159. Florance J., Konteatis A.Z. Chiral high-performance liquid chromatography of aromatic cyclic dipeptides using cyclodextrin stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 1991. Vol. 543. P. 299–305.
160. Chen S. High performance liquid chromatographic enantioresolution of benzoyl amino acid, dipeptides and tripeptide on β -cyclodextrin bonded stationary phase using polar-organic acetonitrile as the mobile phase // *J. Chin. Chem. Soc.*, 1999. Vol. 46. P. 239–244.
161. Hyun M.H. Liquid chromatographic enantioseparations on crown ether-based chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 2016. Vol. 1467. P. 19–32.
162. Hilton M., Armstrong D.W. Evaluation of the enantiomeric separation of dipeptides using a chiral crown ether LC column // *J. Liq. Chromatogr.*, 1991. Vol. 14. P. 3673–3683.
163. Conrad U., Chankvetadze B., Scriba G.K. High performance liquid chromatographic separation of dipeptide and tripeptide enantiomers using a chiral crown ether stationary phase // *J. Sep. Sci.*, 2005. Vol. 28. P. 2275–2281.
164. Mohammadzadeh Kakhki R. Application of crown ethers as stationary phase in the chromatographic methods // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2013. Vol. 75. P. 11–22.

165. Paik M.J., Kang J.S., Huang B.S., Carey J.R., Lee W. Development and application of chiral crown ethers as selectors for chiral separation in high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy // *J. Chromatogr. A*, 2013. Vol. 1274. P. 1–5.
166. Аснин Л.Д., Горбунов А.А. Препаративная хиральная хроматография. Теория и практика применения для получения лекарственных веществ // *Вестник Пермского федерального исследовательского центра*, 2009. №. 2. С. 26–39.
167. Scriba G.K. Chiral recognition in separation science—an update // *J. Chromatogr. A*, 2016. Vol. 1467. P. 56–78.
168. Cavazzini A., Pasti L., Massi A., Marchetti N., Dondi F. Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: a review // *Anal. Chim. Acta*, 2011. Vol. 706. P. 205–222.
169. Fernandes C., Phyo Y.Z., Silva A.S., Tiritan M.E., Kijjoa A., Pinto M.M. Chiral stationary phases based on small molecules: An update of the last 17 years // *Sep. Purif. Rev.*, 2018. Vol. 47. P. 89–123.
170. Pirkle W.H., Alessi D.M., Hyun M.H., Pochapsky T.C. Separation of some enantiomeric di- and tripeptides on chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 1987. Vol. 398. P. 203–209.
171. Hyun M.H., Baik I.K., Pirkle W.H. Liquid chromatographic resolution of enantiomeric dipeptides on the chiral stationary phase derived from (S)-1-(6,7-dimethyl-1-naphthyl) isobutylamine // *J. Liq. Chromatogr.*, 1988. Vol. 11. P. 1249–1259.
172. Рогожин С.В., Даванков В.А. Хроматографическое расщепление рацематов на диссимметрических сорбентах // *Успехи химии*, 1968. Т. 37. С. 1327–1347.
173. Даванков В.А., Навратил Дж., Уолтон Х. Лигандообменная хроматография: Глава 5. Разделение энантиомеров. М.: Мир, 1990. 294 с.
174. Natalini B., Sardella R., Macchiarulo A., Pellicciari R. Cysteine-based chiral selectors for the ligand-exchange separation of amino acids // *J. Chromatogr. B*, 2008. Vol. 875. P. 108–117.
175. Ilisz I., Tourwé D., Armstrong D.W., Péter A. High-performance liquid chromatographic enantioseparation of unusual secondary amino acids on a D-penicillamine-based chiral ligand exchange column // *Chirality*, 2006. Vol. 18. P. 539–543.
176. Armstrong D.W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill C., Chen J.R. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography // *Anal. Chem.*, 1994. Vol. 66. P. 1473–1484.
177. Ilisz I., Pataj Z., Aranyi A., Péter A. Macrocyclic antibiotic selectors in direct HPLC enantioseparations // *Sep. Purif. Rev.*, 2012. Vol. 41. P. 207–249.

178. Ilisz I., Berkecz R., Péter, A. HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: A review // *J. Sep. Sci.*, 2006. Vol. 29. P. 1305–1321.
179. Ilisz I., Berkecz R., Péter A. Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 2009. Vol. 1216. P. 1845–1860.
180. Ward T.J., Farris Iii A.B. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review // *J. Chromatogr. A*, 2001. Vol. 906. P. 73–89.
181. D'Acquarica I, Gasparrini F, Misiti D, Pierini M, Villani C. HPLC chiral stationary phases containing macrocyclic antibiotics: practical aspects and recognition mechanism // *Adv Chromatogr.*, 2008. Vol. 46. P. 109–173.
182. El Deeb S. Evaluation of a vancomycin-based LC column in enantiomeric separation of atenolol: method development, repeatability study and enantiomeric impurity determination // *Chromatographia*, 2010. Vol. 71. P. 783–787.
183. Yang J., Lu X., Bi Y., Qin F., Li F. Chiral separation of duloxetine and its R-enantiomer by LC // *Chromatographia*, 2007. Vol. 66. P. 389–393.
184. Liu W., Wang F. Simultaneous stereoselective analysis of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine enantiomers in human plasma by HPLC-ESI/MS using a vancomycin chiral column // *J. Chromatogr. B*, 2007. Vol. 850. P. 183–189.
185. Hefnawy M.M., Sultan M.A., Al-Shehri M.M. HPLC separation technique for analysis of bufuralol enantiomers in plasma and pharmaceutical formulations using a vancomycin chiral stationary phase and UV detection // *Chromatogr. B*, 2007. Vol. 856. P. 328–336.
186. Hashem H., Tründelberg C., Attef O., Jira T. Effect of chromatographic conditions on liquid chromatographic chiral separation of terbutaline and salbutamol on Chirobiotic V column // *J. Chromatogr. A*, 2011. Vol. 1218. P. 6727–6731.
187. Wagdy H.A., Hanafi R.S., El-Nashar R.M., Aboul-Enein H.Y. Predictability of enantiomeric chromatographic behavior on various chiral stationary phases using typical reversed phase modeling software // *Chirality*, 2013. Vol. 25. P. 506–513.
188. Barna J.C., Williams D.H., Stone D.J., Leung T.C., Doddrell D.M. Structure elucidation of the teicoplanin antibiotics // *J. Am. Chem. Soc.*, 1984. Vol. 106. P. 4895–4902.

189. Berthod A., Chen X., Kullman J.P., Armstrong D.W., Gasparrini F., D'Acquaric I., Villani C., Carotti A. Role of the carbohydrate moieties in chiral recognition on teicoplanin-based LC stationary phases // *Anal. Chem.*, 2000. Vol. 72. P. 1767–1780.
190. Berthod A., Liu Y., Bagwill C., Armstrong D.W. Facile liquid chromatographic enantioresolution of native amino acids and peptides using a teicoplanin chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 1996. Vol. 731. P. 123–137.
191. Péter A., Török G., Armstrong D.W. High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of unusual amino acids on a teicoplanin chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 1998. Vol. 793. P. 283–296.
192. Xiao T.L., Armstrong D.W. Enantiomeric separations by HPLC using macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases: an overview // *Chiral Sep.*, 2004. P. 113–171.
193. Peyrin E., Ravel A., Grosset C., Villet A., Ravelet C., Nicolle E., Alary J. Interactions between d, l dansyl amino acids and immobilized teicoplanin: study of the dual effect of sodium citrate on chiral recognition // *Chromatographia*, 2001. Vol. 53. P. 645–650.
194. Armstrong D.W., Liu Y., Ekborgott K.H. A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparations // *Chirality*, 1995. Vol. 7. P. 474–497.
195. Berthod A., Yu T., Kullman J.P., Armstrong D.W., Gasparrini F., D'Acquarica I., Misiti D., Carotti A. Evaluation of the macrocyclic glycopeptide A-40,926 as a high-performance liquid chromatographic chiral selector and comparison with teicoplanin chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2000. Vol. 897. P. 113–129.
196. Cavazzini A., Nadalini G., Dondi F., Gasparrini F., Ciogli A., Villani C. Study of mechanisms of chiral discrimination of amino acids and their derivatives on a teicoplanin-based chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2004. Vol. 1031. P. 143–158.
197. Cavazzini A., Pasti L., Dondi F., Finessi M., Costa V., Gasparrini F., Ciogli A., Bedani F. Binding of dipeptides and amino acids to teicoplanin chiral stationary phase: apparent homogeneity of some heterogeneous systems // *Anal. Chem.*, 2009. Vol. 81. P. 6735–6743.
198. Jordan D.C. Ristocetin. In *Mechanism of Action*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1967. P. 84–89
199. Péter A., Török G., Armstrong D.W., Tóth G., Tourwé D. High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of synthetic amino acids on a ristocetin A chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2000. Vol. 904. P. 1–15.

200. Степанова М.В., Аснин Л.Д., Ботева А.А., Красных О.П., Фефилова И.В. Закономерности энантиоселективного удерживания хиральных оксазолопирролохинолонов на неподвижной фазе с привитым антибиотиком ристоцетином А // Журн. физ. химии, 2021. Т. 95. С. 131–139.
201. Кузнецов М.А., Нестеренко П.Н., Васияров Г.Г., Староверов С.М. Сорбенты с иммобилизованными гликопептидными антибиотиками для разделения оптических изомеров методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Прикл. биохим. микробиол., 2006. Т. 42. С. 615–623.
202. Ekborg-Ott K.H., Liu Y., Armstrong D.W. Highly enantioselective HPLC separations using the covalently bonded macrocyclic antibiotic, ristocetin A, chiral stationary phase // *Chirality*, 1998. Vol. 10. P. 434–483.
203. Kopchenova M.V., Stepanova M.V., Asnin L.D. Unusual difference in enantioselectivity of two chiral stationary phases with grafted antibiotic Ristocetin A // *Chromatographia*, 2021. Vol. 84. P. 307–311.
204. Williams D.H., Bardsley B. The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria // *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999. Vol. 38. P. 1172–1193.
205. Péter A., Vékes E., Armstrong D.W. Effects of temperature on retention of chiral compounds on a ristocetin A chiral stationary phase // *J. Chromatogr. A*, 2002. Vol. 958. P. 89–107.
206. Péter A., Vékes E., Gera L., Stewart J.M., Armstrong D.W. A comparison of the direct and indirect LC methods for separating enantiomers of unusual glycine and alanine amino acid analogues // *Chromatographia*, 2002. Vol. 56. P. S79–S89.
207. Gogolishvili O.S., Reshetova E.N. Chromatographic enantioseparation and adsorption thermodynamics of hydroxy acids and their derivatives on antibiotic-based chiral stationary phases as affected by eluent pH // *Chromatographia*, 2021. Vol. 84. P. 53–73.
208. Staroverov S.M., Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiarov G.G., Katrukha G.S., Fedorova G.B. New chiral stationary phase with macrocyclic glycopeptide antibiotic eremomycin chemically bonded to silica // *J. Chromatogr. A*, 2006. Vol. 1108. P. 263–267.
209. 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. Vol. 1162. P. 90–96.

210. Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiyarov G.G., Staroverov S.M. Sorbents with immobilized glycopeptide antibiotics for separating optical isomers by high-performance liquid chromatography // *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2006. Vol. 42. P. 536–544.
211. Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiyarov G.G., Staroverov S.M. High-performance liquid chromatography of α -amino acid enantiomers on eremomycin-modified silica // *J. Anal. Chem.*, 2008. Vol. 63. P. 57–64.
212. Кузнецов М.А., Нестеренко П.Н., Васияров Г.Г., Староверов С.М. Высокоэффективная жидкостная хроматография альфа-аминокислот на силикагеле с иммобилизованным эремомицином // *Журн. аналит. химии*, 2008. Т. 63. С. 64–72.
213. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Хроматографическое поведение и термодинамика адсорбции энантиомеров профенов на силикагеле с привитым антибиотиком эремомицином // *Журн. физ. химии*, 2009. Т. 83. С. 643–648.
214. Petrussevska 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. Vol. 29. P. 1447–1457.
215. Решетова Е.Н., Аснин Л.Д. Адсорбция энантиомеров ибупрофена на хиральной неподвижной фазе с привитым антибиотиком эремомицином // *Журн. физ. химии*, 2015. Т. 89. № 2. С. 298–305.
216. Grubhofer N., Schleith L. Modifizierte ionenaustauscher als spezifische adsorbentien // *Naturwissenschaften*, 1953. Vol. 40. P. 508–508.
217. Pettersson C. Chromatographic separation of enantiomers of acids with quinine as chiral counter ion // *J. Chromatogr. A*, 1984. Vol. 316. P. 553–567.
218. Rosini C., Bertucci C., Pini D., Altemura P., Salvadori P. Cinchona alkaloids for preparing new, easily accessible chiral stationary phases. I. 11-(10,11-Dihydro-6'-methoxy-cinchonan-9-OL)-tiopropylsilanized silica // *Tetrahedron Lett.*, 1985. Vol. 26. P. 3361–3364.
219. Laemmerhofer M., Lindner W. Liquid chromatographic enantiomer separation and chiral recognition by cinchona alkaloid-derived enantioselective separation materials // *Adv. Chromatogr.*, 2008. Vol. 46. P. 1–107.
220. Lämmerhofer M., Lindner W. Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonan carbamates and their application as chiral anion exchangers // *J. Chromatogr. A*, 1996. Vol. 741. P. 33–48.

221. Maier N.M., Nicoletti L., Lämmerhofer M., Lindner W. Enantioselective anion exchangers based on cinchona alkaloid-derived carbamates: Influence of C8/C9 stereochemistry on chiral recognition // *Chirality*, 1999. Vol. 11. P. 522–528.
222. Sievers-Engler A., Lindner W., Laemmerhofer M. Ligand–receptor binding increments in enantioselective liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2014. Vol. 1363. P. 79–88.
223. Calderón C., Santi C., Lämmerhofer M. Chiral separation of disease biomarkers with 2-hydroxycarboxylic acid structure // *J. Sep. Sci.*, 2018. Vol. 41. P. 1224–1231.
224. Hoffmann C.V., Pell R., Lämmerhofer M., Lindner W. Synergistic effects on enantioselectivity of zwitterionic chiral stationary phases for separations of chiral acids, bases, and amino acids by HPLC // *Anal. Chem.*, 2008. Vol. 80. P. 8780–8789.
225. Zhang T., Holder E., Franco P., Lindner W. Method development and optimization on cinchona and chiral sulfonic acid–based zwitterionic stationary phases for enantiomer separations of free amino acids by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2014. Vol. 1363. P. 191–199.
226. Orosz T., Forró E., Fülöp F., Lindner W., Ilisz I., Péter A. Effects of N-methylation and amidation of cyclic β -amino acids on enantioselectivity and retention characteristics using Cinchona alkaloid-and sulfonic acid-based chiral zwitterionic stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 2018. Vol. 1535. P. 72–79.
227. Gargano A.F., Kohout M., Macíková P., Lämmerhofer M., Lindner W. Direct high-performance liquid chromatographic enantioseparation of free α -, β -and γ -aminophosphonic acids employing cinchona-based chiral zwitterionic ion exchangers // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013. Vol. 405. P. 8027–8038.
228. Bajtai A., Ilisz I., Howan D.H., Tóth G.K., Scriba G.K., Lindner W., Péter A. Enantioselective resolution of biologically active dipeptide analogs by high-performance liquid chromatography applying Cinchona alkaloid-based ion-exchanger chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 2020. Vol. 1611. N 460574.
229. Ianni F., Sardella R., Carotti A., Natalini B., Lindner W., Lämmerhofer M. Quinine-based zwitterionic chiral stationary phase as a complementary tool for peptide analysis: mobile phase effects on enantio- and stereoselectivity of underivatized oligopeptides // *Chirality*, 2016. Vol. 28. P. 5–16.
230. Cass Q.B., Tiritan M.E., Junior J.M.B., Barreiro J.C. (Eds.). *Chiral Separations and Stereochemical Elucidation: Fundamentals, Methods, and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2023.

231. Calderón C., Lämmerhofer M. Chiral separation of short chain aliphatic hydroxycarboxylic acids on cinchonan carbamate-based weak chiral anion exchangers and zwitterionic chiral ion exchangers // *J. Chromatogr. A*, 2017. Vol. 1487. P. 194–200.
232. Gyimesi-Forrás K., Kökösi J., Szász G., Gergely A., Lindner W. Liquid chromatographic enantiomer separations of novel quinazolone derivatives on quinine carbamate based chiral stationary phases using hydro-organic mobile phases // *J. Chromatogr. A*, 2004. Vol. 1047. P. 59–67.
233. Gyimesi-Forrás K., Akasaka K., Lämmerhofer M., Maier N.M., Fujita T., Watanabe M., Harada N., Lindner W. Enantiomer separation of a powerful chiral auxiliary, 2-methoxy-2-(1-naphthyl) propionic acid by liquid chromatography using chiral anion exchanger-type stationary phases in polar-organic mode; investigation of molecular recognition aspects // *Chirality*, 2005. Vol. 17. P. S134–S142.
234. Hoffmann C.V., Reischl R., Maier N.M., Lämmerhofer M., Lindner W. Investigations of mobile phase contributions to enantioselective anion- and zwitterion-exchange modes on quinine-based zwitterionic chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*, 2009. Vol. 1216. P. 1157–1166.
235. Tanács D., Orosz T., Ilisz I., Péter A., Lindner W. Unexpected effects of mobile phase solvents and additives on retention and resolution of N-acyl-D, L-leucine applying Cinchonane-based chiral ion exchangers // *J. Chromatogr. A*, 2021. Vol. 1648. N 462212.
236. Mimini V., Ianni F., Marini F., Hettegger H., Sardella R., Lindner W. Electrostatic attraction-repulsion model with Cinchona alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases exemplified for zwitterionic analytes // *Anal. Chim. Acta*, 2019. Vol. 1078. P. 212–220.
237. Gyimesi-Forrás K., Maier N.M., Kökösi J., Gergely A., Lindner W. Enantiomer separation of imidazo-quinazoline-dione derivatives on quinine carbamate-based chiral stationary phase in normal phase mode // *Chirality*, 2009. Vol. 21. P. 199–207.
238. Lajkó G., Grecsó N., Tóth G., Fülöp F., Lindner W., Ilisz I., Péter A. Liquid and subcritical fluid chromatographic enantioseparation of *N*^α-Fmoc proteinogenic amino acids on *Quinidine*-based zwitterionic and anion-exchanger type chiral stationary phases. A comparative study // *Chirality*, 2017. Vol. 29. P. 225–238.
239. Woiwode U., Reischl R.J., Buckenmaier S., Lindner W., Lämmerhofer M. Imaging peptide and protein chirality via amino acid analysis by chiral \times chiral two-dimensional correlation liquid chromatography // *Anal. Chem.*, 2018. Vol. 90. P. 7963–7971.

240. Péter A., Grecsó N., Tóth G., Fülöp F., Lindner W., Ilisz I. Ultra-trace analysis of enantiomeric impurities in proteinogenic *N*-Fmoc-amino-acid samples on *Cinchona* alkaloid-based chiral stationary phases // *Isr. J. Chem.*, 2016. Vol. 56. P. 1042–1051.
241. Lajkó G., Grecsó N., Tóth G., Fülöp F., Lindner W., Péter A., Ilisz I. A Comparative study of enantioseparations of *N*^α-Fmoc proteinogenic amino acids on *Quinine*-based zwitterionic and anion exchanger-type chiral stationary phases under hydro-organic liquid and subcritical fluid chromatographic conditions // *Molecules*, 2016. Vol. 21. N 1579.
242. Czerwenka C., Maier N.M., Lindner W. Liquid chromatographic–mass spectrometric separation of oligoalanine peptide stereoisomers: influence of absolute configuration on enantioselectivity and two-dimensional separation of diastereomers and enantiomers // *J. Chromatogr. A*, 2004. Vol. 1038. P. 85–95.
243. Czerwenka C., Lämmerhofer M., Lindner W. Structure-enantioselectivity relationships for the study of chiral recognition in peptide enantiomer separation on cinchona alkaloid-based chiral stationary phases by HPLC: Influence of the N-terminal protecting group // *J. Sep. Sci.*, 2003. Vol. 26. P. 1499–1508.
244. Calderón C., Horak J., Lämmerhofer M. Chiral separation of 2-hydroxyglutaric acid on cinchonan carbamate based weak chiral anion exchangers by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2016. Vol. 1467. P. 239–245.
245. Reischl R. J., Hartmanova L., Carrozzo M., Huszar M., Frühauf P., Lindner W. Chemoselective and enantioselective analysis of proteinogenic amino acids utilizing N-derivatization and 1-D enantioselective anion-exchange chromatography in combination with tandem mass spectrometric detection // *J. Chromatogr. A*, 2011. Vol. 1218. P. 8379–8387.
246. Hamase K., Morikawa A., Ohgusu T., Lindner W., Zaitso K. Comprehensive analysis of branched aliphatic D-amino acids in mammals using an integrated multi-loop two-dimensional column-switching high-performance liquid chromatographic system combining reversed-phase and enantioselective columns // *J. Chromatogr. A*, 2007. Vol. 1143. P. 105–111.
247. Karakawa S., Shimbo K., Yamada N., Mizukoshi T., Miyano H., Mita M., Lindner W., Hamase K. Simultaneous analysis of D-alanine, D-aspartic acid, and D-serine using chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to the rat plasma and tissues // *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015. Vol. 115. P. 123–129.

248. Du S., Wang Y., Weatherly C.A., Holden K., Armstrong D.W. Variations of L- and D-amino acid levels in the brain of wild-type and mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018. Vol. 410. P. 2971–2979.
249. Kimura R., Tsujimura H., Tsuchiya M., Soga S., Ota N., Tanaka A., Kim H. Development of a cognitive function marker based on D-amino acid proportions using new chiral tandem LC-MS/MS systems // *Sci. Rep.*, 2020. Vol. 10. N 804.
250. Wernisch S., Trapp O., Lindner W. Application of cinchona-sulfonate-based chiral zwitterionic ion exchangers for the separation of proline-containing dipeptide rotamers and determination of on-column isomerization parameters from dynamic elution profiles // *Anal. Chim. Acta*, 2013. Vol. 795. P. 88–98.
251. Gerhardt H., Sievers-Engler A., Jahanshah G., Pataj Z., Ianni F., Gross H., Lindner W., Lämmerhofer M. Methods for the comprehensive structural elucidation of constitution and stereochemistry of lipopeptides // *J. Chromatogr. A*, 2016. Vol. 1428. P. 280–291.
252. Reischl R.J., Lindner W. The stereoselective separation of serine containing peptides by zwitterionic ion exchanger type chiral stationary phases and the study of serine racemization mechanisms by isotope exchange and tandem mass spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015. Vol. 116. P. 123–130.
253. Bajtai, A., Fekete, B., Palkó, M., Fülöp, F., Lindner, W., Kohout, M., Ilisz I., Péter, A. Comparative study on the liquid chromatographic enantioseparation of cyclic β -amino acids and the related cyclic β -aminohydroxamic acids on Cinchona alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases // *J. Sep. Sci.*, 2018. Vol. 41. P. 1216–1223.
254. Williamson M.P., William D.H., Hammond S.J. Interactions of vancomycin and ristocetin with peptides as a model for protein binding // *Tetrahedron*, 1984. Vol. 40. P. 569–577.
255. Аснин Л.Д., Васянин А.Н., Степанова М.В. Особенности энантиоселективной адсорбции дипептидов на хиральных неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками на примере глициласпарагиновой кислоты // *Изв. АН, сер. хим.*, 2019. № 12. С. 2232–2240.
256. Степанова М.В. Механизмы энантиоселективного удерживания хиральных веществ на неподвижных фазах с привитыми макроциклическими антибиотиками эремомицином, ристоцетином А и тейкопланином: дис. ... канд. хим. наук: 1.4.4. – ПНИПУ, Пермь, 2023 – 152 с.

257. Knox J.H., Kaliszan R. Theory of solvent disturbance peaks and experimental determination of thermodynamic dead-volume in column liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1985. Vol. 349. P. 211–234.
258. Guan H., Guiochon G. Study of physico-chemical properties of some packing materials: I. Measurements of the external porosity of packed columns by inverse size-exclusion chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1996. Vol. 731. P. 27–40.
259. Kazakevich Y.V., LoBrutto R., Chan F., Patel T. Interpretation of the excess adsorption isotherms of organic eluent components on the surface of reversed-phase adsorbents: Effect on the analyte retention // *J. Chromatogr. A*, 2001. Vol. 913. P. 75–87.
260. Kazakevich Y.V., McNair H.M. Thermodynamic definition of HPLC dead volume // *J. Chromatogr. Sci.*, 1993. Vol. 31. P. 317–322.
261. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография. М.: Мир, 1976. 542 с.
262. Guggenheim E.A., Adam N.K. The thermodynamics of adsorption at the surface of solutions // *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A-Contain. Pap. Math. Phys. Character*, 1933. Vol. 139. P. 218–236.
263. Schay G., Nagy L.G., Szekrenyesy T. Comparative studies on the determination of specific surface areas by liquid adsorption // *Period. Polytech. Chem. Eng.*, 1960. Vol. 4. P. 95–117.
264. Larionov O.G., Myers A.L. Thermodynamics of adsorption from nonideal solutions of nonelectrolytes // *Chem. Eng. Sci.*, 1971. Vol. 26. P. 1025–1030.
265. Anderson T.F., Prausnitz J.M. Application of the UNIQUAC equation to calculation of multicomponent phase equilibria. 1. Vapor-liquid equilibria // *Ind. Eng. Chem. Proc. Design Devel.*, 1978. Vol. 17. P. 552–561.
266. Майер В.Р. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Техносфера, 2017. 408 с.
267. Asnin L.D., Stepanova M.V. Van't Hoff analysis in chiral chromatography // *J. Sep. Sci.*, 2018. Vol. 41. P. 1319–1337.
268. Li J., Carr P.W. Accuracy of empirical correlations for estimating diffusion coefficients in aqueous organic mixtures // *Anal. Chem.*, 1997. Vol. 69. P. 2530–2536.
269. Ouano A.C. Diffusion in liquid systems. I. A simple and fast method of measuring diffusion constants // *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 1972. Vol. 11. P. 268–271.

270. Colmsjö A.L., Ericsson M.W. Assessment of the height equivalent to a theoretical plate in liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1987. Vol. 398. P. 63–71.
271. Stevenson P.G., Gao H., Gritti F., Guiochon G. Removing the ambiguity of data processing methods: optimizing the location of peak boundaries for accurate moment calculations // *J. Sep. Sci.*, 2013. Vol. 36. P. 279–287.
272. Fornstedt T., Zhong G., Guiochon G. Peak tailing and mass transfer kinetics in linear chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1996. Vol. 741. P. 1–12.
273. Ruthven, D. M. Principles of adsorption and adsorption processes, 1st ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1984.
274. Tsotsas E., Schlünder E.U. On axial dispersion in packed beds with fluid flow: über die axiale dispersion in durchströmten festbetten // *Chem. Eng. Process.: Process Intensif.*, 1988. Vol. 24. P. 15–31.
275. Gunn D.J. Axial and radial dispersion in fixed beds // *Chem. Eng. Sci.*, 1987. Vol. 42. P. 363–373.
276. Mallette J., Wang M., Parcher J.F. Multicomponent ($n \geq 3$) sorption isotherms in reversed-phase liquid chromatography: the effect of immobilized eluent on the retention of analytes // *Anal. Chem.*, 2010. Vol. 82. P. 3329–3336.
277. Gritti F., Guiochon G. Adsorption mechanism in RPLC. Effect of the nature of the organic modifier // *Anal. Chem.*, 2005. Vol. 77. P. 4257–4272.
278. László K., Nagy L.G., Schay G., Fóti G. Investigation of hplc packings by liquid mixture adsorption // *Period. Polytech. Chem. Eng.*, 1985. Vol. 29. P. 73–85.
279. Chan F., Yeung L.S., LoBrutto R., Kazakevich Y.V. Interpretation of the excess adsorption isotherms of organic eluent components on the surface of reversed-phase phenyl modified adsorbents // *J. Chromatogr. A*, 2005. Vol. 1082. P. 158–165.
280. Buszewski B., Bocian S., Felinger A. Excess isotherms as a new way for characterization of the columns for reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*, 2008. Vol. 1191. P. 72–77.
281. Nikitina Y.K., Ali I., Asnin L.D. Adsorption of aqueous organic mixtures on a chiral stationary phase with bound antibiotic eremomycin // *J. Chromatogr. A*, 2014. Vol. 1363. P. 71–78.

282. Poplewska I., Kramarz R., Piątkowski W., Seidel-Morgenstern A., Antos D. Influence of preferential adsorption of mobile phase on retention behavior of amino acids on the teicoplanin chiral selector // *J. Chromatogr. A*, 2007. Vol. 1173. P. 58–70.
283. Poplewska I., Kramarz R., Piątkowski W., Seidel-Morgenstern A., Antos D. Behavior of adsorbed and fluid phases versus retention properties of amino acids on the teicoplanin chiral selector // *J. Chromatogr. A*, 2008. Vol. 1192. P. 130–138.
284. Moreau C., Douhéret G. Thermodynamic behavior of water-acetonitrile mixtures excess volumes and viscosities // *Thermochim. Acta*, 1975. Vol. 13. P. 385–392.
285. Wakisaka A., Abdoul-Carime H., Yamamoto Y., Kiyozumi Y. Non-ideality of binary mixtures water [ndash] methanol and water [ndash] acetonitrile from the viewpoint of clustering structure // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1998. Vol. 94. P. 369–374.
286. Asnin L., Horváth K., Guiochon G. On the enantioselectivity of the mass transfer kinetics and the adsorption equilibrium of Naproxen on the chiral stationary phase (R, R)-Whelk-O1 under reversed-phase conditions // *J. Chromatogr. A*, 2010. Vol. 1217. P. 1320–1331.
287. Kiselev A.V., Khopina V.V. Influence of properties of adsorbent, and of the surface and bulk solutions on adsorption from solution // *Trans. Faraday Soc.*, 1969. Vol. 65. P. 1936–1942.
288. 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. Vol. 34. P. 1065–1077.
289. Asnin L.D., Kopchenova M.V., Vozisov S.E., Klochkova M.A., Klimova Y.A. Enantioselective retention mechanisms of dipeptides on antibiotic-based chiral stationary phases. II. Effect of the methanol content in the mobile phase // *J. Chromatogr. A*, 2020. Vol. 1626. N 461371.
290. Felletti S., Catani M., Mazzocanti G., De Luca C., Lievore G., Buratti A., Pasti L., Gasparrini F., Cavazzini A. Mass transfer kinetics on modern Whelk-O1 chiral stationary phases made on fully-and superficially-porous particles // *J. Chromatogr. A*, 2021. Vol. 1637. N 461854.
291. Barrande M., Bouchet R., Denoyel R. Tortuosity of porous particles // *Anal. Chem.*, 2007. Vol. 79. P. 9115–9121.
292. Miyabe K., Takeuchi S. Analysis of surface diffusion phenomena in liquid phase adsorption // *J. Phys. Chem. B.*, 1997. Vol. 101. P. 7773–7779.

293. Gritti F., Guiochon G. Perspectives on the evolution of the column efficiency in liquid chromatography // *Anal. Chem.*, 2013. Vol. 85. P. 3017–3035.
294. Gritti F. On the relationship between radial structure heterogeneities and efficiency of chromatographic columns // *J. Chromatogr. A*, 2018. Vol. 1533. P. 112–126.
295. Klimova Y.A., Asnin L.D. Enantioselective adsorption dynamics of leucyl-leucine in a Chirobiotic R column // *J. Chromatogr. A*, 2021. Vol. 1635. N 461771.
296. Miyabe K., Guiochon G. Kinetic study of the mass transfer of S-Tröger's base in the system cellulose triacetate and ethanol // *J. Chromatogr. A*, 1999. Vol. 849. P. 445–465.
297. Miyabe K., Guiochon G. A study of mass transfer kinetics in an enantiomeric separation system using a polymeric imprinted stationary phase // *Biotechnol. Progr.*, 2000. Vol. 16. P. 617–629.
298. Gritti F., Guiochon G. Impact of the nature and composition of the mobile phase on the mass transfer mechanism in chiral reversed phase liquid chromatography. Application to the minimization of the solvent cost in chiral separations // *J. Chromatogr. A*, 2014. Vol. 1327. P. 57–65.
299. Miyabe K., Guiochon G. A kinetic study of mass transfer in reversed-phase liquid chromatography on a C18-silica gel // *Anal. Chem.*, 2000. Vol. 72. P. 5162–5171.
300. Киселев А.В., Яшин Я.И. Газо-адсорбционная хроматография. М.: Наука. 1967. С. 78.
301. Yamazaki H. A mathematical treatment of nonequilibrium chromatography // *J. Chromatogr. A*, 1967. Vol. 27. P. 14–19.
302. Gritti F., Guiochon G. Impact of retention on trans-column velocity biases in packed columns // *AIChE J.*, 2010. Vol. 56. P. 1495–1509.
303. Neue U.D. *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*; Wiley-VCH Verlag: New York, 1997. p. 22-23.
304. Miyabe K., Guiochon G. Thermodynamic characteristics of surface diffusion in reversed-phase liquid chromatography // *J. Phys. Chem. B*, 1999. Vol. 103. P. 11086–11097.
305. Gritti F. A stochastic view on column efficiency // *J. Chromatogr. A*, 2018. Vol. 1540. P. 55–67.