

В. А. Даванков

(Институт элементорганических соединений РАН, Москва)

ЛИГАНДОБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ХИРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

General aspects of direct resolutions of enantiomers using chiral chromatographic systems are briefly reviewed. They include the three-point interaction postulate, factors influencing enantioselectivity and efficiency of separation, effects of temperature and enantiomeric purity of the chiral selector.

Recent advances of ligand exchange chromatography on chiral stationary phases (both polymeric and organo-mineral), chiral coated phases as well as with chiral mobile phase additives are critically analyzed. Prospects of chiral ligand-exchanging thin-layer chromatography and capillary electrophoresis are shown.

Введение

Лигандообменная хроматография (ЛОХ) представляет собой один из наиболее типичных случаев комплексообразующей хроматографии. Комплексы, о которых идет речь в этих процессах, включают катионы металлов и лиганды (анионы или нейтральные молекулы), способные отдавать электронные пары на вакантные орбитали металла.

Первоначально катионы металлов в ЛОХ рассматривались как неотъемлемая часть неподвижной фазы. Еще в 1955 г. Брэдфорд и др. [1] использовали нитрат серебра, растворенный в полиэтиленгликоле, в качестве модификатора газохроматографической (ГХ) неподвижной фазы, который увеличивал время удерживания ненасыщенных углеводородов по сравнению с насыщенными. Очевидно, катионы Ag (I) проявляли здесь свою способность образовывать комплексы за счет взаимодействия с π -электронами двойных углерод-углеродных связей. Стоукс и Уолтон [2] показали, что катионы металлов, являющиеся частью катионообменной смолы, сохраняют способность образовывать комплексы с молекулами аммиака из водного раствора, находящегося в равновесии со смолой. Наконец, в 1961 г. Хелффериш [3] описал замещение органическими диаминами таких молекул аммиака, координированных вокруг ионов металла в фазе смолы, и наоборот. Он впервые использовал термин "лигандный

обмен", положив начало лигандообменной хроматографии как общему подходу к разделению соединений, которые образуют координационные связи с катионами металлов.

Позже было найдено, что координация с катионами металлов при простом добавлении последних в подвижной фазе в малых концентрациях может также внести большой вклад в хроматографическое разделение комплексообразующих растворенных веществ. В этом случае лигандный обмен происходит в подвижной фазе или как в подвижной, так и в неподвижной фазах.

Указанные выше системы соответствуют тому широкому определению лигандообменной хроматографии, которое было дано В. А. Даванковым и А. В. Семечкиным [4] и в котором положение катионов металла в хроматографической системе не задается, а просто к этому типу хроматографии относят процессы, в которых образование и разрыв неустойчивых координационных связей с центральным катионом металла является основной причиной разделения комплексообразующих растворенных веществ.

В соответствии с этим определением в книге В. А. Даванкова с соавт. [5] был проведен систематизированный анализ различных видов лигандообменных процессов. В данном обзоре мы рассматриваем только разделение энантиомеров с помощью хиральной лигандообменной хроматографии, представляющее собой наиболее важную и успешную область применения этого метода. Мы сосредоточим внимание на данных, опубликованных после 1985 г., которых не было в нашем распоряжении при подготовке монографии. Здесь следует упомянуть также два обзора, которые были опубликованы позднее: один по материалам для набивки колонок для ЛОХ [6] и другой — по разделению хиральных соединений с помощью ЛОХ [7].

Теоретические аспекты распознавания хиральных соединений в хроматографических системах

Механизм распознавания хиральных соединений. Стереохимические постулаты

Являются ли две молекулы зеркальных изомеров, например, природная аминокислота *L*-аланин и его зеркальное отображение *D*-изомер (энантиомер), действительно идентичными с термодинамической точки зрения? Действительно ли одинаковы их физические и химические свойства? Эти вопросы возникают время от времени, особенно в связи с решающим значением изомерной чистоты биомолекул для функционирования живых систем, а также в связи с исследованиями и гипотезами в области происхождения хиральности [8] и жизни. В соответствии с новейшими представлениями ответом на эти вопросы является "нет". *D*-Аланин оказывается менее стабильным приблизительно на 10^{-14} Дж/моль. Эффект невелик. При гипотетическом энантиомеризационном равновесии энантиомерный избыток *L*-изомера составит 10^{-6} % [9, 10]. К сожалению мы не владем количественным методом, который позволил бы обнаружить такое небольшое отклонение от пропорции 1:1 зеркальных изомеров в рацемической смеси. Нет также метода разделения, который мог бы использовать столь небольшую энергетическую неэквивалентность зеркальных изомеров для их распознавания. Поэтому по-прежнему справедлив первый важнейший стереохимический постулат, который гласит,

что для распознавания зеркальных изомеров и их разделения необходим специальный "хиральный селектор".

Второй постулат еще менее очевидный и чаще подвергается обсуждению. Он говорит о том, что для распознавания двух зеркальных изомеров хиральный селектор должен вступить в пространственно-зависимое (такое взаимодействие затрагивает атомы или группы по трем различным связям, исходящим от центра хиральности) трехточечное взаимодействие с одним из зеркальных изомеров. В этом случае соответствующие участки взаимодействия другого зеркального изомера окажутся неправильно ориентированными по отношению к этому селектору, в результате чего образуется менее стабильный диастереомерный двухконтактный комплекс. Требование трехточечного взаимодействия неизбежно вытекает [11] из геометрических представлений хирального распознавания трехмерных структур. Оно одинаково справедливо для энантиоселективности действия хиральных лекарств на специфические рецепторы [12], для энантиоспецифичности превращений прохиральных субстратов на природных ферментах [13] и для хроматографического разделения рацемических соединений на хиральных неподвижных фазах [14].

Однако во многих случаях на практике этот второй основной стереохимический постулат трудно подтвердить, так как реальные точки контакта хирального селектора с зеркальными изомерами чаще всего неизвестны. Кроме того, взаимодействие необязательно подразумевает непосредственный контакт. Влияние может оказываться на расстояниях, превышающих радиус Ван-дер-Ваальса. Поэтому вычисленные энергии образования двух диастереомерных комплексов оказываются разными [15] даже в случаях только двух- или одноточечных непосредственных контактов между хиральными компонентами этих комплексов [16]. Естественно, это происходит из-за того, что рассматриваются шестичентровые силы, действующие между триплетами атомов или функциональностей двух хиральных соединений, чтобы оценить разницу в энергиях между двумя возможными диастереомерными комплексами в терминах функций "перекрывание—обмен".

Энантиоселективность

Влияние поверхности сорбента модификаторов подвижной фазы, размеров и концентраций пробы

Расширением правила трехточечного взаимодействия является модель, в которой одно [17] или два [18] взаимодействия между компонентами комплекса осуществляются посредством третьей, нехиральной структуры. Эти нехиральные структуры в ЛОХ могут представляться поверхностью материала набивки колонки или молекулами растворителя, участвующими в образовании комплекса с центральным ионом металла. Поэтому энантиоселективность хроматографической системы может сильно зависеть от химии поверхности сорбента, а также от характера подвижной фазы.

Компоненты подвижной фазы могут, кроме того, изменить конформацию хирального селектора, а следовательно, величину [19, 20] или знак [21] энантиоселективности колонки. Труднее объяснить большие изменения избирательности разделения с изменением размеров пробы [22], а также случаи зависимости порядка элюирования от концентрации пробы при разделении зеркальных изомеров в таких конформационно жестких неподвижных хиральных фазах, как микрокристаллическая триацетилцеллюлоза [23].

Во всяком случае, приведенные примеры вскрывают множество факторов, которые влияют на механизм взаимодействия ближнего порядка между хиральным селектором и зеркальными изомерами, которые необходимо распознать и разделить. Эти факторы могут сильно изменить общую энантиоселективность хроматографических систем. Ясно, что для лучшего понимания механизма распознавания с помощью хиральных структур требуются тщательные исследования. До сих пор надежные результаты в этом направлении были получены только в лигандообменной хроматографии и хроматографии с образованием комплексов с переносом заряда [5, 24—26].

В хроматографии хиральных соединений были сделаны первые шаги по применению вычислительной химии, расчету абсолютных энергий взаимодействия хирального селектора с двумя зеркальными изомерами и корреляции полученных различий в энергиях взаимодействия с экспериментальными данными энантиоселективности хиральных хроматографических систем [27, 28]. Однако все расчеты до сих пор проводились для "газовой фазы", причем в комплексообразовании участвует только одна пара молекул. Поэтому неудивительно, что учет возможного влияния матрицы сорбента или растворителя делает все оценки времени удерживания или избирательности разделения ненадежными или даже невозможными. Чисто статистические хемометрические подходы, описывающие хроматографические свойства ряда рацемических соединений для данной хиральной фазы [29, 30], по-видимому, позволяют получить более надежные оценки.

Энантиоселективность и свободные энергии связи энантиомеров с хиральным селектором

Другим важным теоретическим вопросом является связь между общей энантиотивностью (α) хроматографической колонки, представляющей собой отношение факторов двух зеркальных изомеров (k'_L / k'_R), и разницей в свободных энергиях связи зеркальных изомеров с хиральным селектором ($\delta \Delta G^0$). В соответствии с выражением

$$\delta \Delta G^0 \geq -RT \ln \alpha$$

энантиоселективность колонки может приближаться к теоретическому значению, определяющемуся энантиоселективностью прямого взаимодействия между селектором и энантиомерами тогда, когда отсутствуют дополнительные, неселективные взаимодействия растворенного вещества с неподвижной фазой. Если хиральный селектор является частью неподвижной фазы (хиральная неподвижная фаза (ХНФ)), газомер, связываемый более сильно, будет дольше находиться в колонке. И наоборот, если хиральный селектор находится полностью в подвижной фазе (хиральная подвижная фаза (ХПФ)), а молекулы растворенного вещества задерживаются набивкой колонны другим, неспецифическим путем, зеркальный изомер, который образует более прочные комплексы с селектором, будет элюироваться первым. На практике хиральная добавка к ХПФ, а также ее комплексы с зеркальными изомерами растворенного вещества стремятся распределиться между двумя фазами. В этом случае хиральное распознавание колонки (α) в грубом приближении определяется от-

ношением энантиоселективностей комплексообразования в неподвижной и подвижной фазах [31].

Следует отметить, что хроматография, будучи уникальным методом разделения, который накапливает результаты разделения очень большого числа отдельных актов взаимодействия растворенное вещество — сорбент, успешно использует хиральные селекторы, которые имеют низкие способности распознавания. Небольшая термодинамическая энантиоселективность $\delta \Delta G^0 = 0,024$ кДж/моль, соответствующая значению a , равному 1,01, уже достаточна для полного расщепления многих рацематов с помощью хроматографических колонок с числом тарелок около $1,5 \times 10^5$ (которое легко реализовать в колонках капиллярной газовой хроматографии). Никакой другой метод разделения не мог бы базироваться на таких низких селективностях.

При увеличении $\delta \Delta G^0$ селективность колонки a экспоненциально возрастает. При увеличении значения $\delta \Delta G^0$ вдвое a может достичь величины, равной квадрату ее первоначального значения, как показано в работе Пиркла и Почапского [32], за счет образования "димерного" растворенного вещества, которое взаимодействует одновременно с двумя хиральными центрами сорбции неподвижной фазы.

Повышение избирательности разделения зеркальных изомеров

Другим надежным, хотя на практике и неудобным, методом повышения избирательности разделения зеркальных изомеров в хроматографических системах является комбинация хиральной неподвижной и хиральной подвижной фаз. Для реализации комбинации необходимо связать хиральный селективный элемент с матрицей сорбента и добавить его зеркальный изомер к подвижной фазе [33—35]. Аналогично этому возможны комбинации любых совершенно разных хиральных селекторов в неподвижных и подвижных фазах, хотя публикаций на эту тему еще не было.

Если пики зеркальных изомеров в сложной хроматограмме перекрываются с линиями элюирования других хиральных или нехиральных компонентов пробы, можно рекомендовать использование комбинации хиральной колонки с нехиральной, в которой работают совершенно иные механизмы удерживания [36]. В такой тандемной системе в одной колонке будет происходить разделение изомерных пар, а в другой одно растворенное вещество будет дополнительно отделяться от другого. Последовательность соединения двух колонок не имеет значения.

Хроматография со спаренными колонками может также использоваться для захвата и сжатия пиков элюированных изомеров, что обеспечивает возможность их последующей количественной обработки с повышенной чувствительностью и прочностью [37]. Таким образом, хроматография со спаренными колонками или, в общем случае, многомерная хроматография, может обеспечить общий подход к улучшению анализа сложных смесей хиральных и нехиральных соединений.

Энантиомерная чистота хирального селектора. Рацемизация

Помимо приведенных выше принципиальной возможности успешного использования хиральных селекторов с низкой распознающей способностью и комбинирования механизмов удерживания на основе энантиоселективных и неселективных взаимодействий растворенного вещества с сорбентом в одной хроматографической системе, здесь следует подчеркнуть еще одно большое преимущество хирального хроматографического разделения. Во всех классических методах разделения рацематов недостаточная энантиомерная чистота хирального селектора неизбежно приводила к эквивалентной потере энантиомерной чистоты или падению выхода продукта разделения. Однако в хроматографии можно получить количественно оба зеркальных изомера в энантиомерно чистом состоянии даже в том случае, когда хиральный селектор имеет энантиомерную чистоту P ниже 100 %. Как видно из рис. 1 [38], в сочетании с хроматографическими методами даже селекторы с низкой энантиомерной чистотой могут дать величины селективности a колонки, более чем достаточные для полного разделения зеркальных изомеров растворенных веществ. Соотношения между a и P были найдены как на основе теоретического рассмотрения проблемы [39], так и на основе экспериментальных исследований хиральных систем газовой хроматографии [40] и жидкостной хроматографии [41, 42]. Последние показали также, что энантиомерные примеси в хиральном селекторе не приводят к снижению эффективности колонны, а просто дают два острых энантиомерных пика, приближающихся друг к другу и полностью сливающихся в один пик $k' = 0,5 (k'R + k'S)$, когда энантиомерная чистота селектора падает до нуля.

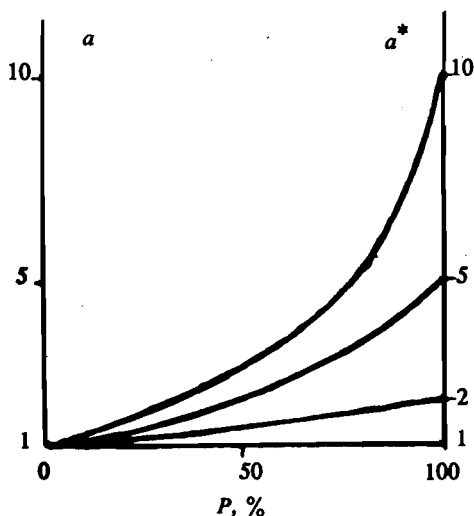


Рис. 1. Зависимость энантиоселективности a трех произвольных хроматографических систем от энантиомерной чистоты P используемых хиральных селекторов. Предельная энантиоселективность a^* этих систем 10, 5 и 2 (по [38]).

Относительная нечувствительность хиральных соединений к энантиомерной чистоте селектора может быть особенно важна для лигандообменных систем, поскольку известно, что ионы переходных металлов являются катализаторами рацемизации природных аминокислот, наиболее распространенных хиральных селекторов в ЛОХ. Ясно, что частичная рацемизация селективного элемента повлияет на разделительную способность колонки незначительно. Тем не менее, была исследована конфигурационная стабильность хиральных селекторов в лигандообменных смолах и найдено, что N -замещенные производные аминокислот, в частности N -бензилированные аминокислоты, в условиях эксплуатации смол стабильны [43].

Разумеется, в ходе хроматографического процесса в хиральной колонке разделяемые зеркальные изомеры также могут претерпевать рацемиза-

цию (энантиомеризацию). Эта ситуация наблюдалась Шуриголь с соавт. [44, 45] во время газохроматографического анализа конфигурационно неустойчивого 1-хлоро-2, 2-диметилазиридина в соответствии с лигандообменным механизмом. При этом процесс умеренной энантиомеризации проявляется в том, что кривая элюирования между пиками изомеров не приближается к нулевой базовой линии, а образует плато. Оно соответствует молекулам, конфигурация которых в колонке инвертировалась и которые теперь двигаются со скоростью антипода. По высоте и форме плато можно рассчитать кинетические параметры энантиомеризации.

Аналогичные явления наблюдались также в жидкостной хроматографии. Маншрек и соавт. [46—49] показали, что два пика зеркальных изомеров сильно перекрываются, когда высота энергетического барьера энантиомеризации не превышает 90—100 кДж/моль. В этом случае эксплуатация колонки при более низких температурах замедляет процесс инверсии и значительно ухудшает разделение.

Температурные эффекты

Применение разделения зеркальных изомеров при пониженных температурах в лигандообменной хроматографии распространено меньше, поскольку лигандный обмен представляет собой сравнительно медленный процесс и поэтому для получения приемлемого числа теоретических тарелок в ЛОХ часто требуется поднять температуру колонки до 50—75 °С.

В этой связи следует помнить, что повышение температуры (до определенного предела, зависящего от химической и конфигурационной стабильности всех компонентов системы) повышает скорость взаимодействия растворенного вещества с сорбентом и коэффициенты диффузии, что приводит обычно к повышению эффективности колонки. В противоположность этому энантиоселективность такого разделения может либо увеличиваться, либо уменьшаться с повышением температуры. Можно ожидать, что между логарифмом селективности ($\ln a$) и величиной, обратной температуре ($1/T$), существует линейная зависимость [38, 50, 51]. При этом должна существовать некоторая точка, где $\ln a = 0$ и оба пика зеркальных изомеров выходят с одинаковыми значениями k' . При прохождении этой точки T_{inv} в любом направлении должно происходить зависящее от температуры инвертирование порядка элюирования двух изомеров. И действительно, это явление наблюдалось как при газохроматографическом [52, 53], так и при жидкостно-хроматографическом [54] разделении зеркальных изомеров. Хотя в большинстве случаев отмечалось уменьшение значений a с увеличением температуры, в ЛОХ наблюдался один пример [55] повышения селективности при увеличении температуры.

Более подробную информацию о вышесказанном и некоторых дополнительных теоретических аспектах распознавания хиральных соединений в хроматографических системах можно найти в обзорных работах [23, 38, 57]. Практические же достижения в области хроматографического разделения хиральных соединений являются предметом последних монографий [58, 59] и ряда обзоров [24, 26, 60—65].

При этом если хиральный селектор смолы принадлежал к конфигурационный $L(S)$ серии природных аминокислот, $D(R)$ изомеры подвижного лиганда образовывали более прочные сорбционные комплексы. Соответственно, при элюировании водой в элюате можно было обнаружить только L -аминокислоты, в то время как вытеснение D -изомера требовало использования в качестве элюента раствора аммиака (рис. 2). Эти первые разделения зеркальных изомеров показали уникальную энантиоселективность лигандообменных систем и привлекли к этому методу внимание многих исследователей.

Для получения хиральных лигандообменников в полистирольную сетку было включено большое число других α -аминокарбоновых и α -аминофосфоновых кислот (табл. 1). Чтобы избежать нежелательной реакции с активной хлорметильной группой полимера и таким образом получить однозначную структуру центров сорбции, В. А. Даванков с сотр. применял временную защиту всех функциональных групп хирального селектора.

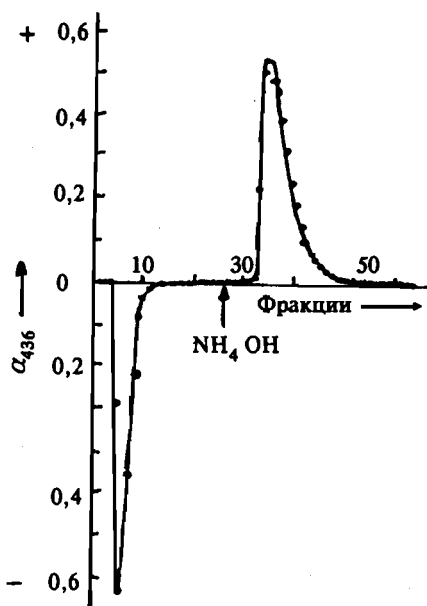


Рис. 2. Разделение 0,5 г DL -пролина в колонке (475×9 мм), содержащей 11 г насыщенной медью (II) смолы полистирольного типа L -пролином ($2,3$ ммоль/ч) в качестве хирального селектора. Размер частиц $dp = 30-50$ мкм, скорость потока $7,5$ мл/ч, комнатная температура, поляриметрический детектор в кювете $0,5$ дм. По оси абсцисс — число фракций (по [242]).

Таблица 1

Хиральные хелатные лиганды,
закрепленные на полистирольной матрице

Фиксированный лиганд	Емкость, ммоль/ч	Ссылки	Емкость, ммоль/ч	Ссылки
1	2	3	4	5
Аланин	2,2	[72]	—	—
Валин	2,3	[73]	—	—
Лейцин	—	—	1,5	[74]
Изолейцин	2,5	[73]	—	—
Пролин	2,3	[75]	1,5	[76]
Серин	3,0	[72]	—	—
Треонин	2,9	[72]	—	—
Тирозин	2,2	[72]	—	—
Гидроксипролин	3,0	[72]	—	—
Аллогидроксипролин	3,2	[75]	—	—
Аспарагиновая кислота	2,5	[77]	—	—

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5
Пироглутаминовая кислота	2,2	[77]	—	—
Диаминомасляная кислота	2,2	[77]	—	—
1-Аминобутиролактam	2,3	[77]	—	—
ε-Лизин*	1,7	[79]	—	—
Гистидин	2,0	[80]	0,6	[81]
Метионин	2,1	[82]	—	—
Метионин (dl)-сульфоксид	2,1	[83]	—	—
Метионин (d)-или (l)-сульфоксид	2,2	[84]	—	—
S-Цистеин*	2,3	[85]	—	—
Цистеиновая кислота	1,2	[86]	—	—
o-Гидроксипролин	1,0	[75]	—	—
Азетидин-карбоновая кислота	2,4	[87]	—	—
Фенилаланин	2,1	[88]	—	—
AP-фенилаланин*	1,1	[88]	—	—
N-карбоксиметилвалин	1,5	[89]	0,5	[90]
N-карбоксиметиласпарагиновая кислота	1,2	[89]	—	—
S-карбоксиметилцистеин	1,6	[91]	—	—
S-(2-аминоэтил)цистеин	1,8	[91]	—	—
S,S'-этиленбисцистеин	1,1	[91]	—	—
N,N'-этиленбисметионин	0,9	[91]	—	—
1-аминобензилфосфоновая кислота	2,0	[92]	—	—
1-амино-1-метилбензилфосфоно- вая кислота	0,9	[93]	—	—
1-амино-1-метилпропилфосфоно- вая кислота	0,6	[93]	—	—
1-амино-1-метилгептилфосфоно- вая кислота	0,8	[93]	—	—
Моноэтиловый эфир 1-аминобен- зилфосфоновой кислоты	2,2	[92]	—	—

Примечание. Звездочка означает, что центры связи находятся не в α-аминогруппе.

Другая отличительная особенность сорбентов, созданных этой группой исследователей, заключается в "изопористой макросеточной" структуре полистирольной сетки. Последняя формировалась путем сшивания линейных полимерных цепей в растворе с помощью алкилирования их фенильных колец бифункциональными реагентами, например, *l*-ксилилендихлоридом в соответствии с реакцией Фриделя—Крафтса [68—71]. Наиболее важные параметры изопористых макросеточных смол — это их повышенная способность к набуханию, устойчивость к давлению, высокие обменная емкость, проницаемость и кинетические свойства. Эти смолы продемонстрировали гораздо более высокую разделительную способ-

ность и хроматографическую эффективность, чем продукты реакций обычных сополимеров стирол/дивенилбензол и незащищенных аминокислот.

Типичная процедура для получения эффективных хиральных лигандообменных смол [72] включает реакцию *n*-хлорметилированного макросеточного изопористого полистирола (степень сшивания 5—10 %) с гидроксидом метилового эфира аминокислоты (молярное отношение 1:1,1) в смеси диоксана с метанолом (6:1 по объему) в присутствии иодида натрия и бикарбоната натрия (0,3 и 2,5 моля соответственно) при температуре 50—60 °С. После этого проводится гидролиз метиловых эфиров в нейтральной содержащей медь (II) или слабощелочной среде. При таких условиях можно ввести до 2,0—2,8 ммоль групп хирального аминокислотного селектора на 1 г смолы без рацемизации аминокислоты.

Другие многообещающие серии хиральных лигандообменных фаз полистирольного типа содержат диамины [94] в качестве хиральных селекторов, а также продукты реакции хлоросульфонируемого полистирола с аминокислотами [95, 96]. В последнем случае SO₂-группы связывают аминофункционацию селектора с фенильными кольцами полимерной матрицы.

Из всех сорбентов на полистирольной основе наиболее избирательными и эффективными оказались те, которые в качестве хиральных элементов содержат циклические аминокислоты или алкилированный пропандиамин -1, 2. Как видно из табл. 2, в комбинации с ионами меди (II) они разделяют рацемические смеси всех природных аминокислот. С очень высокими значениями избирательности они также разделяют некоторые рацемические оксикислоты, аминокамиды, β-аминокислоты и аминокислоты, а также другие комплексобразующие соединения [100]. Благодаря высокой энантиоселективности можно легко выполнять разделения на препаративном уровне. Так, до 20 г *DL*-пролина или 6 г треонина количественно разделялись со значениями энантиоселективности *a* 3,95 и 1,52 соответственно в колонке, содержащей 300 г полистирольной смолы на основе *L*-гидроксипролина [100]. С помощью смол этого же типа получают в производственном масштабе аминокислоты с тритиевыми метками в оптически, радиохимически и хроматографически чистом состоянии [101—103]. Разумеется, возможны также быстрые разделения на аналитическом уровне [99, 104, 105], так как макросеточная изопористая структура полимерной матрицы обеспечивает достаточно быстрый массоперенос и получение высокоэффективных набивок колонок.

Механизм хирального распознавания зеркальных изомеров аминокислот при формировании диастереомерных сорбционных комплексов в полимерной фазе был предметом тщательного исследования в работах [5, 24, 25, 55]. Важными особенностями модели распознавания, предложенной В. А. Даванковым и А. А. Кургановым [55], являются: а) специфическая информация *N*-бензилпролинового лиганда неподвижной фазы, при которой одна из аксиальных позиций координационной сферы ионов меди (II) недоступна для дополнительных лигандов по пространственным причинам, б) фиксация молекул воды или аммиака во второй аксиальной позиции. Если хиральная неподвижная фаза имеет *L*-конфигурацию, упомянутую выше, аксиально координированная молекула воды препятствует образованию сорбционных комплексов с *L*-аминокислотами. Напротив, боковые α-группы *D*-аминокислот оказываются вблизи полистирольной цепи и вступают с ней в гидрофобные взаимодействия, что дополнительно стабилизирует *D-L*-смешаннолигандный комплекс и способствует увеличению времени удерживания *D*-изомеров в хроматографической колонке.

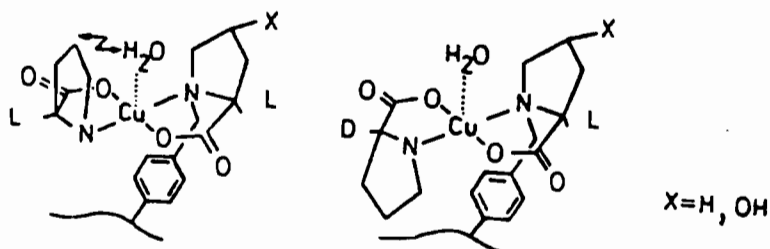


Таблица 2

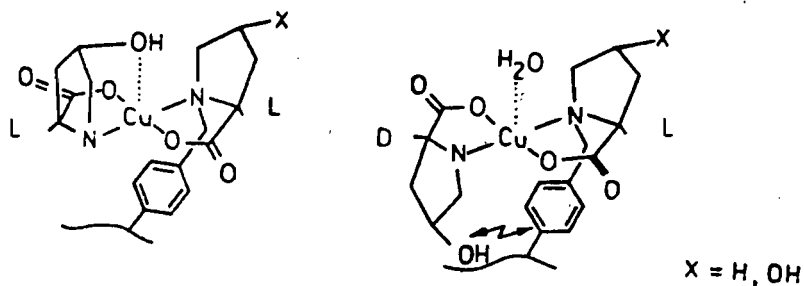
Селективность $\alpha = k'_D / k'_L$ при расщеплении рацемических аминокислот на заряженных Cu (II) полистирольных смолах (\bar{R}), содержащих остатки *L*-пролина (*R* Pro) [87], *L*-гидропролина (*R* Hyp) [97], *L*-аллогидроксипролина (*R* aHyp) [98], *L*-азетидин-карбоновой кислоты (*R* Az CA) [86] и *N'*-бензил (*R*)-пропандиамина - 1,2 (*R* Bzpn) [99]

Рацемическая аминокислота	\bar{R} Pro	\bar{R} Hyp	\bar{R} aHyp	\bar{R} Az CA	\bar{R} Bz pn
1	2	3	4	5	6
Аланин	1,08	1,04	1,04	1,06	0,70
Аминомасляная кислота	1,17	1,22	1,18	1,29	0,49
Норвалин	1,34	1,65	1,42	1,24	0,48
Норлейцин	1,54	2,20	1,46	1,40	0,49
Валин	1,29	1,61	1,58	1,76	0,31
Изовалин	—	1,25	—	—	—
Лейцин	1,27	1,70	1,54	1,24	0,49
Изолейцин	1,50	1,89	1,74	1,68	0,62
Серин	1,09	1,29	1,24	2,15	0,62
Треонин	1,38	1,52	1,48	0,78	0,44
Аллотреонин	1,55	1,45	—	—	—
Гомосерин	—	1,25	—	—	—
Метионин	1,04	1,22	1,52	1,29	0,60
Аспарагин	1,18	1,17	1,20	1,44	0,70
Глутамин	1,20	1,50	1,40	1,25	—
Фенилглицин	1,67	2,22	1,78	1,38	0,49
Фенилаланин	1,61	2,89	3,10	1,86	0,52
α -Фенил- α -аланин	—	1,07	—	—	0,38
Тирозин	2,46	2,23	2,36	1,78	—
Фенилсерин	—	1,82	—	—	—
Пролин	4,05	3,95	1,84	2,48	0,47

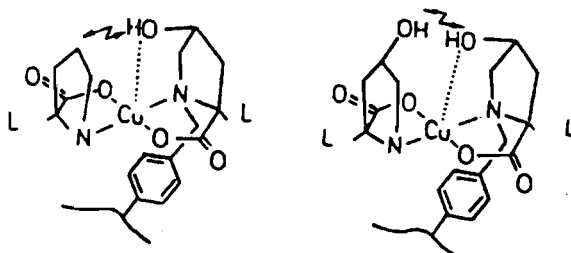
Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6
Пролин	4,05	3,95	1,84	2,48	0,47
Гидроксипролин	3,85	3,17	1,63	2,25	—
Аллогидроксипролин	0,43	0,61	1,48	1,46	—
Азетидин-карбоновая кислота	—	2,25	—	—	—
Орнитин	1,00	1,00	1,20	1,00	1,00
Лизин	1,10	1,22	1,33	1,06	1,00
Гистидин	0,37	0,36	1,32	0,56	0,85
Триптофан	1,40	1,77	1,10	1,13	—
Аспарагиновая кислота	1,91	1,00	0,81	0,88	1,00
Глутаминовая кислота	0,62	0,82	0,69	0,77	—

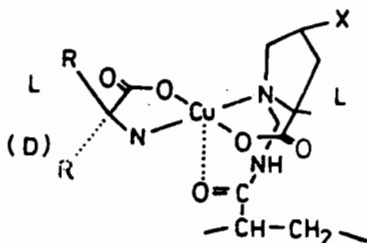
С другой стороны, тридентатные аминокислотные лиганды образуют более стабильные комплексы, если они принадлежат к конфигурационной серии *L*. Это обстоятельство объясняет найденный экспериментально факт, что *L*-аллогидроксипролин, *L*-гистидин, *L*-аспарагиновая и *L*-глутаминовая кислоты элюируются из хиральной неподвижной фазы вторыми



В случае смолы, содержащей *L*-аллогидроксипролин, бифункциональные и трифункциональные аминокислоты могут действовать только как бидентатные подвижные лиганды и всегда элюируются в последовательности *L* перед *D*

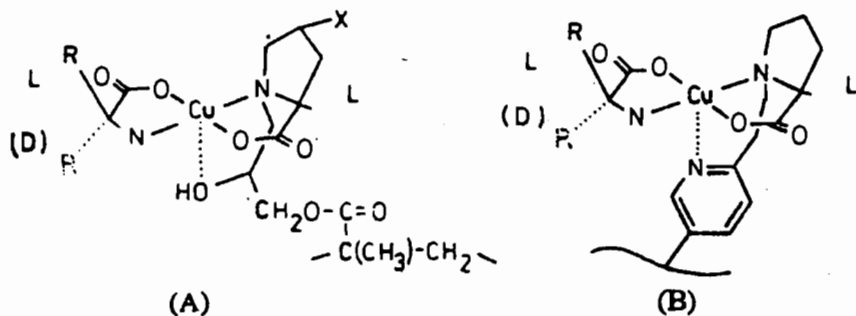


постоянную координацию амидной карбонильной группы в аксиальной координационной позиции иона меди [108, 111, 112]. При такой ориентации только для *L*-аминокислот найдется достаточно места для свободного вращения их α -группы в смешанно лигандном комплексе



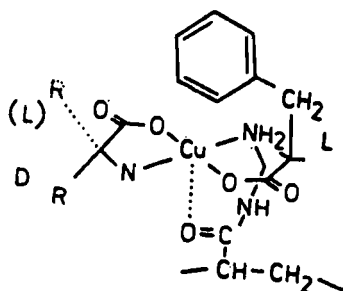
В соответствии с этим *L*-изомеры задерживаются в хиральной колонке дольше, чем *D*-изомеры. Только пролин является исключением из этого правила, вероятно потому, что его циклический заместитель *R* не может вращаться вокруг связи с α -углеродным атомом. Поэтому *D*-пролин образует более прочные смешанные лигандные комплексы, оставляя верхнюю аксиальную координационную позицию для молекулы растворителя.

3. Матрицы из полиметакрилата и поливинилпиридина. Интересно, что аналогичные механизмы удерживания зеркальных изомеров аминокислот характерны и для хиральных смол, содержащих *L*-пролин или *L*-гидроксипролин в эпоксиактивированном полиметилакрилате [113] и в матрице из поливинилпиридина [114,115]



Здесь опять-таки *L*-аминокислоты, за исключением пролина, оказываются более долго задерживающимися сорбатами.

С другой стороны, *L*-фенилаланин, привитый к полиакриламидной матрице [103], проявляет более высокое сродство к *D*-изомерам всех аминокислот без исключения, осуществляя разделение всех рацематов при значении энантиоселективности не менее 1,3



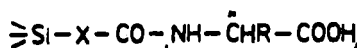
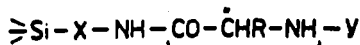
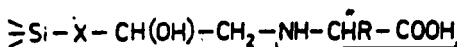
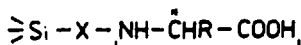
При связывании с эпихлоргидрин-активированным гидрофильным полимером TSK 2000W *L*-фенилаланин, *L*-триптофан и *L*-гистидин [116] демонстрируют гораздо более низкую разделительную способность и нерегулярный порядок элюирования зеркальных изомеров.

Информацию по термодинамике лигандного обмена в хиральных смолах можно найти в ряде работ [112,117,118] и в более сжатом виде в обзорах [5,25,119].

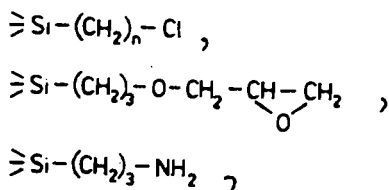
Привитые хиральные лигандообменные фазы на основе пористого кремнезема

С созданием устойчивых к давлению микродисперсных силикагельных набивок для ВЭЖХ появилось новое поколение хиральных лигандообменных фаз с хиральными комплексообразующими селекторами, химически связанными с поверхностью макропористой двуокиси кремния. Эти разработки базировались на сведениях, полученных ранее для множества полимерных хиральных фаз. Поэтому наиболее эффективные хиральные селективные элементы — циклические аминокислоты пролиновой серии — были привиты к поверхности неорганической матрицы. Позднее в процессах синтеза начали использоваться другие типы хиральных селекторов, наиболее важными были хиральные диамины и винная кислота.

1. Классификация типов связи. В зависимости от типа связи, используемой для соединения хирального селектора с поверхностью, привитые фазы можно разделить на следующие основные группы:



Первые три типа привитых хиральных фаз были предложены в 1979 г. тремя независимыми группами исследователей одновременно. Они различаются только способом связывания аминокислоты с исходным минералоорганическим материалом. Последний содержал активные хлоралкильные, 3-глицидоксипропильные и 3-аминопропильные группы соответственно

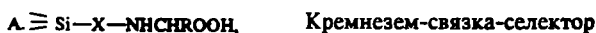


которые легко могут реагировать с амино- или карбоксильной функцией хирального селектора. Можно применить несколько стратегий синтеза, которые оказывают влияние на эффективность хиральных неподвижных фаз, но их энантиоселективность в значительной степени зависит лишь от химической структуры хиральных центров сорбции.

Сводный перечень хиральных привитых лигандообменных фаз дается в табл. 3. Можно видеть, что структура этих фаз сильно напоминает структуру рассмотренных выше полимерных лигандообменных фаз, а это позволяет судить и о структурах диастереомерных сорбционных комплексов, которые образуются при взаимодействии с подвижными лигандами.

Таблица 3

Хиральные лигандообменные кремнеземсвязанные фазы

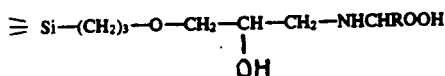


Связка X	Селектор	Рацемические сорбаты	Ссылки
$-(\text{CH}_2)_2\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$	<p style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH} \quad \text{X} \\ \quad \diagup \\ \text{N} \quad \text{CH} \quad \text{CH}_3 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ </p>	Аминокислоты	[120, 121]
$-(\text{CH}_2)-$		"	[121, 122]
$-(\text{CH}_2)_3-$		"	"
$-(\text{CH}_2)_4-$	<i>L</i> -пролин (X = H) и <i>L</i> -гидроксипролин (X = OH)	"	[121, 122]
$-(\text{CH}_2)_{11}-$	<i>L</i> -пролин	Аминоспирты как основания Шиффа	[125, 126]

Продолжение табл. 3



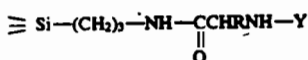
Связка X	Селектор	Рацемические сорбаты	Ссылки
$-(\text{CH}_2)_{10}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$	$\begin{array}{c} \text{--NH--CH--COOH} \\ \\ \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ L\text{-валин} \end{array}$	Дансил-аминокислоты	[127]



Селектор	Рацемические сорбаты	Ссылки
1	2	3
<i>L</i> -пролин <i>L</i> -пролин, <i>L</i> -гидроксипролин <i>L</i> -валин, <i>L</i> -гистидин <i>L</i> -пролин, <i>L</i> -гидроксипролин, <i>L</i> -азетидин-карбоновая кислота <i>L</i> -пипеколиновая кислота <i>L</i> -фенилаланин <i>L</i> -пролин <i>L</i> -пролин <i>L</i> -гидроксипролин <i>L</i> -пролин, <i>L</i> -гидроксипролин <i>L</i> -азетидин-карбоновая кислота, <i>L</i> -пипеколиновая кислота, упоминаются также <i>L</i> -валин, <i>L</i> -гистидин, <i>L</i> -фенилаланин <i>L</i> -эфедрин и <i>L</i> -винная кислота 2-амино - 1,2-дифенилэтанол $\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Аминокислоты " " " " Диодотиронин, триодотиронин, тироксин [132] α -(Урацил- <i>N'</i>)-аланин [133] Оксикислоты [134] Аминокислоты, включающие <i>o</i> -метил-ДОФА, тетра-, три- и диодотиронин; [135] гистидин-метиловый эфир дансил-аминокислоты; глицил-аминокислоты; <i>DL</i> -лейцил- <i>DL</i> -лейцин, - <i>DL</i> -тирозин, оксикислоты Ser, Thr, Phe, Asp	[128, 129] [130] [131] [132] [133] [134] [135] [136,137]

Продолжение табл. 9

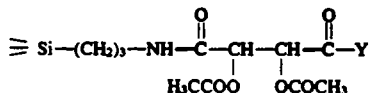
1	2	3
<p>2-карбоксиметиламино-1, 2-дифенилэтанол</p> $\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \quad \\ \text{NO} \quad \text{NH}-\text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$	Ala, Glu	[137]
<p>2-амино-1, 2-дифенилэтанол и 2-карбоксиметиламино-1,2-дифенилэтанол</p>	Аминокислоты, бензилоксикарбонил-аминокислоты, ацетилтриптофан, фенилаланин-амид, бензилгидантонин, оксикислоты	[138]
<p><i>транс</i>-Циклогексан-1, 2-диамин</p>	Аминокислоты, миндальная кислота	[139,140]



Селектор	Ациловая группа Y	Рацемические сорбаты	Ссылки
1	2	3	4
<p><i>L</i>-пролин</p> $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \\ -\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{NH} \end{array}$	Нет	Trp, Phe, Tyr давсиламинокислоты	[141] [142]
<p><i>L</i>-валин</p> $-\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{O}$	"	Ser, Glu, Trp	[143]
<p><i>L</i>-гистидин</p> $\begin{array}{c} -\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{N} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{NH} \\ \quad \quad / \quad \backslash \\ \quad \quad \text{CH} \quad \text{N} \end{array}$	"	Аминокислоты, миндальная кислота	[144]
<p><i>L</i>-треонин</p> $-\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3 \\ \\ \text{O}$	"		[145]

Продолжение табл. 3

1	2	3	4
<i>L</i> -валин и <i>L</i> -пролин	Трет-бутил- оксикарбонил $\begin{array}{c} \text{---C---O---C(CH}_3\text{)}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	Дансиламиноокислоты	[146]



1	2	3	4
<i>L</i> (+) -винная кислота	--ОН	Аминокислоты, включая ДОФА, метил-ДОФА, 3-О-метил-ДОФА, миндальная кислота, адреналин, норадреналин	[147]
<i>L</i> (+) -винная кислота, ди-ацетил- (<i>R</i> или <i>S</i>) - α -метил-бензиламин	--NH--CH(CH ₃)C ₆ H ₅	Примеров нет	[148]

Серийно выпускаемые хиральные лигандообменные сорбенты

Фирменное название	Рацемические сорбаты	Ссылки
1	2	3
Хиралпак WH	Кинурелин, α -метил-Leu, α -метил-Met, 3-фтор-Tгp	[149]
Хиралпак WH	Дансил-аминокислоты	[150]
Хиралпак WH, WE, WM	Аминокислоты	[151]
Нуклеозил Хирал 1	α -алкил- α -аминокислоты	[152-154]
Хирал Прокупрум, Хирал-Гипро-Купрум, Хирал Вал Купрум	N-метил- α -аминокислоты	[154]
Нуклеозил Хирал 1	Оксикислоты	[155]

Кремнеземсвязанные полистиролы

1	2	3
<i>L</i> -пролин, <i>L</i> -гидроксипролин	Аминокислоты	[159]
<i>N'</i> -бензил-(<i>R</i>)-пропандиа- миц		[5, 7]

Эти смешаннолигандные комплексы являются единственной причиной хирального распознавания подвижных лигандов на хиральных привитых фазах. Поэтому увеличение степени образования смешаннолигандных комплексов всегда приводит к повышению энантиоселективности колонки.

2. Роль рН и ионов неорганических соединений. Важнейшим фактором, влияющим на комплексообразующую способность аминокислот и их производных, является рН подвижной фазы. Незамещенные и *N*-алкилзамещенные аминокислоты в сочетании с ионами меди (II) образуют бис (аминокислотные) медные комплексы в достаточных количествах при значениях рН 4 и выше. Когда аминная и (или) карбоксильная функция лиганда неподвижной фазы и (или) растворенного вещества превращается в амидную функцию, требуются более высокие значения рН, так как карбонильный кислород амидной группы является слабым донором электронов и, следовательно, слабым лигандом. Лишь при освобождении амидного протона в щелочной среде амидная группа превращается в сильный отрицательно заряженный лиганд. Поэтому увеличение рН элюента будет всегда приводить к увеличению как разделения, так и времени удерживания зеркальных изомеров растворенного вещества. На практике рН подвижной фазы не должен превышать 9, когда большинство кремнеземсвязанных фаз становится фактически нестабильными из-за частичного растворения матрицы неорганического материала и отщепления связанного лиганда.

Если вместо ионов меди (II) используются ионы никеля (II), цинка (II) или кадмия (II), комплексы, формирующиеся с аминокислотным лигандом, обычно менее стабильны. Поэтому с этими ионами для достижения приемлемых значений времени удерживания и разделяющей способности следует использовать более высокие значения рН элюента.

Величина рН элюента, как правило, стабилизируется с помощью буферной соли, обычно вторичного кислого фосфата натрия в слабокислых буферных растворах и уксуснокислого аммония в щелочных буферных растворах. В последнем случае присутствие молекул аммиака помогает избежать осаждения гидроксида меди из элюента благодаря частичному образованию медно-аммиачных комплексов. Способность ионов буферного раствора участвовать в реакциях комплексообразования и таким образом конкурировать с подвижными и неподвижными лигандами за "место у центрального металлического иона" сильно влияет на время удерживания растворенных веществ в лигандообменных хроматографических колонках. Таким образом, время удерживания зеркальных изомеров может быть снижено до требуемого уровня путем повышения концентрации буферной соли, что окажет лишь незначительное влияние на энантиоселективность системы.

И действительно, последнее утверждение подтверждается для многих систем, в которых ионы неорганических соединений в образовании диастереомерных смешаннолигандных комплексов не участвуют. Однако известны случаи сильной зависимости энантиоселективности от концентрации аммиака [87,102] или пиридина [156] в элюенте, что говорит о вовлечении этих аминов в координационную сферу диастереомерных комплексов селектора сорбатом, что изменяет стереохимические контакты между этими двумя основными хиральными лигандами.

Вторым важным компонентом неорганической природы в подвижных фазах, использующихся в лигандообменной хроматографии, является соль комплексообразующего иона металла. Очевидно, что благодаря быстрому лигандному обмену комплексообразующие ионы распределяются между не-

подвижной и подвижной фазами (в соответствии с общими комплексообразующими способностями этих двух фаз в состоянии равновесия). Следовательно, в процессе работы колонка теряет некоторое количество комплексообразующего металла с подвижной фазой. Для сохранения равновесия и стабилизации хроматографических параметров (удерживание и селективность) системы на оптимальном уровне необходимо добавлять некоторое количество соли переходного металла к подвижной фазе. Обычно хроматографические параметры проявляют экстремальную зависимость от концентрации соли меди (II) с оптимальной величиной порядка $10^{-5} + 10^{-4}$ М. Более высокие и более низкие концентрации соли могут, вообще говоря, ухудшить разделяющую способность. Природа аниона соли в буферных растворах не имеет значения, но может некоторым образом повлиять на разделение в подвижных фазах с очень низкой ионной силой, например, через рН подвижной фазы [157].

3. Электростатическое и гидрофобное взаимодействия. В то время как образование смешаннолигандных сорбционных комплексов определяет хиральное распознавание подвижного лиганда, два дополнительных вида взаимодействия между сорбентом и растворенным веществом, а именно, электростатическое и гидрофобное, влияют на величину удерживания последнего.

Электростатический заряд неподвижной хиральной фазы может быть связан с ионогенными группами как самого селектора, так и неорганической матрицы. Если хиральный селектор имеет аминокислотную природу, то заряд будет меняться от положительного до отрицательного при изменении рН элюента с кислотного на щелочной. При комплексировании с катионом двухвалентного переходного металла каждый центр сорбции набивки имеет единичный положительный заряд. Относительное удерживание молекул растворенных веществ с разными зарядами часто можно связать с зарядами центра сорбции, в особенности, если имеет место дефицит комплексообразующих металлических ионов.

Если покрытие поверхности двуокиси кремния химически связанным слоем органического вещества является неполным, поверхностные силанольные Si — OH — группы могут диссоциировать в щелочной среде и вступать в сильное взаимодействие с катионными растворенными веществами. Это в самом деле происходит в случае малых спейсерных групп, например, —CH₂ —, отделяющих лиганд (L-пролин) от поверхности матрицы [122]. В этом случае электростатические взаимодействия с доступными силанольными группами проявляются в том, что основной лизин оказывается наиболее сильно удерживаемым сорбатом из всей серии аминокислот. С другой стороны, лизин становится удерживаемым сорбатом на набивках, имеющих длинные разделительные группы, например, —(CH₂)₈, которые эффективно экранируют поверхностные силанолы.

Естественно, электростатические взаимодействия могут быть ослаблены при использовании подвижных фаз с большой ионной силой.

При увеличении размера алкильных спейсерных групп неподвижная фаза набивки становится все более гидрофобной. Крупные молекулы сорбатов с доступными алкильными или арильными группами могут теперь стать наиболее сильно удерживаемыми молекулами. Влияние гидрофобного взаимодействия на общую величину удерживания таких растворенных веществ может быть продемонстрировано путем добавления органических модификаторов, например, ацетонитрила, метанола или этанола, к подвижной фазе. Эти модификаторы сильно уменьшают гидрофобные взаимодействия и поэтому широко используются для регулирования результирующего удерживания сорбатов. В случае гидрофобных стационарных фаз и крупных молекул сорбата, как это

имеет место при использовании дансил-аминокислот, для элюента может потребоваться до 30% ацетонитрила.

Органические модификаторы элюента не влияют на энантиоселективность разделения, если гидрофобные взаимодействия возникают исключительно между углеводородными частями растворенного вещества и разделятельными группами привитой фазы. Однако известны случаи, когда гидрофобные взаимодействия имеют место внутри диастереомерных сорбционных комплексов и тогда они сильно влияют на хиральное распознавание зеркальных изомеров сорбата. При этом селективность разделения может изменяться в зависимости от количества и типа органического компонента подвижной фазы.

Помимо реакций комплексообразования, гидрофобные взаимодействия могут играть чрезвычайно важную роль в хроматографии оснований Шиффа аминокислот с салициловым альдегидом и дансил-аминокислот на привитых фазах, в которых *L*-пролин или *L*-валин "разбавлены" приблизительно 10-кратным избытком длинных алкильных цепей [126,127]. Такое разбавление полностью меняет микроокружение хирального комплексообразующего центра сорбента, меняя даже знак энантиоселективности системы по сравнению с соответствующей неразбавленной привитой хиральной фазой. Интересно, что в последнем случае имеет место большая емкость и поэтому неразбавленная фаза предпочтительнее при полупрепаративном разделении [126], в то время как разбавленная фаза имеет более высокую эффективность и ее лучше использовать в аналитических экспериментах. Для поддержания времени удерживания гидрофобных сорбатов на таких сорбентах в приемлемых пределах к подвижной фазе следует добавлять 50—70% метанола.

4. Температура колонки.

Следует кратко рассмотреть температуру колонки — последний важный хроматографический параметр в лигандном обмене. Неоднократно отмечалось, что повышение температуры колонки до 50—55 °С значительно повышает эффективность наборов, работающих на основе лигандообменных механизмов. Это говорит о том, что обмен многодентатных лигандов в координационной сфере иона металла может представлять собой сравнительно медленный процесс. В самом деле, было найдено, что некоторые модельные медно (II) - диаминные комплексы образуются очень медленно [158]. В таких системах нет другого способа

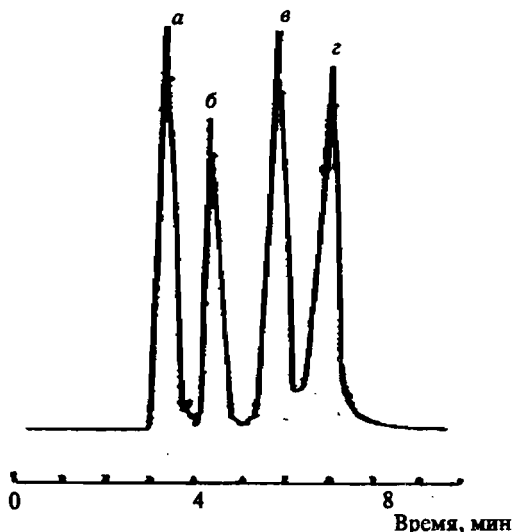


Рис. 4. Разделение двух оснований Шиффа *RS*-фенилэтанолamina на C_{11} -*L*-пролинпривитой фазе, разбавленной C_{18} -алкильными группами.

Колонка 150x4,6 мм, размер частиц 5 мкм, элюент 0,005 М $Cu(II)$ /0,2 М уксуснокислый аммоний, pH 5,0, 0,75% по объему метанола; скорость потока 1 мл/мин, температура 35 °С, УФ-детектор с длиной волны 350 нм. Растворенные вещества: основания Шиффа *R*- и *S*-фенилэтанолamina с 2,4-дигидроксibenзальдегидом (*a* и *b* соответственно), и с 2-гидрокси-4-метоксibenзальдегидом (*в* и *г*) (по [243]).

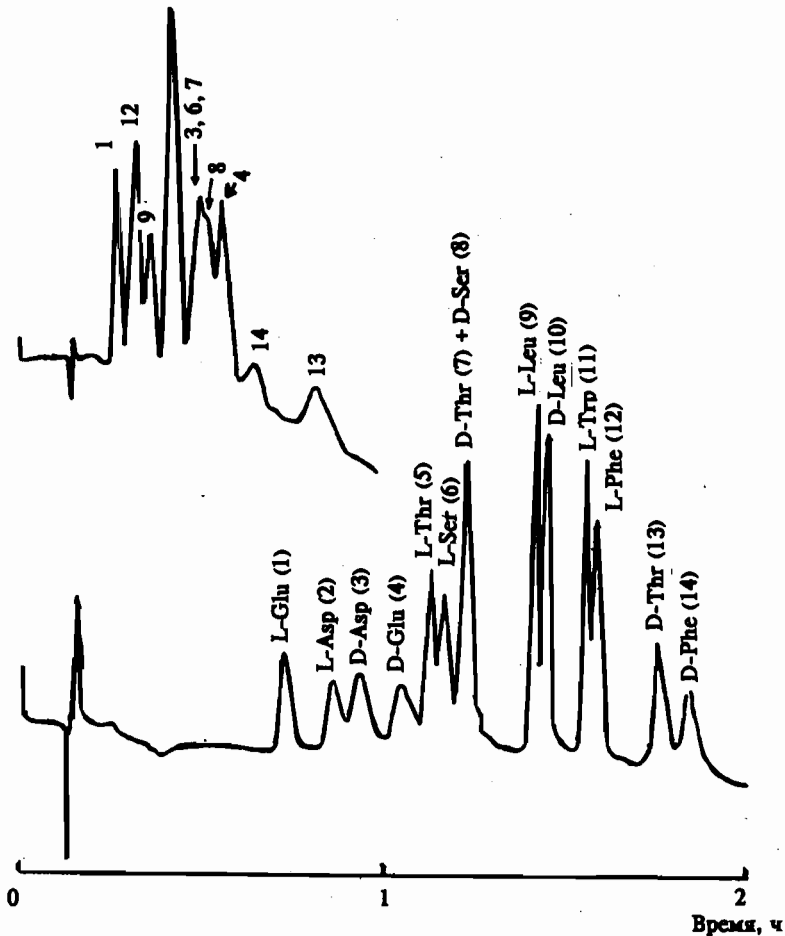


Рис.5. Градиентное разделение семи рацемических дансильных аминокислот. Колонки: *a* — Хиралпак WH 770x0,26 мм; *b* — Хемкосорб ODS—UH 150x0,26 мм и Хиралпак WH 770x0,26 мм, соединенные последовательно; элюент: ацетонитрил / водный раствор, содержащий 0,25 М уксуснокислый аммоний и 0,1 мМ сервокислую медь, содержание ацетонитрила линейно программировалось от 18 до 38 % за 2 ч; скорость потока 2 мкл / мин; УФ-детектор с длиной волны 220 нм, размер частиц для Хиралпака WH 10 мкм, Хемкосорба ODS—UH 5 мкм (по [150]).

повысить число теоретических тарелок колонки, кроме повышения температуры последней, если все обычные возможности оптимизации (изменение типа и концентрации органического модификатора и неорганической соли в элюенте, а также его pH) исчерпаны. В лигандообменной хроматографии температура оказывает лишь минимальное влияние на энантиоселективность разделения, она влияет в основном на эффективность колонки. Однако имеется сообщение об одном примере [55,56] увеличения скорости лигандного обмена и разницы в стабильности двух диастереомерных смешаннолигандных комплексов.

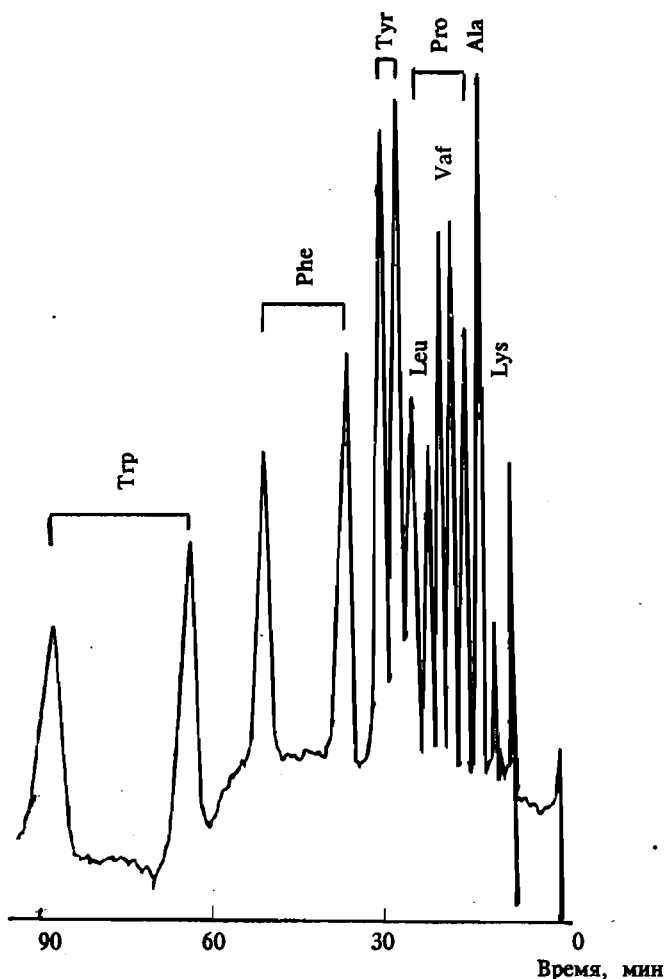


Рис. 6. Разделение восьми рацемических аминокислот на полистирольной привитой фазе, содержащей остатки *L*-гидроксипролина.

Колонка 250x4 мм; размер частиц 5мкм; элюент: 0,5 мМ сернистая медь / 0,01 М уксуснокислый аммоний, pH 4,5; 30 % ацетонитрила, расход 0,7 мл/мин, температура 75⁰ С, УФ-детектор с длиной волны 254 нм (по [7]).

5. Привитые полимерные фазы. С другой стороны, при повышенных температурах может уменьшаться срок службы хроматографических колонок, и довольно значительно, особенно, если сорбент изготовлен на базе 3-аминопропилового исходного материала. Для устранения этого недостатка была предложена гидролитически стабильная фаза, представляющая собой новое поколение привитых хиральных сорбентов — хиральных полимеров, химически связанных с матрицей неорганического носителя в нескольких позициях цепи [159]. Связи образуются звеньями метилвинилдиэтоксисилана, сополимеризованными со стиролом. Связанный сополимер подвергался хлорометилрованию и аминированию *L*-гидроксипролином обычным способом.

Набивка может эксплуатироваться при температурах до 75°C в течении нескольких месяцев без потери разделительной способности или эффективности.

Некоторые типичные примеры использования привитых хиральных фаз в ВЭЖХ рацемических комплексобразующих соединений представлены на рис.4-6. Стоит упомянуть при этом, что лигандообменный метод облегчает детектирование многих сорбатов с помощью самых недорогих фотометрических детекторов, так как эти растворенные вещества частично элюируются в виде медных (II) комплексов, которые сильно поглощают УФ излучение во всем его диапазоне.

Хиральные покрытия, нанесенные на поверхность пористого кремнезема

1. Хиральные покрытия в ВЭЖХ. Целый ряд высокоэффективных хиральных лигандообменных сорбентов можно легко изготовить путем покрытия микродисперсной двуокиси кремния серийно выпускающихся колонок ВЭЖХ соответствующими сильно адсорбирующимися соединениями. Это обычно делается путем пропускания разбавленного раствора хирального лиганда или его металлокомплекса через колонку ВЭЖХ до полного насыщения последней. Естественно, что потом колонка должна использоваться в сочетании с подвижными фазами, которые не растворяют материал покрытия с поверхности. Сильно гидрофобные хиральные селекторы, адсорбированные на набивках с обращенной фазой, не вымываются из колонки водными или обогащенными водой смешанными элюентами. Сильно полярные хиральные селекторы, адсорбированные на немодифицированной поверхности двуокиси кремния, могут использоваться в сочетании с неполярными органическими растворителями. На фиксацию полярных селекторов на заряженных матрицах могут влиять также электростатические взаимодействия.

Хиральные полимеры особенно хорошо адсорбируются на пористых носителях. Однако их обычно осаждают на поверхности путем перемешивания с разбавленным раствором полимера с последующей фильтрацией суспензии и набивкой колонки обычным способом.

2. Нанесенные хиральные покрытия на обращенно-фазовых сорбентах. В.А. Даванков с сотр. предложил динамическое покрытие обычных колонок с обращенной фазой *N*-алкильными производными *L*-гидроксипролина [160] и *L*-гистидина [161] из метанольных или водно-метанольных растворов этих хиральных селекторов. Длинные *L*-алкильные цепи (с C_7 по C_{16}) этих селекторов обеспечивали постоянную адсорбцию покрытия на гидрофобном граничном слое материала набивки. В обогащенном водой элюенте, содержащем 10^{-4} М уксуснокислой меди и до 15 % метанола, смеси от пяти до семи рацемических аминокислот были разделены на отдельные энантиомеры в колонке длиной 15 см, что говорит о высоких аналитических возможностях новой хроматографической системы. Было показано, что эта особенность характерна также для других хиральных покрытий в колонках с обращенными фазами (табл. 4)

Благодаря высокой эффективности систем с нанесенными хиральными покрытиями даже при комнатной температуре предел обнаружения распространенных аминокислот может достигать 10^{-10} М, т.е. около 10^{-8} г при использовании простого УФ детектора с длиной волны 254 нм [160].

Таблица 4

Хиральные лигандообменные покрытия

Селектор	Рацемические сорбаты	Ссылки
1	2	3
Обращенно-фазовый силикагель		
<i>N</i> -гептил, <i>N</i> -децил и <i>N</i> -гексадецил- <i>L</i> -гидроксипролин	Аминокислоты	[160]
<i>N</i> -децил- <i>L</i> -гистидин		[161]
Палладий (II)- <i>S</i> -этил- <i>L</i> -цистеин	Метионин	[162]
<i>N</i> -(2-гидроксиодецил)- <i>L</i> -гидроксипролин	Пролин, триазолидин-4-карбоновая кислота	[163]
	5,5-диметилтриазолидин-4-карбоновая кислота	[164]
<i>N,N</i> -диоктил- <i>L</i> -аланин	Аминокислоты и оксикислоты	[157]
	Оксикислоты	[165]
	Пантотеновая кислота	[166]
	Яблочная кислота	[167]
	Аминокислоты, ацетил- <i>DL</i> -лейцин-амино-капролактамы, пептиды, оксикислоты	[168]

Силикагель

Серебро (I)- <i>d</i> -камфор-10-сульфонат	3-метялен-7-бензилиден-бицикло [3, 3.1] -ионы	[169]
Кобальт (III)-трис-этилендиамин	Замещенный циклопентадиэтил-родий (I)-норборна дие́н	[170]
Полиакриламид с привитым <i>L</i> -пролином	Аминокислоты	[171, 172]
Поли-3-винилпурин с привитым <i>L</i> -пролином		[172, 173]

Анионообменная смола Доуэкс 1×2
с хиральным комплексом в качестве сорбента

<i>D-N</i> -гидроксиэтил-пропилен-диамин-триацетатоферрат (III)	<i>N</i> -бензоил и <i>N</i> -ацетил-аминокислоты	[174]
<i>D</i> -пропилсдиамин-тетраацетатомедь (II) и -цинк (II)	1-фенилэтиламин	[175]

Субнапомольная чувствительность легко достигается с помощью послеклоночной дериватизации аминокислот *o*-фталевым диальдегидом с последующей флуориметрической регистрацией.

Простота изготовления ВЭЖХ колонок с нанесенным покрытием из соответствующего хирального селектора дает возможность регулировать порядок элюирования исследуемых зеркальных изомеров. Эта возможность особенно важна, когда необходимо выполнить следовый анализ энантиомерных примесей в оптически активном соединении. Чувствительность по следовому компоненту обычно сильно повышается, когда он элюируется первым (т.е. до основного компонента) [176]. Таким образом, можно легко определить содержание первой элюируемой *D*-примеси в *L*-аланине ("Sigma", ФРГ) на уровне 270 частей на миллион с помощью колонки с обращенной фазой с покрытием из *N,N*-диоктил-*L*-аланина [157] в сочетании с водным элюентом, содержащим 0,1 мМ сернокислой меди, при использовании флуориметрического детектора (послеклоночная реакция с *o*-фталальдегидом).

Было показано, что колонки с обращенной фазой, покрытые *N,N*-диоктил-*L*-аланином, также эффективны при разделении хиральных аминокислот (табл. 5). Ионы меди (II) добавлялись в элюент для организации взаимодействий комплексообразования хирального селектора с зеркальными изомерами оксикислот. Однако для избирательности обнаружения последних в смеси с аминокислотами, для которых использовался детектор с длиной волны 254 нм, проводилась дополнительная послеклоночная реакция с 2,5 мМ раствором перхлората железа (III) в 0,04 М перхлорной кислоте с последующей избирательной фотометрической регистрацией оксикислот на волне 420 нм [160], как показано на рис. 7.

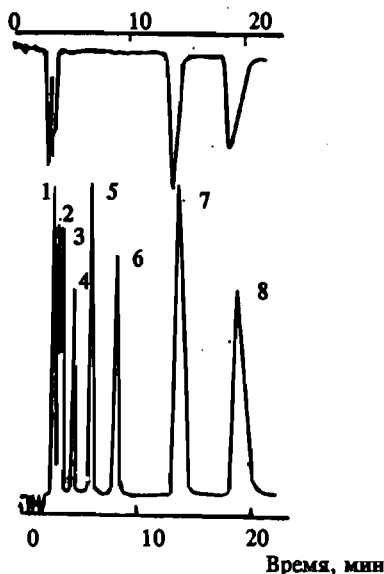
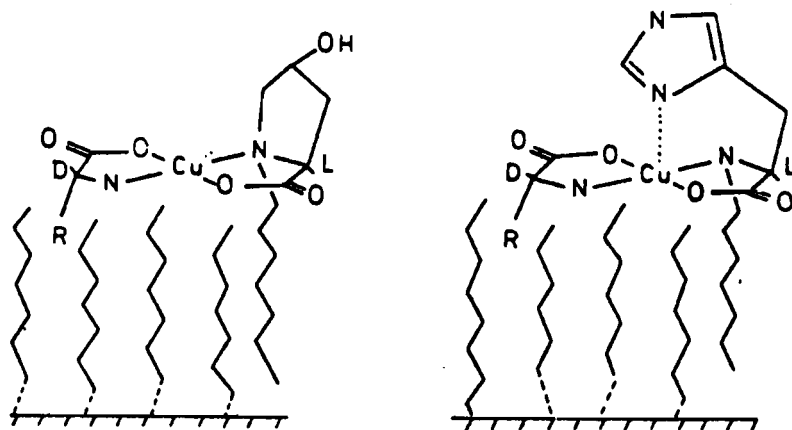


Рис. 7. Разделение двух оксикислот и двух аминокислот в колонке (50 × 4,6 мм) с обращенно-фазовым материалом (3 мкм), покрытым *N,N*-диоктил-*L*-аланином, MCI GEL CR SLOW. Элюент — 2 мМ раствор сернокислой меди в водном ацетонитриле (10 %), скорость потока 1,0 мл/мин, комнатная температура. Детектор: вверх УФ, длина волны 420 нм после проведения реакции с раствором 2,5 мМ Fe(ClO₄)₃ в 0,04 N HClO₄, 0,1 мл/мин; вниз УФ, длина волны 254 нм. Растворенные вещества: 1 и 2 — *DL*-молочная кислота, 3 и 4 — *DL*-тиразин; 5 и 6 — *DL*-фенилаланин; 7 и 8 — *DL*-2-гидроксимасляная кислота (по [165]).

Ионы меди (II) добавлялись в элюент для организации взаимодействий комплексообразования хирального селектора с зеркальными изомерами оксикислот. Однако для избирательности обнаружения последних в смеси с аминокислотами, для которых использовался детектор с длиной волны 254 нм, проводилась дополнительная послеклоночная реакция с 2,5 мМ раствором перхлората железа (III) в 0,04 М перхлорной кислоте с последующей избирательной фотометрической регистрацией оксикислот на волне 420 нм [160], как показано на рис. 7.

Системы с хиральными покрытиями успешно использовались для получения важной информации о механизме хирального распознавания бидентатных лигандов с помощью неподвижного хирального селектора. Так, из схемы В на рис. 211 легко можно понять, что по пространственным соотношениям в смешаннолигандных медных (II) комплексах, образующихся в полимерном хиральном покрытии, содержащем *L*-пролин в поли-3-винил-пиридине, *L*-изомеры предпочитают *D*-аминокислотам [173].



С другой стороны, *D*-аминокислоты должны дольше задерживаться в навивке с обращенной фазой, содержащей *N*-алкил- *L*-гидропролин или *N*-алкил- *L*-гистидин в качестве хиральных комплексообразующих центров сорбции [17,18,160,161].

Таблица 5

Разделение рацемических 2-оксикислот с использованием лигандообменной хроматографии на колонках с обращенной фазой, покрытых *N,N*-диоктил- *L*-аланином (по [165])

Рацемические сорбаты	Концентрация		Фактор емкости		Разрешение R_S
	Cu SO_4 , мМ	Ацетонитрил, %	k'_D	k'_L	
1	2	3	4	5	6
Колонка 50 мм					
Молочная кислота	2	10	4,9	5,8	1,20
2-гидрокси- <i>n</i> -масляная кислота	2	10	10,6	15,1	3,05
2-гидроксивалериановая кислота	2	10	29,3	42,0	2,89
2-гидроксикапроновая кислота	2	10	93,9	133,8	3,42
Лейциновая кислота	2	10	77,4	99,0	2,38
Глицериновая кислота	1	—	20,8	15,0	2,23
Яблочная кислота	0,5	10	36,8	31,2	0,39
Винная кислота	1	10	88,2	55,4	0,73
4-гидрокси-3-метоксиминдальная кислота	2	10	18,5	27,1	3,08
4-гидроксиминдальная кислота	2	10	20,9	31,6	4,02
3-гидрокси-4-метоксиминдальная кислота	2	10	24,8	36,8	4,84
3-гидроксиминдальная кислота	2	10	33,8	48,8	3,93
Миндальная кислота	2	10	65,0	89,4	2,88

Окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6
Колонка 10 мм					
β -фенилмолочная кислота	2	10	49,5	76,0	1,34
α -фенилмолочная кислота	2	10	56,0	73,5	0,90
<i>p</i> -хлорминдальная кислота	2	10	167,0	233,0	1,39

Примечание. Условия: комнатная температура, скорость течения подвижной фазы 1,0 мл/мин, набивка — кремнезем ODS 3 мкм, средний диаметр пор 100 Å.

Здесь важную роль в разделении зеркальных изомеров играет нехиральный компонент хроматографической системы — гидрофобный слой на границе раздела фаз. Различие в общей энергии сорбции *L*- и *D*-аминокислот связано с тем, что только последние могут вступать в дополнительные гидрофобные взаимодействия с носителем, которые стабилизируют *D-L*-сорбционный комплекс.

3. Кремнезем с хиральным покрытием. Наконец, здесь следует подчеркнуть, что область применения хиральных лигандообменных покрытий далеко не исчерпана, как видно из первых примеров сочетания чисто кремнеземных набивок с полярными хиральными селекторами. Так, осажденный на кремнезем *d*-камфор-10-сульфоната серебра образует π -комплексы с алифатическими ненасыщенными углеводородами и может использоваться для препаративного разделения рацемического диена [169]. Хиральные катионы

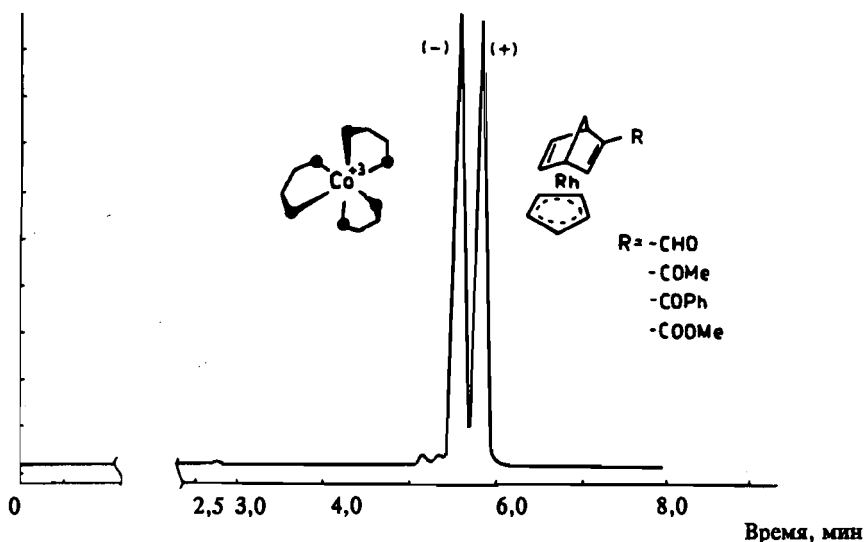


Рис. 8. Разделение рацемического Rh (I) комплекса R = — CHO в колонке (250x4 мм) с набивкой Силасорб Si 600, $d_p = 5$ мкм, с покрытием (+) — $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$. Элюент — дихлорэтан (циклогексан) изопропанол в пропорции 30:20:1, скорость потока 1 мл/мин, детектор УФ, длина волны 250 нм (по [170]).

трис-этилендиаминкобальта (III) при удерживании их электростатическими силами на депротонированных поверхностных силаполах эффективно разделяют (рис. 8) рацемические металлоорганические соединения, например, производные циклопентадиенил-родий (I)-норборнадиена [170]. Последний пример особенно интересен тем, что хиральный селектор представляет собой кинетически инертный, устойчивый комплекс с кобальтом (III) с полностью насыщенной октаэдрической координационной сферой. Поэтому только внешняя координационная сфера (т.е. сольватационная оболочка комплекса) участвует в образовании аддуктов с зеркальными изомерами растворенных соединений, которые необходимо распознать. Область хиральной лигандообменной хроматографии с использованием внешней координационной сферы устойчивых комплексов до сих пор остается практически неразработанной [5,6, 177].

4. Тонкослойная хроматография с использованием хиральных лигандообменных покрытий. Наше последнее замечание в данном разделе касается тонкослойной хроматографии рацемических соединений с использованием хиральных лигандообменных покрытий. Путем простого погружения пластин с обращенной фазой в разбавленные растворы *N*-(2-гидроксидоденил)-*L*-гидроксипролина и соли меди (II) фирмой Macherey—Nagel в сотрудничестве с фирмой Degussa (ФРГ) были созданы готовые к употреблению хиральные пластины. Они оказались чрезвычайно универсальными в отношении разделения рацемических аминокислот, *N*-метиламинокислот, *N*-формиламинокислот, α -алкиламинокислот, дипептидов, лактонов, α -оксикислот, производных тиазолидинов, галогенированных аминокислот и других важных соединений. Как показано в обзорной статье Гюнтера [178] и работах, которые в ней упоминаются, этот метод позволяет определять до 0,1 % одного зеркального изомера в другом изомере. Хиральные пластины использовались также для планарных хроматографических разделений в принудительном потоке [179]. Интересно, что существует определенная корреляция между разделением зеркальных изомеров замещенных тиазолидиновых карбоновых кислот и дипольными моментами заместителей [180].

Хиральные комплексы как добавки к подвижной фазе

1. Комбинация хиральных элюентов и нехиральных ВЭЖХ-колонок. Помимо химически связанных хиральных неподвижных фаз и хиральных покрытий, которые рассматривались выше, для реализации лигандного обмена в режиме ВЭЖХ был разработан еще и третий общий подход. В нем используются "хиральные элюенты" в сочетании с нехиральной, обычной ВЭЖХ-колонкой. Важнейший компонент элюента здесь — комплекс хирального лиганда с катионом переходного металла.

Распределение комплекса между неподвижной и подвижной фазами зависит от его адсорбционной способности и растворимости в элюенте. Если в сочетании с хиральным элюентом используется набивка с обращенной фазой, что чрезвычайно распространено в лигандообменной хроматографии (табл. 6), гидрофобные добавки будут стремиться концентрироваться на поверхности сорбента, в то время как небольшие и гидрофильные хиральные селекторы, например, бис (*L*-пролинато) медь (II) будут оставаться преимущественно в водноорганической подвижной фазе. Разумеется, можно подобрать требуемую величину коэффициента распределения хирального селектора путем

Таблица 6

**Разделение рацематов с использованием метода хирального элюента
на колонках с обращенной фазой**

Хиральный селектор	Рацемические сорбаты	Ссылки
1	2	3
2 (<i>L</i>)-алкил-4-октил-диэтилентриамин (где алкил = этил, изопропил, изобутил) в сочетании с Zn (II), Cd (II), Ni (II), Hg (II)	Дансиламиноокислоты Дансил-глициламиноокислоты	[181,182] [182]
<i>L</i> -пролин + Cu (II)	Аминокислоты Дансиламиноокислоты	[183] [184-190]
	3-фторированные аланины	[191]
	α -галогенометилазамещенные аланины	[191]
	α -оксикислоты	[192]
<i>N</i> -метил- <i>L</i> -пролин + Cu (II)	Аминокислоты	[193]
<i>N</i> -бензил- <i>L</i> -пролин + Cu (II)	"	[17]
<i>L</i> -пролил-октиламид + Cu (II)	Дансиламиноокислоты	[182,194]
+ Ni (II), Zn (II)	Феноксипропионовые кислоты	[195]
<i>L</i> -пролил-додециламид + Ni (II)	Дансиламиноокислоты	[194]
<i>L</i> -пролил-глицин, <i>L</i> -пролил- <i>L</i> -валин и <i>L</i> -пролил- <i>L</i> -тирозин в сочетании с Cu (II), Zn (II), Co (II), Hg (II)	Аминокислоты	[183]
<i>L</i> -пинеколиновая кислота + Cu (II)	Дансиламинокислоты	[190]
<i>L</i> -азетидин-карбоновая кислота + Cu (II)	"	[190]
<i>L</i> -аргинин + Cu (II)	"	[185,190]
<i>L</i> -гистидин + Cu (II)	"	[185,189,196]
Метилловый эфир <i>L</i> -гистидин + Cu (II)	"	[187-189,196-198]
<i>N, N</i> -диметил- <i>L</i> -метионин-сульфоксид + Cu (II)	Аминокислоты	[193]
<i>N, N</i> -дипропил- <i>L</i> -аланин + Cu (II)	"	[198-202]
	Аминокислотные амиды	[202]
	α -метиламиноокислоты	[203]
	Дансиламиноокислоты	[204]
	α -оксикислоты	[205]
<i>N, N</i> -диэтил- <i>L</i> -аланин + Cu (II)	Аминокислоты	[201]
(где алкил = метил, этил, пропил, бутил)	Дансиламиноокислоты	[206]
<i>L</i> -аланинамид + Cu (II)	α -оксикислоты	[192]
<i>L</i> -валин + Cu (II)	Аминокислоты	[201]
<i>N, N</i> -диметил- <i>L</i> -валин + Cu (II)		

Продолжение табл. 6

1	2	3
	<i>α</i> -метиламинокислоты	[203]
	<i>α</i> -оксикислоты	[205,207]
+ Cu (II), Zn(II), Co (II), Hg (II)	Аминокислоты	[183]
<i>N,N</i> -диэтил- <i>L</i> -валин + Cu (II)	"	[201]
(где алкил = метил, этил, пропил, бутил)		
<i>L</i> -валин-амид + Cu (II)	Дансиламинокислоты	[206]
<i>L</i> -изолейцин + Cu (II)	<i>α</i> -оксикислоты	[192]
	Пиридон-карбоновая кислота	[208]
<i>N, N</i> -диметил- <i>L</i> -лейцин + Cu (II)	Аминокислоты	[17,193]
<i>L</i> -фенил-аланин + Cu (II)	"	[209—212]
	<i>α</i> -оксикислоты	[192,209,213]
	2-пентафторэтил-аланин	[214]
	2-трифторметил-аланин	[214]
	9-(3,4-дигидроксипентил) гвананин	[215]
	Пиридон-карбоновая кислота	[208]
<i>N</i> -метил- <i>L</i> -фенилаланин + Cu (II)	Аминокислоты	[209]
	<i>α</i> -оксикислоты	[209]
<i>N, N</i> -диметил- <i>L</i> -фенилаланин + Cu (II)	Аминокислоты	[209]
	<i>α</i> -оксикислоты	[209]
<i>L</i> -фенилаланинамид + Cu (II)	Дансиламинокислоты	[206,231,232]
<i>L</i> -тирозинамид + Cu (II)	"	[206]
<i>N</i> -(<i>p</i> -толуолсульфонил)		
<i>L</i> -фенилаланин + Cu (II)	Аминокислоты	[216—218]
<i>N, N</i> -диметил- <i>D</i> -фенилглицин + Cu (II)	"	[193]
<i>N</i> -(<i>p</i> -толуолсульфонил)- <i>D</i> -фенилглицин + Cu (II)	"	[218,219]
<i>L</i> -аспарагил-алкиламид + Cu (II)	"	[220]
(где алкил = этил, бутил, гексил, октил)	"	[221,222]
<i>L</i> -аспарагил-циклогексилмид + Cu (II)	"	[223—225]
<i>L</i> -аспарагил- <i>L</i> -фенилаланин метиловый эфир (аспартам) + Cu (II), Zn (II)	Гомосернизамещенный дегидрохалькон	[226]
	Дансиламинокислоты	[189]
моно- <i>n</i> -октиламид (R, R)- (+) винной кислоты + Cu (II)	Аминокислоты	
	Замещенные фенил-этаноламны	[227]

вых количеств *D*-аминокислот в ферментированных продуктах питания [232] или моче и спинно-мозговой жидкости [198]. В таких случаях анализировались дансильные производные аминокислот в элюентах, содержащих 2 мМ меди (II) и 4 мМ *L*-фенил-аланинамида (рН 7,3) или 5 мМ метилового эфира *L*-гистицина (рН 5,5) соответственно, при градиенте ацетонитрила до 50 %.

Для осуществления полного энантиомерного анализа смеси всех распространенных аминокислот были предложены три общих процедуры. Вайнштейн с соавт. [199, 200] предлагала вначале разделять смесь аминокислот на три фракции с помощью обычной катионообменной смолы и летучих водных буферных растворов пиридина. Аминокислоты в пределах групп затем разделяются на отдельные зеркальные изомеры в колонке с обращенной фазой с использованием *N, N*-дипропил-*L*-аланина и ацетата меди в водной подвижной фазе. Субнапомольной чувствительности можно достигнуть путем постколоночной дериватизации зеркальных изомеров *o*-фталальдегидом и последующей флуорометрической регистрацией.

Нимора с сотр. [219] предложил двухколоночную систему с колонками длиной 5 и 20 см, которая обеспечивает разделение полярных аминокислот на длинной колонке и оставшихся более длинных неполярных аминокислот на короткой колонке. В обоих случаях в качестве хиральной добавки к элюенту использовался медный комплекс *N*-(*n*-толуолсульфонил)-*D*-фенилглицила, а на последнем этапе — при хиральном разделении тяжелых аминокислот в короткой ODS-колонке применялся градиент ацетонитрила.

Наконец, Каргер с сотр. [194] разделяли дансильные производные аминокислот в обычных условиях работы с обращенной фазой с использованием градиента метанола, а затем осуществляли энантиомерное разделение некоторых отдельных элюированных рацемических пиков на следующей колонке с обращенной фазой и раствором *L*-пролил-*n*-додециламид / никелевого комплекса.

Для идентификации зеркальных изомеров отдельных аминокислот в сложных смесях было предложено использовать обработку смеси энантиоселективными ферментами (например, оксидазой *D*-аминокислот) [188], что приводит к постепенному уменьшению амплитуд пиков всех зеркальных изомеров, принадлежащих конфигурационному ряду *D*. Такие манипуляции с водными растворами легко сочетать с последующим энантиомерным анализом в условиях обращенной фазы и *L*-пролинсодержащего хирального элюента.

Другой элегантный пример проверки принадлежности пиков — разделение смесей аминокислот и оксикислот с помощью бис (*N, N*-диметил-*L*-валинато)меди в колонке с обращенной фазой и избирательной регистрацией оксикислот после проведения их постколоночной реакции с ионами Fe(III) на длине волны 436 нм. Таким способом была определена *D*-яблочная кислота [207] в яблочном соке, в котором подозревалась фальсификация путем добавок синтетической *DL*-яблочной кислоты.

Помимо аминокислот и оксикислот множество других типов комплексообразующих соединений может успешно разделяться на энантиомерные пары с

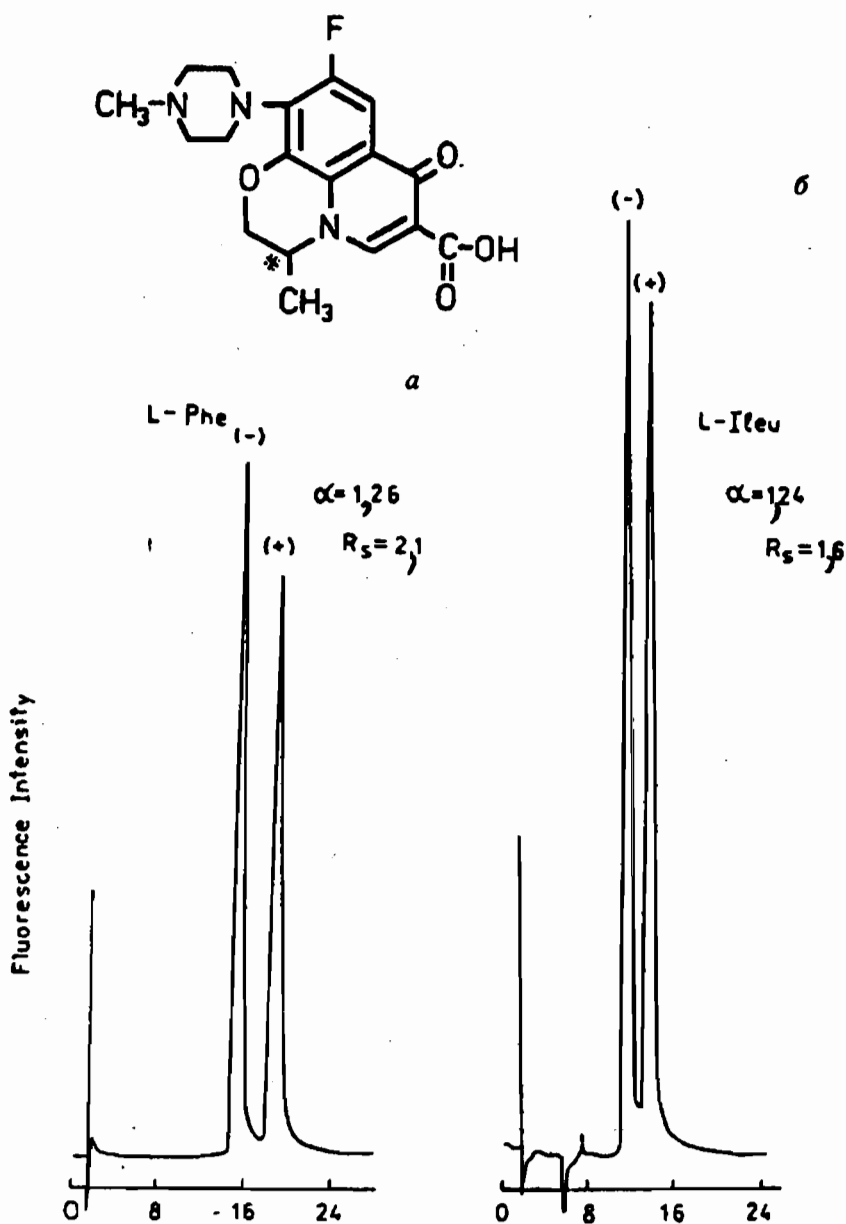
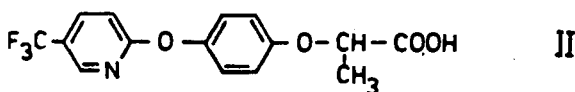
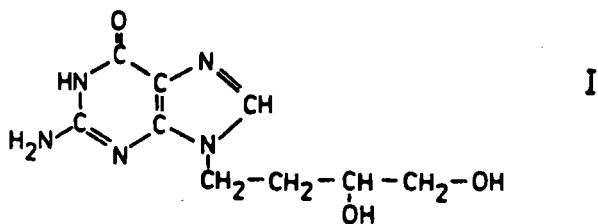


Рис. 10. Типичные хроматограммы зеркальных изомеров офлоксацина, полученные на ODS-колонках (150 × 6 мм, $d_p = 5$ мкм) при использовании 3 мМ раствора CuSO_4 и 6 мМ *L*-фенилаланина (а) или 6 мМ *L*-изолейцина (б) в качестве хирального элюента, содержащего 15 % метанола (по [208]).

помощью лигандообменного метода. Так, с помощью комплексов *L*-фенилаланин -Cu (II) [215] и *L*-пролил-*n*-октиламид -Ni(II) [195] были расщеплены рацематы 9-(3,4-дигидроксibuтил) гванина (I), имеющего антигерпесную активность, и флуазифора (II) — основного метаболита селективного гербицида, соответственно



Расщепление хинолинон-карбоновой кислоты [208] показано на рис. 10.

С помощью метода хиральных элюентов возможно разделение рацемических соединений на миллиграммном уровне (рис.11) [214]. Однако в этом случае приходится столкнуться с проблемой удаления хиральных добавок элюента из отобранных целевых фракций. Это не всегда сделать так же просто, как это имеет место в случае удаления меди (II) и фенилаланина с помощью ионнообменного материала Доуэкс 50 из фракций, содержащих зеркальные изомеры сильнокислого полифтораланина [214].

В отношении механизма хирального распознавания в хроматографических системах, работающих с хиральными элюентами, следует подчеркнуть, что реакции комплексообразования, проходящие в подвижной фазе и на поверхности набивки, оказывают противоположное действие на общее время удерживания двух зеркальных изомеров в хроматографической колонке [31]. Однако из-за того, что нехиральная поверхность сорбента активно вмешивается в межлигандные взаимодействия внутри адсорбированных смешаннолигандных диастереомерных комплексов, энантиоселективность комплексообразования в неподвижной фазе обычно преобладает по сравнению с энантиоселективностью в объеме раствора и поэтому определяет общую селективность хроматографической колонки. Из приведенной ниже схемы можно легко понять, что дополнительные гидрофобные взаимодействия между заместителем *R* *L*-аминокислоты в смешанных комплексах с *L*-пролином или *L*-лейцином и алкильными цепями обращенной фазы повышают

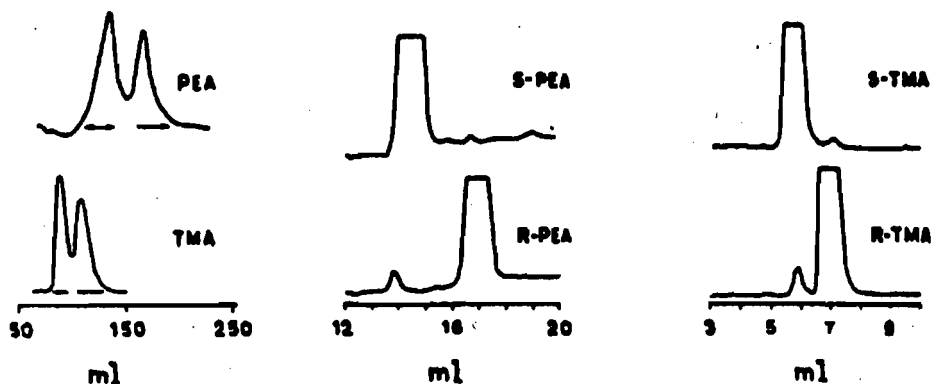
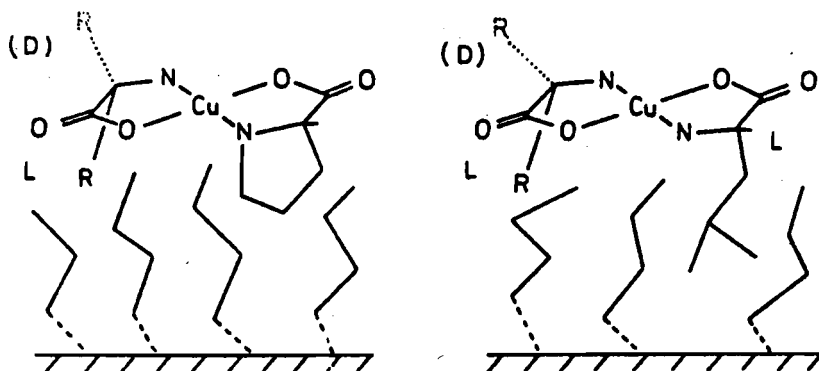
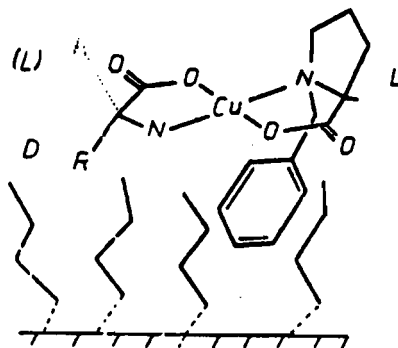


Рис. 11. Препаративное разделение 4 мг 2-пентафторэтилаланина (PEA) и 4 мг 2-трифторметилаланина (TMA), растворенных в 1 мл подвижной фазы. Подвижная фаза: 2 мМ *L*-фенилаланин, 1 мМ раствор уксуснокислого калия, pH 4,4. Колонка: 250 × 15 мм, материал ODS, $d_p = 40$ мкм. Справа: аналитическая хроматография собранных фракций в той же подвижной фазе, если не считать 12% ацетонитрила (для PEA) или 6% ацетонитрила (для TMA) (по [214]).

устойчивость *L-L*-диастереомеров и приводят к увеличению времени удерживания *L*-аминокислот, по сравнению с *D*-изомерами [17]



С другой стороны, *N*-бензил-*L*-пролин адсорбируется на гидрофобной поверхности своей объемной бензильной группой, что приводит к увеличению времени удерживания *D*-изомеров аминокислот



При отсутствии гидрофобной поверхности (т.е. в объемных растворах) энантиоселективность комплексообразования с хиральными селекторами обычно оказывается гораздо менее выраженной, чем в гетерогенных системах с обращенной фазой [233—235].

Чисто кремнеземные или полимерные катионообменные смолы также могут использоваться в сочетании с элюентами, содержащими присадки в виде хиральных комплексов (табл. 7). Замечательно то, что порядок элюирования зеркальных изомеров аминокислот может измениться на совершенно противоположный при замене чистого кремнезема на набивку с обращенной фазой, что снова показывает важность взаимодействия между поверхностью сорбента и

Таблица 7

Расщепление рацематов с помощью метода хиральных элюентов в системах с нормальной фазой

Хиральный селектор	Металлический ион	Неподвижная фаза	Рацемические сорбаты	Ссылки
<i>L</i> -пролин (в 0,05-1,0 М Na O _{кисл} , pH 5,5)	Cu (II)	Катионообменный материал типа сульфированного полистирола	Аминокислоты	[236]
<i>L</i> -пролин в гексане (<i>L</i>) <i>n</i> -пропаноле (II) / зоде в пропорции 60 : 37,5 : 45	Cu (II)	Li Хросорб Si 60	Аминокислоты: тринодотиронин и тироксин	[210]
<i>N,N,N',N'</i> —тетраметил-(<i>R</i>)-пропандиамин (в ацетонитриле / воде (в пропорции 90:10), 5 мМ р-р Me ₄ рп)	Cu (II)	Li Хросорб Si 100	Аминокислоты и миндальная кислота	[228]

диастереомерными сорбционными комплексами для хирального распознавания энантимеров растворенных соединений [228].

2. Электрокинетические методы. Истинная энантиоселективность трехкомпонентного комплексообразования в подвижной фазе (т.е. отношение термодинамических констант стабильности двух диастереомерных комплексов в объеме раствора) является единственной движущей силой энантиомерного разрешения в высокоэффективных электромиграционных методах. В типичном эксперименте хиральный носитель — электролит, содержащий 2,5 мМ-раствор Cu (L-His) и 10 мМ-уксуснокислый аммоний с pH от 7 до 8, движется по капиллярной колонке из плавленого кварца (длина 75 см, внутренний диаметр 75 мкм) за счет электроосмотических сил по направлению к катоду. Поэтому катионы, нейтральные частицы и анионы, инжестированные на анодном конце колонки, могут быть зарегистрированы на катодном конце за один цикл.

Оказалось, что аминокислоты, связанные с Cu (II) / L-His мигрируют быстрее, чем свободные нейтральные аминокислоты, так как Cu (II) / L-His несет положительный заряд в условиях нейтрального pH и испытывает дополнительное ускорение в электрическом поле около 30 кВ, приложенном к колонке. Как видно из электрофорограммы, *D*-дансиламинокислоты мигрируют быстрее, чем *L*-изомеры, что говорит о том, что последние меньше участвуют в комплексообразовании с данным хиральным селектором. Однако разница в скоростях миграции *L*- и *D*-изомеров (соответствующая энантиоселективности образования смешанно лигандных комплексов) фактически мала [237]. Только благодаря чрезвычайно высокой эффективности электрокинетических методов (эквивалентное число тарелок для указанной выше колонки 10 000) пики изомеров можно было вообще разделить.

Следует отметить и высокую чувствительность электрокинетических методов. При использовании лазерного флуориметрического детектора при достаточном отношении сигнал — шум в хиральном электролите, содержащем 5,0 мМ аспартама, 2,5 мМ сернокислой меди и 10 мМ уксуснокислого аммония при

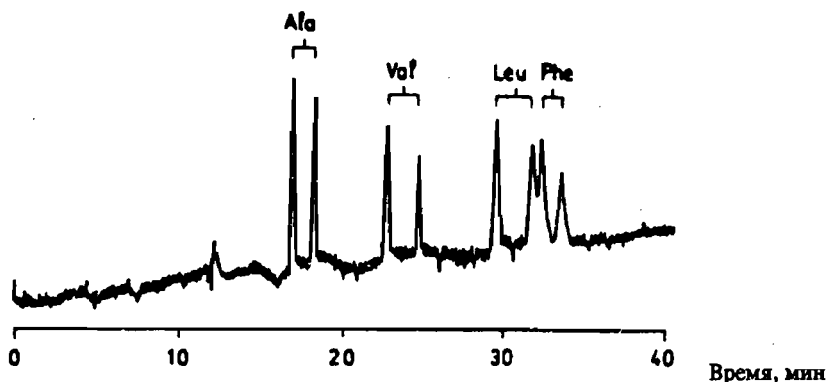


Рис.12. Разделение смеси четырех рацемических аминокислот как производных *N*-(3,5-динитробензоил) *o*-изопропилового эфира с помощью электрокинетической капиллярной хроматографии. Колонка: трубка из плавленого кварца длиной 50 см, с внутренним диаметром 50 мкм. Мицеллярный раствор: 25мМ раствор натрия-*N*-додеcanoил-*L*-валината в буферной смеси 25мМ бората / 50 мМ фосфата с pH 7,0. Общее приложенное напряжение 10 кВ, ток 26 мкА. Детектор: УФ на длине волны 230 нм, температура — комнатная (-20°C) (по [241]).

pH 7,2, можно обнаружить присутствие до 50 молекул дансиламинокислот [238].

Серьезнейшим недостатком электрокинетического разделения является плохая избирательность разделения растворенных веществ с одинаковыми электростатическими зарядами. Этот недостаток может быть преодолен путем использования хиральных селекторов, которые способны образовывать в электролите-носителе мицеллы, как в случае с медными (II) комплексами *N,N*-дицил-*L*-аланина [239]. Действительно, распределение растворенных соединений между мицеллами и объемным раствором открывает дополнительную возможность распознавания растворенных соединений [240,241]. Чрезвычайно важно, что энантиоселективность комплексообразования может также значительно повыситься при переходе от гомогенных несущих электролитов к квазигетерогенным растворам. На рис.12 дан пример высокоизбирательного энантиоселективного разделения четырех идентично заряженных веществ на отдельные изомерные пары.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bradford B.W., Harvey D., Chalkley D.E.* // J. Inst. Pet. 1955. Vol.41. P.80.
2. *Stokes R.H., Walton H.F.* // J. Amer. Chem. Soc. 1954. Vol.76. P.3327.
3. *Helferich F.G.* // Nature. 1961. Vol.89. P.1001.
4. *Davankov V.A., Semechkin A.V.* // J. Chromatogr. 1977. Vol.141. P.313.
5. *Davankov V.A., Navratil J.D., Walton H.F.* // Lingand Exchange Chromatography. CRC Press, Boca Raton, Fla., 1988.
6. *Davankov V.A.* // Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques. / Ed. by K.K. Unger. New York, 1990. P.541.
7. *Davankov V.A.* // Chiral Separations by HPLC./ Ed. by M. Krstulovic. West Sussex, England, 1989.
8. *Min M.de, Levy G., Micheau J.C.* // J. Chim. Phys. 1988. Vol.85. P.60.
9. *Mason S.F., Tranter G.E.* // Mol. Phys. 1984. Vol.53. P.1091.
10. *Tranter G.E.* // Mol. Phys. 1985. Vol.56. P.825.
11. *Meyer V.R., Rais M.* // Chirality. 1989. Vol.1. P.167.
12. *Easson L.H., Stedman E.* // Biochem. J. 1933. Vol.27. P.1257.
13. *Ogston A.G.* // Nature. 1948. Vol.162. P.963; *ibid.* 1951. Vol.167. P.693.
14. *Dalgliesh C.E.* // J. Chem. Soc. 1952. P.3940.
15. *Topiol S., Sabio M.* // J. Chromatogr. 1989. Vol.461. P.129.
16. *Topiol S.* // Chirality. 1989. Vol.1. P.69.
17. *Davankov V.A., Kurganov A.A.* // Chromatographia. 1983. Vol.17. P.686.
18. *Davankov V.A., Meyer V.R., Rais M.* // Chirality. 1990. Vol.2. P.208.
19. *Wainer I.W., Chu Ya-Qin* // J. Chromatogr. 1988. Vol.455. P.316.
20. *Fitos I., Simonyi M.* // *Ibid.* Vol.450. P.217.
21. *Macaudiere P., Lienne M., Caudé M. e.a.* // *Ibid.* 1989. Vol.467. P.357.
22. *Vindevogel J., Van Dijck J., Verzele M.* // *Ibid.* 1988. Vol.447. P.297.
23. *Roussel C., Louisstein J., Beauvais F., Chemlal A.* // *Ibid.* 1989. Vol.462. P.95.
24. *Davankov V.A., Kurganov A.A., Bochkov A.S.* // Adv. Chromatogr. 1983. Vol.22. P.71.
25. *Davankov V.A.* // *Ibid.* 1980. Vol.18. P.139.
26. *Pirkle W.H., Pochapsky T.C.* // *Ibid.* 1987. Vol.27. P.73; Chem. Rev. 1989. Vol. 89. P.347.

27. *Norinder U., Sundholm E.G.* // *J. Liq. Chromatogr.* 1987. Vol.10. P.2825.
28. *Lipkowitz K.B., Demeter D.A., Zagarra R. e.a.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1988. Vol.110. P.3446.
29. *Erlandsson P., Issaksson R., Nilsson I., Wold S.* // *J. Chromatogr.* 1989. Vol.466. P.364.
30. *Daepfen R., Meyer V.R., Arm H.* // *Ibid.* Vol.464. P.39.
31. *Davankov V.A., Kurganov A.A., Ponomareva T.M.* // *Ibid.* 1988. Vol.452. P. 309.
32. *Pirkle W.H., Pochapsky T.C.* // *Ibid.* 1986. Vol.369. P.175.
33. *Fujita M., Yoshikawa Y., Yamatera H.* // *Chem. Lett.* 1975. Vol.11. P.473.
34. *Petersson C., Gioeli G.* // *J. Chromatogr.* 1988. Vol.435. P.225.
35. *Schill G.* // *Swiss Chem.* 1988. Vol.10. P.34.
36. *Takeuchi T., Asai H., Ishii D.* // *J. Chromatogr.* 1987. Vol.407. P.151.
37. *Walhagen A., Edholm L.-E.* // *Ibid.* 1989. Vol.473. P.371.
38. *Davankov V.A.* // *Chromatographia.* 1989. Vol.27. P.475.
39. *Рогожин С.В., Даванков В.А., Коршак В.В. и др.* // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1971. С.502.
40. *Bietler U., Feibush B.* // *J. Chromatogr.* 1976. Vol.123. P.149.
41. *Petersson C., Karlsson A., Gioeli G.* // *Ibid.* 1987. Vol.407. P.217.
42. *Pirkle W.H., Daepfen R., Reno D.S.* // *Ibid.* P.211.
43. *Песлякас И.И., Рогожин С.В., Даванков В.А.* // *Журн.орг.химии.* 1974. Т.44. С.468.
44. *Schurig V., Buerkle W.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1982. Vol.104. P.7573.
45. *Schurig V.* // *J. Chromatogr.* 1988. Vol.441. P.135.
46. *Guyegkeng M.A., Mannschreck A.* // *Chem. Ber.* 1987. Vol.120. P.803.
47. *Mannschreck A., Gmahl E., Burgemeister T. e.a.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1988. Vol.27. P.270.
48. *Mannschreck A., Kiessl L.* // *Chromatographia.* 1989. Vol.28. P.263.
49. *Mannschreck A., Andert D., Eiglsperger A. e.a.* // *Ibid.* 1988. Vol.25. P.182.
50. *Bietler U., Feibush B.* // *J. Chromatogr.* 1976. Vol.123. P.149.
51. *Koppenhoefer M., Bayerl E.* // *Chromatographia.* 1984. Vol.19. P.123.
52. *Watanabe K., Charles R., Gil-Av E.* // *Proceedings, Chromatography '86,* Chiba, Japan, 1986. P.83.
53. *Schurig V., Ossig J., Link R.* // *Angew. Chem.* 1989. Vol.101. P.197.
54. *Hess H., Burger G., Musso H.* // *Ibid.* 1978. Vol.90. P.645.
55. *Davankov V.A., Zolotarev Y.A., Kurganov A.A.* // *J. Liq. Chromatogr.* 1979. Vol.2. P.1191.
56. *Kurganov A.A., Zhuchkova L.Y., Davankov V.A.* // *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1978. Vol.40. P.1081.
57. *Davankov V.A.* // *Chiral Separations by HPLC./* Ed. by A.M.Krstulovich. Ellis Horwood, Chichester, West Sussex, England, 1989.
58. *Allenmark S.G.* // *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications.* Ellis Horwood, Chichester, West Sussex, England, 1988.
59. *Chiral Separations by HPLC: Applications to Pharmaceutical Compounds.* / Ed. by A.M.Krstulovich. Ellis Horwood, Chichester, West Sussex, England, 1989.
60. *Daepfen R., Arm H., Meyer V.R.* // *J. Chromatogr.* 1986. Vol.373. P.1.
61. *Krstulovich A.M.* // *Ibid.* 1989. Vol.488. P.53.
62. *Wainer I.W.* // *Trends Anal. Chem.* 1987. Vol.6. P.125.
63. *Min M. de, Levy G., Micheau J.C.* // *J. Chim. Phys.* 1988. Vol.85. P.603.
64. *Armstrong D.W., Han S.M.* // *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 1988. Vol.19. P.175.

65. Mack M., Hauck H.E. // *Chromatographia*. 1988. Vol.26. P.197.
66. Rogozhin S.V., Davankov V.A. Ger. Offen. 1932190 (1970); *Chem. Abstr.*, 72: 1970. Vol.72. P.90875 c.
67. Рогожин С.В., Даванков В.А. // Докл. АН СССР. 1970. Т. 192. С.1288.
68. Davankov V.A., Rogozhin S.V., Tsyurupa M.P. U.S. Patent 3729457 (1970); *Chem. Abstr.* 1971. Vol.75. P.6841v.
69. Davankov V.A., Tsyurupa M.P. // *Angew. Macromol. Chem.* 1980. Vol.91. P.127.
70. Rosenberg G.I., Shabaeva A.S., Moryakov V.S. e.a. // *React. Polym.* 1983. Vol.1. P.175.
71. Davankov V.A., Tsyurupa M.P. // *Ibid.* 1990. Vol.13. P.27.
72. Даванков В.А., Рогожин С.В., Песлякас И.И. // *Высокомолек. соед.* 1972. Т.14Б. С.276.
73. Даванков В.А., Рогожин С.В., Песлякас И.И., Веса В.С. // Там же. 1973. Т.15Б. С.115.
74. Tsuchida E., Nishikawa H., Terada E. // *Eur. Polym. J.* 1976. Vol.12. P.611.
75. Даванков В.А. Докт. дисс. ИХЭОС.М., 1975.
76. Jozefonvicz J., Prtit M.A., Szubarga A. // *J. Chromatogr.* 1978. Vol.147. P.177.
77. Rogozhin S.V., Yamskov I.A., Davankov V.A. e.a. // *Vysokomol. Soedin.* 1975. Vol.17A. P.564.
78. Рогожин С.В., Ямсков И.А., Даванков В.А. и др. // *Высокомолек. соед.* 1975. Т.17Б. С.107.
79. Рогожин С.В., Ямсков И.А., Даванков В.А. // Там же. 1974. Т.16Б. С.849.
80. Рогожин С.В., Ямсков И.А., Даванков В.А. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1971. С.2325.
81. Spassky N., Riex M., Guitte J. e.a. // *J. Compt. Rend.* 1978. Vol.C.287. P.589.
82. Даванков В.А., Рогожин С.В., Ямсков И.А., Кабанов В.П. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1971. С.2325.
83. Rogozhin S.V., Davankov V.A., Yamskov I.A., Kabanov V.P. // *Zh. Obshch. Khim.* 1972. Vol.42. P.1614.
84. Berezin B.B., Yamskov I.A., Davankov V.A. // *J. Chromatogr.* 1983. Vol.261. P.301.
85. Рогожин С.В., Даванков В.А., Ямсков И.А. // *Высокомолек. соед.* 1973. Т. 15Б. С.216.
86. Рогожин С.В., Даванков В.А., Ямсков И.А., Кабанов В.П. // *Журн. орг. химии.* 1972. Т.2. С.1614.
87. Davankov V.A., Zolotarev Y.A. // *J. Chromatogr.* 1978. Vol.155. P.295.
88. Ямсков И.А., Березин Б.Б., Тихонов В.Е. и др. // *Биоорг. химия.* 1978. Т.4. С.1170.
89. Рогожин С.В., Ямсков И.А., Пушкин А.С. и др. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1976. N.10. С.2378.
90. Snyder R.V., Angelichi R.J., Meck R.B. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1972. Vol.94. P.2660.
91. Yamskov I.A., Berezin B.B., Davankov V.A. // *Macromol. Chem.* 1978. Vol.179. P.2121.
92. Белов Ю.П., Рогожин С.В., Даванков В.А. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1973. N.10. С.2320.

93. Белов Ю.П., Даванков В.А., Рогожин С.В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1977. N.8. С.1856.
94. Kurganov A.A., Zhuchkova L.Y., Davankov V.A. // Macromol. Chem. 1979. Vol.180. P.2102.
95. Beca B.C. // Журн. орг. химии. 1972. Т.42. С.2780.
96. Muller D., Jozefonvicz J., Petit M.-A. // J. Inorg. Nucl. Chem. 1980. Vol.42. P.1665.
97. Davankov V.A., Zolotarev Y.A. // J. Chromatogr. 1978. Vol.155. P.285.
98. Davankov V.A., Zolotarev Y.A. // Ibid. P.303.
99. Davankov V.A., Kurganov A.A. // Chromatographia. 1980. Vol.13. P.339.
100. Davankov V.A., Zolotarev Y.A., Kurganov A.A. // J. Liq. Chromatogr. 1979. Vol.2. P.1191.
101. Myasoedov N.F., Kuznetsova O.B., Petrenik O.V. e.a. // J. Labelled Compd. Radiopharmac. 1979. Vol.17. P.439.
102. Zolotarev Y.A., Myasoedov N.F., Penkina V.I. e.a. // J. Chromatogr. 1981. Vol.207. P.63.
103. Zolotarev Y.A., Myasoedov N.F., Penkina V.I. e.a. // Ibid. P.231.
104. Даванков В.А., Золотарев Ю.А., Тевлин А.В. // Биоорг. химия. 1978. Т.4. С.1164.
105. Широков В.А., Цыряпкин В.А., Недоспасова Л.В. и др. // Там же. 1983. Т.878. С.9.
106. Ямсков И.А., Рогожин С.В., Даванков В.А. // Там же. 1977. Т.3. С.200.
107. Lefebvre B., Audebert R., Quivoron C. // Instr. J. Chem. 1977. Vol.15. P.69.
108. Lefebvre B., Audebert R., Quivoron C. // J. Liq. Chromatogr. 1978. Vol.1. P.761.
- 109—110. Jearneret-Gris G., Soerensen C., Su H., Porret J. // Chromatographia. 1989. Vol.28. P.337.
111. Muller D., Jozefonvicz J., Petit M.-A. // J. Inorg. Nucl. Chem. 1980. Vol.42. P.1083.
112. Lafuma F., Boue J., Audebert R., Quivoron C. // Inorg. Chim. Acta. 1982. Vol.66. P.167.
113. Yamskov I.A., Berezin B.B., Davankov V.A. e.a. // J. Chromatogr. 1981. Vol.217. P.539.
114. Charmot D., Audebert R., Quivoron C. // J. Liq. Chromatogr. 1985. Vol.8. P.1753.
115. Charmot D., Audebert R., Quivoron C. // Ibid. P.1769.
116. Watanabe N., Ohzeki H., Niki E. // J. Chromatogr. 1981. Vol.216. P.406.
117. Zolotarev Y.A., Kurganov A.A., Davankov V.A. // Talanta. 1978. Vol.25. P.493.
118. Zolotarev Y.A., Kurganov A.A., Semechkin A.V., Davankov V.A. // Ibid. P.499.
119. Davankov V.A. // Pure Applic. Chem. 1982. Vol.54. P.2159.
120. Bochkov A.S., Zolotarev Y.A., Belov Y.P., Davankov V.A. // Progress in Chromatography, Proc. 2nd Danube Symposium, Carlsbad, Czechoslovakia, 1979. Paper B3.23.
121. Roumeliotis P., Unger K.K., Kurganov A.A., Davankov V.A. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1982. Vol.21. P.930.
122. Roumeliotis P., Kurganov A.A., Davankov V.A. // J. Chromatogr. 1983. Vol.266. P.439.

123. Roumeliotis P., Unger K.K., Kurganov A.A., Davankov V.A. // *Ibid.* Vol.255. P.51.
124. Sugden K., Hunter C., Lloyd-Jones G. // *Ibid.* 1980. Vol.192. P.228.
125. Gelber L.R., Karger B.L., Neumeyer J.L., Feibush B. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1984. Vol.106. P.7729.
126. Shieh C.H., Karger B.L., Gelber L.R., Feibush B. // *J. Chromatogr.* 1987. Vol.406. P.343.
127. Feibush B., Cohen M.J., Karger B.L. // *Ibid.* 1983. Vol.282. P.3.
128. Guebitz G., Jellenz W., Loeffler G., Santi W. // *J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun.* 1979. Vol.2. P.145.
129. Guebitz G., Jellenz W., Santi W. // *J. Liq. Chromatogr.* 1981. Vol.4. P.701.
130. Guebitz G., Jellenz W., Santi W. // *J. Chromatogr.* 1981. Vol.203. P.377.
131. Guebitz G., Juffmann F., Santi W. // *Chromatographia.* 1982. Vol.16. P.103.
132. Guebitz G., Juffmann F. // *J. Chromatogr.* 1987. Vol.404. P.391.
133. Галушко С.В., Шишукина И.П., Пулипенко А.Т., Приказчикова Л.П. // *Журн. анал. хим.* 1988. Т.43. С.1719.
134. Guebitz G., Mihellyes S. // *Chromatographia.* 1984. Vol.19. P.257.
135. Guebitz G. // *J. Liq. Chromatogr.* 1986. Vol.9. P.519.
136. Yuki Y., Saigo K., Tachibana K., Hasegawa M. // *Chromatography'86.* Chiba, Japan. 1986. P.155.
137. Yuki Y., Saigo K., Tachibana K., Hasegawa M. // *Chem. Lett.* 1986. P.1347.
138. Yuki Y., Saigo K., Kimoto H., Tachibana K., Hasegawa M. // *J. Chromatogr.* 1987. Vol. 400. P. 65.
139. Sinibaldi M., Carunchio V., Corradini C., Girelli A.M. // *Chromatographia.* 1984. Vol.18. P.459.
140. Corradini C., Federici F., Sinibaldi-M., Messina A. // *Ibid.* 1987. Vol.23. P.118.
141. Foucault A., Caude M. // *J. Chromatogr.* 1979. Vol.185. P.345.
142. Lidner W. // *Naturwissenschaften.* 1980. Vol.67. P.354.
143. Engelhardt H., Ahr G. // *Chromatographia.* 1981. Vol.14. P.227.
144. Watanabe N. // *J. Chromatogr.* 1983. Vol.260. P.75.
145. Castells J., Daga J.M., Lopez-Calahorra F., Velasco D. // *React. Polym.* 1987. Vol.6. P.207.
146. Engelhardt H., Kromidas S. // *Naturwissenschaften.* 1980. Vol.67. P.353.
147. Kicinski H.G., Kettrup A. // *Fresenius. Z. Anal. Chem.* 1985. Vol.320. P.51.
148. Lindner W., Hirschboeck I. // *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 1984. Vol.2. P.183.
149. Florance J., Galdes A., Konteatis Z. e.a. // *J. Chromatogr.* 1987. Vol.414. P.313.
150. Takeuchi T., Asai H., Ishii D. // *Ibid.* Vol.407. P.151.
151. Ichida A. // *Int. Lab. №26, March/April.*
152. Brueckner H., Bosch J., Graser T., Fuerst P. // *J. Chromatogr.* 1987. Vol.395. P.569.
153. Brueckner H. // *Fresenius. Z. Anal. Chem.* 1987. Bd 327. S.32.
154. Brueckner H. // *Chromatographia.* 1987. Vol.24. P.725.
155. Scapan H., Guenther H., Simon H. // *Angew. Chem.* 1987. Vol.99. P.139.
156. Davankov V.A., Rogozhin S.V., Semechkin A.V. e.a. // *J. Chromatogr.* 1974. Vol.93. P.363.

157. *Kiniwa H., Baba Y., Ishida T., Katoh H.* // *Ibid.* 1989. Vol.461. P.397.
158. *Курганов А.А., Пономарева Т.М., Даванков В.А.* // Докл. АН СССР. 1987. Т.293. С.623.
159. *Kurganov A.A., Tevlin A.V., Davankov V.A.* // *J. Chromatogr.* 1983. Vol.261. P.223.
160. *Davankov V.A., Bochkov A.S., Kurganov A.A. e.a.* // *Chromatographia.* 1980. Vol.13. P.677.
161. *Davankov V.A., Bochkov A.S., Belov Y.P.* // *J. Chromatogr.* 1981. Vol.218. P.547.
162. *Lam-Thanh H., Femandjian S., Fromageo P.* // *Ibid.* 1982. Vol.235. P.139.
163. *Busker E., Martens J.* // *Fresenius. Z. Anal. Chem.* 1984. Bd 319. S.907.
164. *Busker E., Guenther K., Martens J.* // *J. Chromatogr.* 1985. Vol.350. P.179.
165. *Kathoh H., Ishida T., Kuwata S., Kiniwa H.* // *Chromatographia.* 1989. Vol.28. P.481.
166. *Arai T., Matsuda H., Oizumi H.* // *J. Chromatogr.* 1989. Vol.474. P.405.
167. *Katoh H., Ishida T., Baba Y., Kiniwa H.* // *Bunseki Kagaku.* 1989. Vol.38. P.249.
168. *Katoh H., Ishida T., Baba Y., Kiniwa H.* // *J. Chromatogr.* 1989. Vol.473. P.241.
169. *Красутский П.А., Родионов В.Н., Тихонов В.П., Юрченко А.Г.* // Теор. эксп. хим. 1984. Т.20. С.58.
170. *Курганов А.А., Чишевский И.Т., Даванков В.А. и др.* // *Металлоорг. химия.* 1988. Т.1. С.913.
171. *Boue J., Audebert R., Quivoron C.* // *J. Chromatogr.* 1981. Vol.204. P.185.
172. *Charmot D., Audebert R., Quivoron C.* // *J. Liq. Chromatogr.* 1985. Vol.8. P.1769.
173. *Charmot D., Audebert R., Quivoron C.* // *Ibid.* P.1743.
174. *Humbel F., Vonderschmitt D., Bernauer K.* // *Helv. Chim. Acta.* 1970. Vol.53. P.1983.
175. *Bernauer K., Jeanneret M.-J., Vonderschmitt D.* // *Ibid.* 1971. Vol.54. P.297.
176. *Perry J.A., Rateike J.D., Szczerba T.T.* // *J. Chromatogr.* 1987. Vol.389. P.57.
177. *Yoneda H.* // *Ibid.* 1985. Vol.313. P.59.
178. *Guenther K.* // *Ibid.* 1988. Vol.448. P.11.
179. *Nyiredy S., Dallenbach-Toelke K., Sticher O.* // *Ibid.* Vol.450. P.241.
180. *Kovacs-Hadady K., Kiss T.I.* // *Chromatographia.* 1987. Vol.24. P.677.
181. *Le-Page J.N., Lindner W., Davies G. e.a.* // *Anal. Chem.* 1979. Vol.51. P.433.
182. *Lindner W., Le-Page J.N., Davies G. e.a.* // *J. Chromatogr.* 1979. Vol.185. P.323.
183. *Gil-Av E., Tishbee A., Hare P.E.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1980. Vol.102. P.5115.
184. *Lam S.K., Chow F.K.* // *J. Liq. Chromatogr.* 1980. Vol.3. P.1579.
185. *Lam S.K., Chow F.K., Karmen A.* // *J. Chromatogr.* 1980. Vol.199. P.295.
186. *Lam S.K.* // *Ibid.* 1982. Vol.234. P.485.
187. *Lam S.K.* // *J. Chromatogr. Sci.* 1984. Vol.22. P.416.
188. *Lam S., Malikin G., Murphy M. e.a.* // *J. Chromatogr.* 1989. Vol.468. P.359.

189. *Lam S., Karmen A.* // *J. Liq. Chromatogr.* 1986. Vol.9. P.291.
190. *Van der Haar J., Kip J., Kraak J.C.* // *J. Chromatogr.* 1988. Vol.445. P.219.
191. *Wagner J., Wolf E., Heintzelmann B., Gaget C.* // *Ibid.* 1987. Vol.392. P.211.
192. *Horikawa R., Sakamoto H., Tanimura T.* // *J. Liq. Chromatogr.* 1986. Vol.9. P.537.
193. *Gil-Av E., Weinstein S.* // *Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol.1* / Ed. by W. S. Hancock. CRC Press, Boca Raton., Fla. 1984. P.429.
194. *Tapuchi Y., Miller N., Karger B.L.* // *J. Chromatogr.* 1981. Vol.205. P.325.
195. *Davy G.S., Francis P.D.* // *Ibid.* 1987. Vol.394. P.323.
196. *Lam S., Karmen A.* // *Ibid.* 1982. Vol.239. P.451.
197. *Lam S., Karmen A.* // *Ibid.* 1984. Vol.289. P.339.
198. *Lam S., Azumaya H., Karmen A.* // *Ibid.* Vol.302. P.21.
199. *Weinstein S., Engel M.H., Hare P.E.* // *Anal. Biochem.* 1982. Vol.121. P.370.
200. *Weinstein S.* // *TRAC.* 1984. Vol.3. P.16.
201. *Weinstein S.* // *Angew. Chem. Suppl.* 1982. P.425.
202. *Duchateau A., Crombach M., Aussems M., Bongers J.* // *J. Chromatogr.* 1989. Vol.461. P.419.
203. *Weinstein S., Grinberg N.* // *Ibid.* 1985. Vol.318. P.117.
204. *Weinstein S., Weiner S.* // *Ibid.* 1984. Vol.303. P.244.
205. *Benecke J.* // *Ibid.* Vol.291. P.155.
206. *Armani E., Barazoni L., Dossena A., Marchelli R.* // *Ibid.* 1988. Vol.441. P.287.
207. *Doner L.W., Cavender P.J.* // *J. Food Sci.* 1988. Vol.53. P.1898.
208. *Arai T., Koike H., Hirata K., Oizumi H.* // *J. Chromatogr.* 1988. Vol.448. P.439.
209. *Wernicke R.* // *J. Chromatogr. Sci.* 1985. Vol.23. P.39.
210. *Oelrich E., Preusch K., Wilhelm E.* // *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 1980. Vol.3. P.269.
211. *Lebl M., Hrbas P., Skopkova J. e.a.* // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1982. Vol.47. P.2540.
212. *Gelber L.R., Neumeyer J.L.* // *J. Chromatogr.* 1983. Vol.257. P.317.
213. *Klemisch W., Hodenberg A.von, Vollmer K.-O.* // *J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun.* 1981. Vol.4. P.535.
214. *Keller J.W., Niwa K.* // *J. Chromatogr.* 1989. Vol.469. P.434.
215. *Forsman U.* // *Ibid.* 1984. Vol.303. P.217.
216. *Nimura N., Suzuki T., Kasahara Y., Kinoshita T.* // *Anal. Chem.* 1981. Vol.53. P.1318.
217. *Nimura N., Toyama A., Kinoshita T.* // *J. Chromatogr.* 1982. Vol.234. P.482.
218. *Nimura N., Toyama A., Kasahara Y., Kinoshita T.* // *Ibid.* Vol.239. P.671.
219. *Nimura N., Toyama A., Kinoshita T.* // *Ibid.* 1984. Vol.316. P.547.
220. *Gilon C., Leshem R., Grushka E.* // *Ibid.* 1981. Vol.203. P.365.
221. *Gilon C., Leshem R., Grushka E.* // *Anal. Chem.* 1980. Vol.52. P.1206.
222. *Grushka E., Leshem R., Gilon C.* // *J. Chromatogr.* 1983. Vol.255. P.41.
223. *Gilon C., Leshem R., Tapuhi Y., Grushka E.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1979. Vol.101. P.7612.

224. *Gundlach G., Sattler E.L., Wagenbach U.* // *Frezenius Z. Anal. Chem.* 1982. Bd 311. S.684.
225. *Kato S., Kamakura H., Ariizumi S.* // *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 1986. Vol.27. P.272. *Chem. Abstr.* 1986. Vol.105. P.202486k.
226. *DuBois G.E., Stephenson R.A.* // *J. Agric. Food Chem.* 1982. Vol.30. P.676.
227. *Lindner W.F., Hirschboeck I.* // *J. Liq. Chromatogr.* 1986. Vol.9. P.551.
228. *Kurganov A.A., Davankov V.A.* // *J. Chromatogr.* 1981. Vol.218. P.559.
229. *Marchelli R., Dossena A., Castani G. e.a.* // *Angew. Chem.* 1985. Vol.24. P.336.
230. *Armani E., Dossena A., Marchelli R., Virgili R.* // *J. Chromatogr.* 1988. Vol.441. P.275.
231. *Marchelli R., Dossena A., Castani G. e.a.* // *Chem. Commun.* 1985. P.1672.
232. *Palla G., Marchelli R., Dossena A., Castani G.* // *J. Chromatogr.* 1989. Vol.475. P.45.
233. *Takeuchi T., Horikawa R., Tanimura T.* // *Anal. Chem.* 1984. Vol.56. P.1152.
234. *Takeuchi T., Horikawa R., Tanimura T.* // *J. Chromatogr.* 1984. Vol.284. P.285.
235. *Brode J.M., Leussing D.L.* // *Anal. Chem.* 1986. Vol.58. P.2237.
236. *Hare P.E., Gil-Av E.* // *Science.* 1979. Vol.204. P.1226.
237. *Gassmann E., Kuo J.E., Zare R.N.* // *Ibid.* 1985. Vol.230. P.813.
238. *Gozel P., Gassmann E., Michelsen H., Zare R.N.* // *Anal. Chem.* 1987. Vol.59. P.44.
239. *Cohen A.S., Paulus A., Karger B.L.* // *Chromatographia.* 1987. Vol.24. P.15.
240. *Snopek J., Jelinek I., Smolkova-Keulemansova E.* // *J. Chromatogr.* 1988. Vol.452. P.571.
241. *Dobashi A., Ono T., Hara S., Yamaguchi J.* // *Ibid.* 1989. Vol.480. P.413.
242. *Даванков В.А., Рогожин С.В.* // *Докл. АН СССР.* 1970. Т.193. С.94.
243. *Shich C.H., Karger B.L., Gelber L.R., Feibush B.* // *J. Chromatogr.* 1987. Vol.406. P.343.

Рукопись поступила 10. 09. 92