

С. Алленмарк

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ

Издательство << Мир >>



ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ

CHROMATOGRAPHIC ENANTIOSEPARATION: METHODS AND APPLICATIONS

STIG G. ALLENMARK

Laboratory of Microbiological Chemistry

University of Gothenburg, Sweden

ELLIS HORWOOD LIMITED

Publishers·Chichester

Halsted Press: a division of

JOHN WILEY & SONS

New York·Chichester·Brisbane·Toronto

С. Алленмарк

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ

Перевод с английского
д-ра хим. наук А. А. Курганова



Москва «Мир» 1991

ББК 24.4
А50
УДК 543.544

Алленмарк С. Хроматографическое определение энантио-
А50 меров: Пер. с англ. — М.: Мир, 1991. — 268 с., ил.

ISBN 5-03-001889-1

Книга шведского ученого — одна из первых монографий, посвященных аналитическому определению оптических изомеров и их выделению в чистом виде. Рассмотрены газовый и жидкостной варианты хроматографии. Помимо собственно хроматографических методов (хиральная дериватизация соединений различных классов, хиральная газовая и жидкостная хроматография) освещены методы, используемые для изучения структуры оптических соединений и определения их степени чистоты.

Для специалистов в области химии, микробиологии, фармацевтической химии и др.

А 1707000000 — 045 58—91
041(01) — 91

ББК 24.4

Редакция литературы по химии

ISBN 5-03-001889-1 (русск.)
ISBN 0-85312-988-6 (англ.)

© 1988 S.G. Allenmark/Ellis
Horwood Limited
© перевод на русский язык
Курганов А.А., 1991

ОТ ПЕРЕВОДЧИКА

Оптически активные соединения играют исключительно важную роль во многих биохимических процессах, их исследование имеет принципиальное значение для теоретической органической химии и фармации, а контроль оптической чистоты производимых лекарственных средств в настоящее время законодательно введен во всех промышленно развитых странах. В свете этого не удивителен все возрастающий интерес исследователей к совершенствованию старых и разработке новых методов разделения рацематов и контроля оптической чистоты получаемых продуктов. Однако вплоть до последнего времени методы разделения оптических изомеров мало отличались от предложенных Пастером еще в конце прошлого века, и лишь развитие хроматографии, особенно высокоэффективной жидкостной хроматографии, открыло новую страницу в этой области химической науки. Разработка хроматографических методов разделения энантиомеров позволила не только получать хиральные соединения со стопроцентной степенью оптической чистоты, но и, что особенно важно, перейти от эмпирического поиска разделяющих систем к созданию систем, позволяющих осуществлять разделение целых классов соединений на вполне рациональной основе с предсказуемым успехом.

Интенсивное развитие хроматографических методов разделения оптических изомеров проходило параллельно с развитием самой хроматографии, и большие достижения в этой области являются результатом углубленного изучения процессов хирального распознавания энантиомеров в хроматографических системах, совершенствования хроматографических методов разделения, особенно способов синтеза и структуры применяемых неподвижных фаз. Именно эти вопросы и составляют основу предлагаемой книги. Монография охватывает практически все современные хроматографические методы разделения оптических изомеров, дает их сравнительный анализ и показывает основные области применения. В этом плане предлагаемая книга является первой и пока единственной публикацией подобного рода в отечественной литературе, по-

сколько другие подобные издания были связаны лишь с отдельными хроматографическими методами разделения энантиомеров. Можно надеяться, что она представит интерес как для специалистов, работающих в области хроматографии, так и для тех, кто использует оптически активные соединения в своих исследованиях и хотел бы познакомиться с эффективными и удобными методами их получения и контроля их оптической чистоты.

А. Курганов

ПРЕДИСЛОВИЕ

Оптически активные соединения интересуют химиков с того самого момента, как только выяснилось, что природа обладает удивительной способностью создавать подобные объекты. В то же время разделение синтетических рацемических смесей на оптически активные компоненты всегда представляло сложную задачу и часто рассматривалось как своеобразное искусство ввиду трудности осуществления и непредсказуемости успеха при использовании того или иного метода. Даже сегодня мы еще далеки от того, чтобы рассматривать разделение энантиомеров как вполне рутинную задачу. Однако в последние десять лет начали интенсивно развиваться хроматографические методы разделения энантиомеров, позволившие сконцентрировать знания об источниках хирального распознавания, которые лежат в основе разделения оптических изомеров. Цель данной книги — дать читателю по возможности полное представление о хроматографических методах разделения энантиомеров, причем как теоретическое, так и методологическое, включая, например, представление о типах неподвижных фаз и различных областях их приложения. И хотя в последние годы появился ряд обзоров, посвященных этой теме, к моменту написания данной книги ощущалась отчетливая потребность в монографии, которая обобщила бы имеющийся материал. Поскольку никакое достаточно глубокое обсуждение механизма хирального распознавания, лежащего в основе хроматографии энантиомеров, невозможно, если читатель плохо представляет себе основы органической стереохимии, то первые три главы книги мы посвятили именно этой теме. Изложение указанного материала ни в коей мере не является исчерпывающим, и задача состоит лишь в том, чтобы дать читателю необходимый минимум для понимания последующего материала.

Разделение энантиомеров осуществляется методами жидкостной хроматографии гораздо чаще, чем методами газовой хроматографии. Вследствие этого гл. 7, в которой рассматриваются методы жидкостной хроматографии, по объему существенно больше, чем гл. 6, посвященная газовой хроматографии, а в гл. 9, в которой

рассматриваются препаративные разделения, речь идет только о жидкостной хроматографии.

В каждой из глав дан список литературы, который поможет читателю получить дополнительную информацию по соответствующим вопросам.

Хотелось бы надеяться, что изложенный в книге материал окажется полезным специалистам, занимающимся разделением оптических изомеров хроматографическими методами. Новые области применения хроматографии для разделения оптических изомеров еще только развиваются, особенно в разделах науки, связанных с живой природой, и я сочту свою задачу выполненной, если эта книга будет способствовать развитию данного направления.

В заключение мне хотелось бы выразить признательность сотрудникам и коллегам, чья активная поддержка и помощь были совершенно необходимы при написании книги. Я считаю своим долгом особо поблагодарить г-жу Шалини Андерсон за оформление книги и стилистическую редакцию текста и г-на Ричарда Томпсона за прочтение и рецензирование рукописи. Я выражаю также свою признательность редактору серии д-ру П.А. Чалмерсу за помощь в издании книги. И наконец, я хочу отметить, что большую помощь в написании книги мне оказали контакты и дискуссии со многими ведущими специалистами в данной области и прежде всего с профессорами Г. Блашке, А. Манншреком и В. Пирклом.

*Август, 1987 г.
Готенбург, Швеция*

Стиг Алленмарк

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И СИМВОЛОВ

АГП	— кислый α_1 -гликопротеин (орозомукоид)
БОК	— <i>трет</i> -бутилоксикарбонил (защитная группа)
БСА	— 1) бычий сывороточный альбумин, 2) N, O-бис(триметилсилил)ацетамид
ВЭЖХ	— высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЖХ	— газожидкостная хроматография
ГХ	— газовая хроматография
ДИПТА	— диизопропилтартратамид
ДНБ	— 3,5-динитробензоил
ДОВ	— дисперсия оптического вращения
ДОФА	— 3-(3,4-диоксифенил)аланин
ДСК	— дифференцирующая сканирующая калориметрия
ДЦК	— дициклогексилкарбодиимид
ДЭЗ	— детектор электронного захвата
ЖХ	— жидкостная хроматография
КД	— круговой дихроизм
КПЗ	— комплекс с переносом заряда
МТАЦ	— микрокристаллическая триацетилцеллюлоза
МС	— масс-спектрометрия
ПИД	— пламенно-ионизационный детектор
ПФП	— пентафторпропионил
РД	— рефрактометрический детектор
СФХ	— сверхкритическая флюидная хроматография
ТАПК	— α -(2, 4, 5, 7-тетранитрофлуоренилиденамин-окси)пропионовая кислота
ТГФ	— тетрагидрофуран
ТИД	— термоионный детектор
ТСХ	— тонкослойная хроматография
ТФА	— трифторацетил
ХЛОХ	— хиральная лигандообменная хроматография
ХНФ	— хиральная неподвижная фаза
ЦД	— циклодекстрин
ЭЭДХ	— N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин

ЯМР	— спектроскопия ядерного магнитного резонанса
A	— поглощение
a.e.	— единица поглощения
α	— 1) измеряемое оптическое вращение, 2) коэффициент разделения (селективность)
$[\alpha]_{\lambda}^T$	— удельное вращение при температуре $T^{\circ}\text{C}$ и длине волны λ нм
$[\alpha]_{\text{макс}}$	— максимальное удельное вращение (соответствует 100%-ной оптической чистоте)
δ	— химический сдвиг в ЯМР
ΔG	— изменение свободной энергии
H	— высота, эквивалентная одной теоретической тарелке (ВЭТТ)
ΔH	— изменение энтальпии
K	— константа распределения сорбата между подвижной и неподвижной фазами
k'	— отношение емкостей (коэффициент емкости)
L	— длина колонки
N	— число теоретических тарелок, приходящееся на колонку
$N_{\text{эфф}}$	— эффективное число тарелок
P	— оптическая чистота
pI	— изоэлектрическая точка
q	— отношение фаз (V_m/V_s)
R	— газовая постоянная [1,986 кал/(К · моль), 8,314 Дж/(К · моль)]
R_s	— фактор (коэффициент) разрешения
ΔS	— изменение энтропии
SCOT	— капиллярные колонки с фазой на подложке
σ	— стандартное отклонение
T	— абсолютная температура, К
t_R	— время удерживания
t_w	— ширина пика в основании
θ	— молекулярная эллиптичность
V_n	— исправленный удерживаемый объем ($V_R - V_0$)
V_0 (или V_m)	— мертвый объем (объем подвижной фазы в колонке)
V_R	— удерживаемый объем
V_S	— объем неподвижной фазы в колонке
WCOT	— полые капиллярные колонки (с неподвижной фазой, нанесенной на стенки)

1. ВВЕДЕНИЕ

Чтобы достаточно полно разобраться в современных хроматографических методах, используемых для разделения оптических изомеров, необходимо иметь четкое представление о наиболее важных достижениях в стереохимии и о методах разделения энантиомеров, которые были развиты задолго до появления хроматографии. Именно эти вопросы и рассматриваются в трех первых главах книги. Три последующие главы посвящены теоретическим проблемам хроматографического разделения энантиомеров. В них также затрагиваются общие принципы жидкостной и газовой хроматографии в приложении к разделению оптических изомеров. В заключительных главах книги обсуждаются аналитическое и препаративное использование хроматографических методов разделения оптических изомеров и тенденции их развития.

Со времени первого расщепления рацемического соединения на энантиомеры, осуществленного Пастером, и до момента создания современных скоростных хроматографических методов наши знания в области стереохимии неизмеримо углубились (рис.1.1). Тем не менее большинство современных методов разделения оптических изомеров базируется на эмпирических результатах.

Почему разделение энантиомеров вызывает интерес у исследователей? Отчасти это, несомненно, обусловлено чисто научным интересом. Данная проблема является вызовом исследователю, и ею можно заниматься как в теоретическом, так и в практическом плане. В течение длительного времени вопросами, связанными с оптическим вращением асимметричных молекул, занимались специалисты в области молекулярной спектроскопии. Несомненна важность оптически активных соединений для выяснения механизма реакций, а динамическое поведение хиральных молекул послужило основой для развития ряда принципиальных положений органической химии. Достаточно вспомнить, что выяснение механизма реакций нуклеофильного замещения и элиминирования (S_N1 , S_N2 , $E1$, $E2$ и т. д.) вряд ли было бы возможно без изучения оптически активных соединений методом поляриметрии. Накопленные в результате

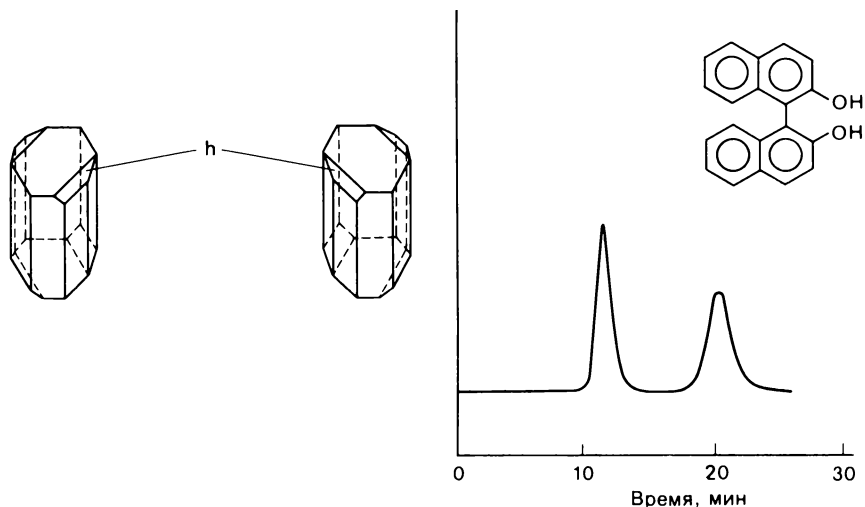


Рис. 1.1. Слева: внешний вид энантиоморфных кристаллов (h — гемиздрическая грань) рацемического натрий-аммоний тартрата, которые были отбором разделены Пастером в 1848 г. Исходя из того что растворы двух выделенных им фракций имеют противоположное оптическое вращение, он предположил, что молекулы, из которых построены соответствующие кристаллы, неидентичны [12] (с разрешения изд-ва). Справа: разделение энантиомеров рацемического бинафтола с помощью жидкостной хроматографии на колонке, содержащей в качестве хиральной неподвижной фазы (+)-поли(трифенилметилметакрилат), имеющий структуру правой спирали [13] (с разрешения изд-ва).

этих исследований знания о механической стереохимии оказали огромное влияние на органический синтез, сделав возможным осуществление таких принципиально важных реакций, как, например, синтез резерпина (рис.1.2) или простагландина $F_{2\alpha}$ (рис.1.3).

Выше уже говорилось о существовании различных природных энантиомеров и их способности к самопревращению с высокой сте-

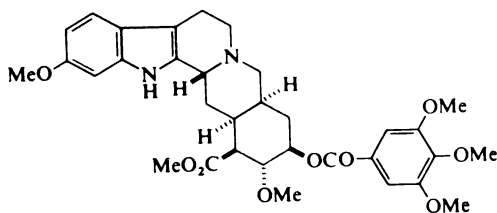


Рис. 1.2. Структура резерпина, содержащего шесть хиральных центров. Полный синтез этого алкалоида выполнен Вудвордом и др. [1], сообщение об этом опубликовано в 1958 г.

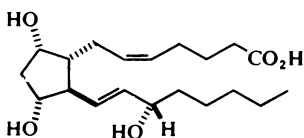


Рис. 1.3. Простагландин $F_{2\alpha}$, имеющий пять хиральных центров. Гормоны ряда простагландина имеют очень большое значение в медицине. Синтез производного $F_{2\alpha}$ -формы (вместе с близким аналогом, относящимся к группе E_2) был проведен Кори и сотр. [2, 3] в конце 60-х годов.





реоспецифичностью. Выяснение структуры ферментов и их стереохимии, выполненное в основном кинетическими и кристаллографическими методами, позволило получить представление о важности пространственного окружения при многоточечном взаимодействии субстрата с активным центром фермента. Равным образом взаимодействие между биологически активным соединением и рецептором часто демонстрирует высокую или даже полную энантиоспецифичность по отношению к энантиомерам. Старый пример различного физиологического поведения энантиомеров можно обнаружить в их вкусе и запахе. В том, что такие данные собраны, нет ничего удивительного, поскольку химики старой школы имели обыкновение пробовать на вкус небольшие количества полученных ими соединений и подробно описывать свои ощущения. И как показывает, в частности, табл.1.1, антиподы обычных аминокислот имеют разный вкус. Различный запах антиподов некоторых терпенов, таких как карвон или лимонен (табл.1.2), также надежно зафиксирован в литературе.

Таблица 1.1. Вкус и абсолютная конфигурация некоторых аминокислот

Аминокислота	Вкус энантиомера	
	D	L
Аспарагин	Сладкий	Безвкусный
Гистидин	Сладкий	Безвкусный
Изолейцин	Сладкий	Горький
Лейцин	Сладкий	Горький
Триптофан	Сладкий	Безвкусный
Тирозин	Сладкий	Горький
6-Хлортриптофан (синтетический)	Сладкий ^a	Безвкусный

^a D-(+)-Энантиомер примерно в 10^3 раз слаще сахара [4, 5].

Таблица 1.2. Запах и абсолютная конфигурация двух простых терпенов

Терпен	Абсолютная конфигурация	Запах
(R)-(-)-Карвон		Мятный
(S)-(+)-Карвон		Тминный
(R)-(+)-Лимонен		Апельсиновый
(S)-(-)-Лимонен		Лимонный

Еще более поразительные примеры хиральной дискриминации в физиологических реакциях могут дать нам гормоны, к которым мы вернемся позднее. Катехоламины, синтезируемые в живом организме из тирозина, являются для человека эндогенными соединениями, которые оказывают чрезвычайно сильное воздействие как регуляторы гормонов, кровяного давления и других важных функций организма. Непосредственным предшественником катехоламинов в организме является *L*-дофа, т. е. 3-гидрокси-*L*-тирозин, из которого в результате ферментативного декарбоксилирования образуется дофамин (рис.1.4). Последующее полностью стереоспецифичное ферментативное гидроксирование дофамина дает хиральное соединение норадреналин, который в конце концов путем *N*-метилирования превращается в адреналин. Дофа-декарбоксилаза полностью стереоспецифична и взаимодействует только с *L*-энантиомером. Обычно страдающим болезнью Паркинсона назначают с целью повышения содержания в крови дофамина курс *L*-дофы. Важность правильной конфигурации у хирального центра адреналина ясно видна из того факта, что природный (R)-(-)-адреналин по меньшей мере в 20 раз более активен, чем его энантиомер, а (R)-(-)-изопропилнорадреналин (изопреналин) примерно в 800 раз более активен как бронходилататор, чем изомер с противоположной конфигурацией [8, 9].

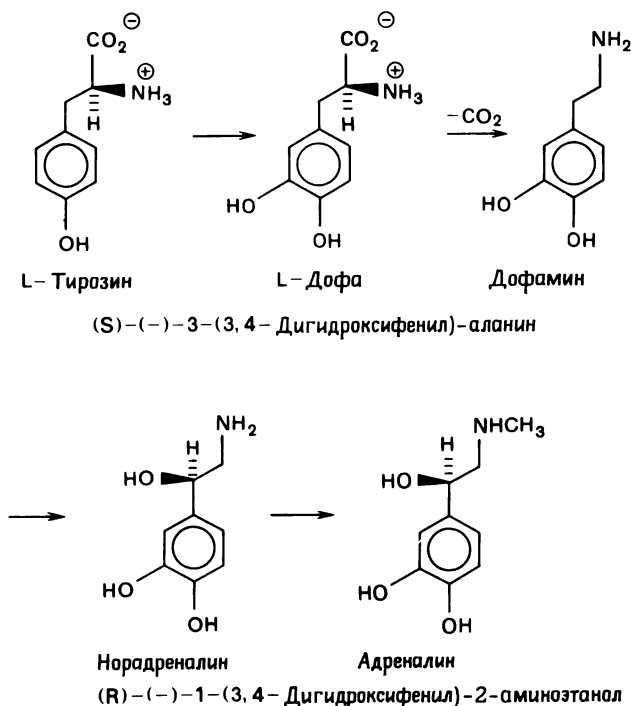


Рис. 1.4. Стереохимические превращения при биосинтезе катехоламинов.

Многочисленные лекарственные средства являются синтетическими рацемическими соединениями, полученными путем синтеза, и в такой форме и используются. Во многих случаях это не вызывает каких-либо осложнений, тем не менее возможна и такая ситуация, когда один из двух энантиомеров является нежелательным компонентом. Трагический пример такого рода — применение седативного и снотворного средства талидомида (рис.1.5). Получивший ши-

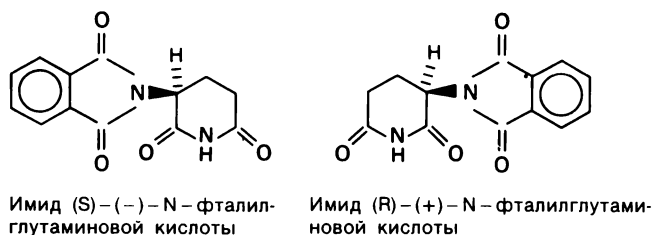


Рис. 1.5. Структура энантиомеров талидомида.

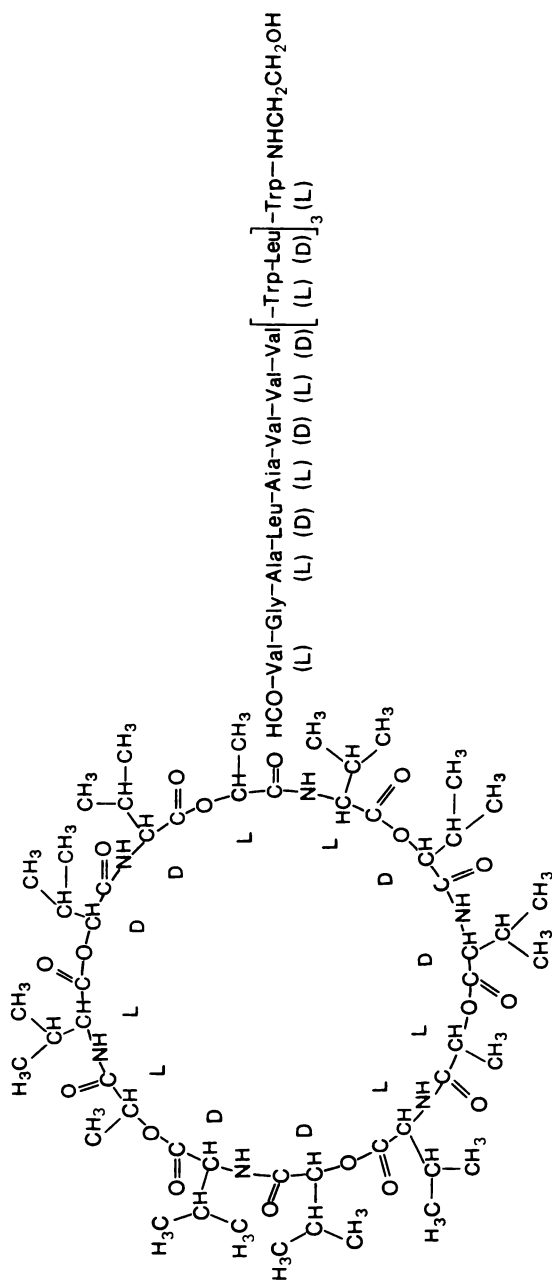


Рис. 1.6. Валиномицин (слева) — макроциклическое соединение, в кольце которого содержится не менее 36 атомов и граммидин А — соединение, молекула которого построена из 15 аминокислот.

рокое распространение в начале 60-х годов, этот препарат явился причиной серьезных уродств у новорожденных, матери которых применяли его на ранних стадиях беременности. В 1979 г. выяснилось, что подобным тератогенным действием обладает только (S)-(—)-изомер талидомида [10, 11]. Более того, этот энантиомер совершенно не обладает седативным и снотворным действием. Таким образом, если бы как лекарственное средство применялся только (R)-(+)-энантиомер, никакого тератогенного эффекта не наблюдалось бы и талидомидом пользовались вплоть до настоящего времени. По этой причине фармацевтическая промышленность проявляет все больший интерес к методам разделения рацематов на оптические антиподы с целью испытания каждого из них на их терапевтическое действие. Отсюда же следует желательность разработки методов контроля оптической чистоты энантиомеров. Данный вопрос подробнее обсуждается в последующих главах.

Для выяснения структуры сложных природных соединений часто приходится прибегать к энантиомерному аминокислотному анализу. Из числа многих важных соединений, синтезируемых низшими, часто прокариотическими, организмами, мы можем выбрать в качестве примера так называемые транспортные антибиотики. Эти соединения имеют совершенно необычные структуры, содержащие D-аминокислотные компоненты. Два представителя подобных соединений показаны на рис.1.6. Валиномицин — соединение с циклической структурой, построенное из четырех троекратно повторенных фрагментов. Отметим чередующиеся амидные и сложноэфирные связи, а также наличие обоих L- и D-валинов в определенных позициях. В отличие от валиномицина грамицидин А — нециклический полипептид с чередующимися L- и D-аминокислотными фрагментами. N-концевой фрагмент его формилован, а C-концевой фрагмент превращен в амид реакцией с этаноламином.

Из этих последних примеров, иллюстрирующих сложность природных стереохимических путей, и из краткой вводной главы должно быть ясно, что хроматографическое разделение и идентификация энантиомеров могут найти самые различные области применения.

Рекомендуемая литература

- Bentley R.* Molecular Asymmetry in Biology, Vols. I, II, Academic Press, New York, 1969, 1970.
- Vennesland B.* Stereospecificity in Biology, *Top. Current Chem.*, **48**, 39 (1974).
- Stryer L.* Biochemistry, Freeman, San Francisco, 1975.
- Ariens E. J., Sojudin W., Timmermans P.* Stereochemistry and Biological Activity of Drugs, Blackwell, Oxford, 1983.

Цитируемая литература

1. Woodward R. B., Bader F. E., Bickel H., Frey A. J., Kierstead R. W. *Tetrahedron*, **2**, 1 (1958).
2. Corey E. J., Weinschenker N. H., Schaaf T. K., Huber W., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5675 (1969).
3. Corey E. J., Koelliker U., Neuffer J. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 1489 (1971).
4. Chedd G. *New Scientist*, **62**, 299 (1974).
5. Kornfeld E. C., Sheneman J. M., Suarez T. *Chem. Abstr.*, **72**, 30438c (1970); **75**, 62341u (1971).
6. Russel G. F., Hills J. I. *Science*, **172**, 1043 (1971).
7. Friedman L., Miller G. *Science*, **172**, 1044 (1971).
8. Albert A. *Selective Toxicity*, 5th Ed., Chapman and Hall, London, 1973.
9. Luduera F., van Euler L., Tullpa B., Lauda A. *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, **11**, 392 (1957).
10. Blaschke G., Kraft H.-P., Fickentscher K., Koehler F. *Arzneim.-Forsch.*, **29**, 1690 (1979).
11. Blaschke G., Kraft H.-P., Markgraf H. *Chem. Ber.*, **113**, 2318 (1980).

2. РАЗВИТИЕ СОВРЕМЕННЫХ СТЕРЕОХИМИЧЕСКИХ ВОЗЗРЕНИЙ

Наличие небольших гемиздрических поверхностей на кристалле натрий-аммоний тартрата позволило Пастеру разделить кристаллы на две группы, в которых кристаллы одной группы являлись зеркальным отображением кристаллов второй группы. Каждый кристалл представлял собой хиральный объект (от греческого *cheir* — рука), т. е. такой объект, который нельзя совместить с его зеркальным отображением. Хотя родоначальником стереохимии мы считаем Ван-Гоффа, опубликовавшего в 1874 г. свою знаменитую работу [1], несомненно, что уже Пастер, когда он соотносил асимметричную структуру кристаллов с самими молекулами, размышлял о молекулярной асимметрии. По современным представлениям молекула является хиральной, если она лишена зеркальной симметрии. Однако, как будет показано ниже, это довольно редкий случай, чтобы рацемат, состоящий из хиральных молекул, соотносящихся как зеркальные отображения, кристаллизовался с образованием энантиоморфных, т. е. хиральных кристаллов, содержащих только одну молекулярную форму. В общем случае кристаллизационный процесс ведет к ахиральным кристаллам, которые морфологически идентичны и содержат обе молекулярные формы в равных количествах.

2.1. ХИРАЛЬНОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА

В этом разделе рассматривается связь между хиральностью и молекулярной структурой. Поскольку молекулы часто обладают в той или иной степени гибкостью, необходимо обсудить вопрос о стабильности хиральной структуры, т. е. об энергетическом барьере, который препятствует взаимопревращению данной молекулярной структуры и ее зеркального отображения.

2.1.1. МОЛЕКУЛЫ С АСИММЕТРИЧЕСКИМ АТОМОМ

Атомы, образующие неплоские молекулярные структуры путем ковалентного связывания с другими атомами, могут создавать также и хиральность. Так, хорошо известны тетраэдрические структуры, образуемые различными группами вокруг атомов таких элементов, как углерод, кремний, азот, фосфор или сера, и в литературе описано большое число оптически активных соединений этого типа.

Элементы V или VI групп Периодической системы могут также образовывать неплоские структуры с тремя лигандами; в качестве четвертого лиганда в таких соединениях можно рассматривать неподеленную пару электронов центрального атома. Некоторые примеры соединений с центральной хиральностью приведены на рис.2.1.

2.1.2. ДРУГИЕ ТИПЫ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ХИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР

Один из простейших классов хиральных структур, не имеющих асимметрического хирального центрального атома, — это производные аллена $H_2C=C=CH_2$. Совершенно очевидно, что замещение одного из водородных атомов у каждого из углеродов на заместитель R уже достаточно для возникновения хиральности, т. е.

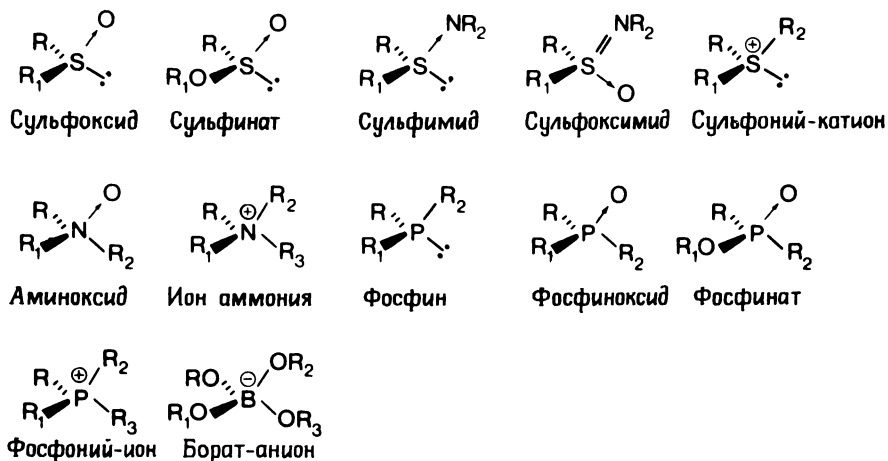
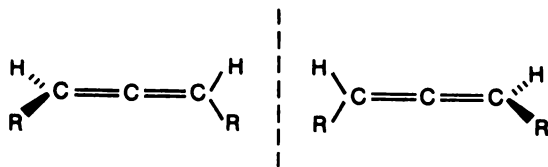


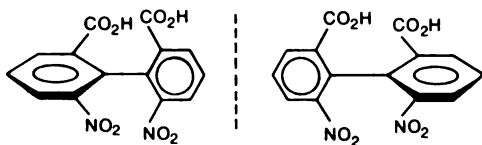
Рис. 2.1. Примеры стабильных хиральных молекул с гетероатомом в качестве хирального центра.

причиной возникновения хиральности является особая геометрия этой молекулы:

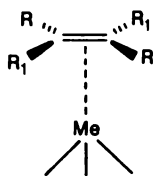


Очень сходный тип оптической изомерии обнаружен в координационных комплексах ионов металлов с алкенами и в металлоценах (рис.2.2).

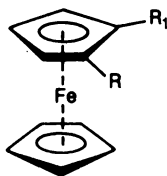
Вопросом первостепенной важности для изомерии алленового типа является, несомненно, жесткость молекулярной структуры. Поскольку в нормальных условиях вращение вокруг двойной связи невозможно, какое-либо взаимопревращение оптических изомеров также исключается. Очевидно, любые структуры этого типа будут давать стабильные оптические изомеры только в том случае, если взаимопревращение между энантиомерами, происходящее вследствие вращения, будет в достаточной степени ограничено. Это требование выполняется и у некоторых замещенных биариллов, и *o, o'*-динитродифеновая кислота является классическим примером этого типа соединений — так называемых атропоизомеров.



В данном случае ограничение вращения вокруг центральной связи вызвано стерическими взаимодействиями между заместителями. Эти группы просто слишком велики, чтобы пройти мимо друг друга, в результате чего и появляется конфигурационная стабильность.



Комплекс металл-алкен



Производное ферроцена

Рис. 2.2. Примеры типов хиральности в металлоорганических соединениях.

Родственный случай изомерии найден в так называемых донорно-акцепторных, или поляризованных, этиленах, где электронные эффекты заместителей вызывают ослабление π -связи, тем самым понижая барьер вращения. Если стерические взаимодействия между двумя половинками молекулы достаточно велики, она примет в растворе скрученную конформацию. Следствием этого может оказаться появление хиральной конформации с достаточной конформационной стабильностью, что позволит провести разделение оптических изомеров даже при комнатной температуре [2]. Такая ситуация изображена на рис.2.3, а.

Похожая ситуация реализуется в других типах соединений, имеющих частично двосвязанный характер химических связей. Наглядный пример подобных соединений обнаружен среди широко исследованных тиамидов [3] (рис.2.3, б).

Сходство атропоизомерии и алленовой изомерии становится более наглядным, если пару идентичных заместителей (А и В) пространственно представить следующим образом:



Молекулярная асимметрия в биарилах может быть обусловлена также образованием мостика между двумя *орто*-заместителями,

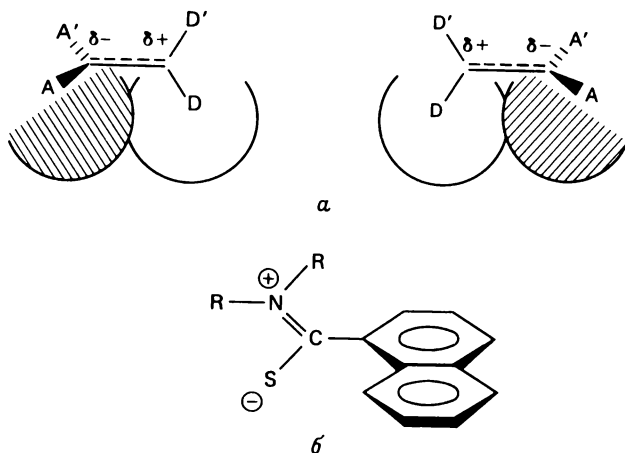
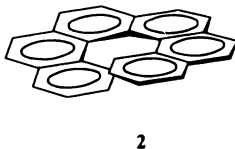
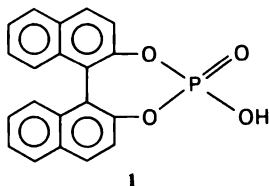


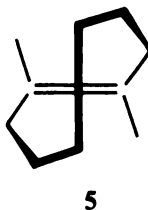
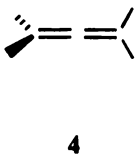
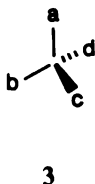
Рис. 2.3. Совместное действие электронных и стерических эффектов при возникновении стабильных энантиомерных конформаций в поляризованных этиленах (а) А и D — акцепторная и донорная группы соответственно. Хиральная скошенная конформация в тиамидах (б).

как, например, в бинафтилфосфорной кислоте (1). Более того, стерическая стесненность молекулы может вызвать молекулярные искажения и, следовательно, хиральность. К типичным соединениям с молекулярной асимметрией такого рода относятся, например, конденсированные ароматические углеводороды, называемые *гелиценами* (2).



Стерические напряжения являются причиной спиральной формы молекулы, и энергетический барьер между правым и левым энантиомерами достаточно велик, чтобы позволить их разделение.

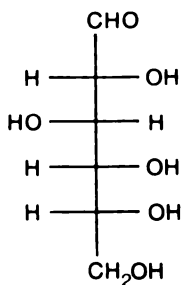
Итак, хиральные молекулы могут быть совершенно различны по природе или форме, но в соответствии с имеющимися у них признаками симметрии их можно отнести к одному из трех классов, обладающих соответственно центральной, аксиальной или планарной хиральностью. Это означает, что трехмерное пространство вокруг хирального центра (3), хиральной оси (4) или хиральной плоскости (5) может быть занято асимметричным образом.



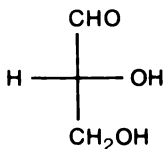
2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И НОМЕНКЛАТУРА

Теперь весьма уместно задать вопрос, каким же образом можно узнать истинное пространственное расположение атомов и групп в оптически активной молекуле? Большая часть фундаментальных исследований по оптически активным соединениям и их химическим превращениям была фактически выполнена в то время, когда установить строение такой молекулы не представлялось возможным. Только в 1951 г. Бийо и соав. [4], используя эффект аномального рассеяния света, определили методом рентгеноструктурного анализа абсолютную конфигурацию D-(+)-тартрата рубидия. Выясни-

лось, что конфигурация D-глюкозы (6), произвольно определенная Фишером и конфигурационно связанная с D-глицериновым альдегидом (7), случайно оказалась правильной. Этот вывод недавно был перепроверен на основе новых стереохимических исследований [5].



6



7

Фишеровская проекционная формула D-глюкозы (альдегидная форма) и D-глицеринового альдегида. (Вертикальные связи направлены за плоскость рисунка, горизонтальные — по направлению к наблюдателю.)

D, L-Номенклатура, которая связывает различные оптически активные соединения друг с другом (в частности, соединения углеводов, окси- и аминокислот), до сих пор распространена довольно широко, а применительно к углеводам вообще не была заменена на какую-либо другую (по очевидным причинам, которые будут приведены ниже).

Однако данную номенклатуру можно распространить только на соединения с асимметрическим углеродным атомом, поэтому необходима более универсальная система классификации. В 1956 г. Кан, Ингольд и Прелог [6, 7] представили так называемую (R, S)-номенклатуру, которая применима к любой хиральной молекуле и позволит определять абсолютную конфигурацию непосредственно из (R)- или (S)-обозначения.

Эта система вкратце описана ниже, а за более подробной информацией читатель может обратиться к оригинальным работам.

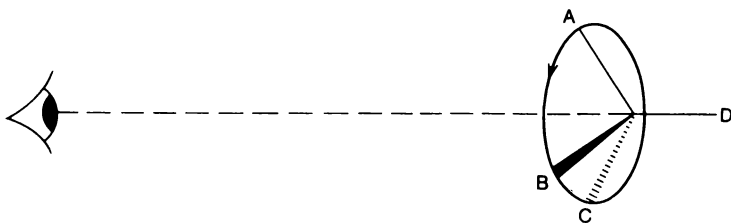
СИСТЕМА КАНА-ИНГОЛЬДА-ПРЕЛОГА

Определение конфигурации по указанной системе включает три последовательные стадии: 1) сначала лиганды, связанные с элементом хиральности, располагают в определенной последовательности, после чего, 2) используя эту последовательность, определяют направление хиральности и, наконец, 3) используя направление хиральности, классифицируют элемент хиральности.

1. Лигандам, расположенным вокруг центра хиральности, присваивают приоритеты в соответствии со следующими основными правилами:

- а) больший атомный номер дает преимущество,
- б) большая атомная масса дает преимущество,
- в) *цис* имеет преимущество перед *транс*,
- г) подобные пары (R,R) или (S,S) имеют преимущество перед несходными парами (R, S) или (S, R),
- д) неподеленная пара электронов рассматривается как атом с атомным номером 0.

2. В соответствии с этими правилами лиганды получают приоритеты $A > B > C > D$, и молекула рассматривается теперь наблюдателем таким образом, что лиганд D (низший приоритет) направлен в противоположную от наблюдателя сторону:

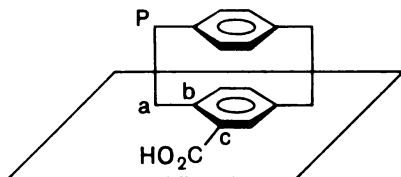


3. Оставшиеся лиганды считываются наблюдателем, начиная с того, который имеет высший приоритет (например, A, B, C). Если считывание ведется по часовой стрелке, то изомер обозначается (R) (правильный), если же считывание ведется против часовой стрелки, то изомер обозначается (S) (неправильный). Таким образом, приведенный выше в качестве примера изомер имеет конфигурацию (R).

Правила отбора для аксиальной хиральности предполагают, что ближайшие к оси атомы рассматриваются как предпочтительные, например *орто*-углеродные атомы в биарильных соединениях.

Для молекул, обладающих планарной хиральностью, прежде всего необходимо выбрать плоскость хиральности. Второй шаг включает определение направленного атома P, который должен быть непосредственно связан с атомом в плоскости и расположен на предпочтительной (ближней) стороне. P выбирается согласно правилам последовательности. Следующий шаг заключается в том, что нужно перейти от P к атому, расположенному в плоскости, с которым он непосредственно связан (а). Этот атом в дальнейшем рассматривается как имеющий высший приоритет среди атомов, расположенных в плоскости. Второй атом в последовательности

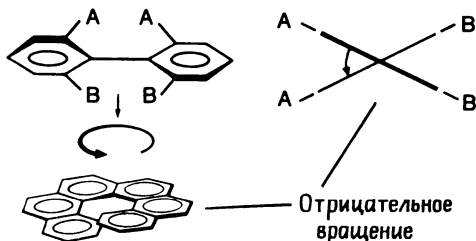
приоритетов — это атом, расположенный в плоскости (b), непосредственно связанный с (a) и имеющий, согласно стандартным правилам, наибольший приоритет. После окончательного определения приоритетов можно применить приведенное выше правило определения хиральности. Использование описанных правил показано ниже на примере парациклофана.



(R)-(-)-[2,2] парациклофан-4-карбоновая кислота

Гелицены можно рассматривать как соединения, молекулы которых обладают аксиальной хиральностью, но целесообразнее рассматривать их как вторичные структуры. Их хиральность лучше всего описывается в терминах спиральности. Так, для гексагелицена представленная ниже (—)-форма образует левую спираль [M(= минус)-спиральность] и поэтому обозначается M(—). Противоположный энантиомер обозначается P(плюс).

M, P-номенклатура часто используется также для хиральных биариллов. В этом случае прежде всего через простую связь, вокруг которой определяется конформация, проводится ось. Далее выбирается конформер, имеющий минимальный торсионный угол между углеродными атомами, несущими группы с наивысшим приоритетом. Эта конформация и служит для определения направления спиральности.



Ниже суммированы некоторые важные соотношения и определения.

Стереохимические концепции, используемые в этой книге

Стереизомеры: молекулы, различающиеся только пространственным расположением заместителей.

1. **Энантиомеры**, или оптические антиподы: молекулы, которые являются хиральными и соотносятся друг с другом посредством симметрии отражения. Они имеют полностью одинаковую внутреннюю энергию.

2. **Диастереомеры**: стереомеры, которые не соотносятся друг с другом посредством симметрии отражения и не обладают одинаковой внутренней энергией.

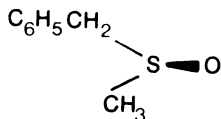
Хиральные соединения: соединения, состоящие из молекул, которые или асимметричны, или дисимметричны и имеют зеркальное отображение, не совпадающее с оригиналом.

Асимметричная молекула: молекула, не имеющая каких-либо элементов симметрии.

Дисимметричная молекула: молекула, не обладающая каким-либо элементом симметрии класса S_n . Это означает, что у нее нет ни плоскости симметрии (S_1), ни центра симметрии (S_2), но могут присутствовать оси симметрии типа C_n , т.е. простые оси вращения ($n > 1$).

Упражнения

1. (—)-Бензилметилсульфоксид может быть представлен проекционной формулой



Дайте его обозначение согласно (R, S)-номенклатуре.

2. Используя правила (R, S)-номенклатуры, запишите абсолютную конфигурацию (S)-формы серина $[\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}]$. Превратите ее в проекционную формулу Фишера и определите, принадлежит она к D- или L-ряду.

3. Запишите стереопроjectionную формулу и назовите по рациональной номенклатуре (система К—И—П) все возможные изомеры 2,8-диметил-1,7-диоксаспиро[5.5]ундекана (ферромон).

Рекомендуемая литература

- Mislow K. Introduction to Stereochemistry, Benjamin, Menlo Park, Cal., 1965.
Krow G. The Determination of Absolute Configuration of Planar and Axially Dissymmetric Molecules, Top. Stereochem., 5, 31 (1970).
Mead C. A. Symmetry and Chirality, Top. Current Chem., 49 (1974).
Kagan H. B. Organic Stereochemistry, Arnold, London, 1979.

Testa B. Principles of Organic Stereochemistry, Dekker, New York, 1979.

Jacques J., Collet A., Wilen S. H. Enantiomers, Racemates and Resolutions, Wiley, London, 1981.

Schlogel K. Planar Chiral Molecular Structures, *Top. Stereochem.*, **125**, 27 (1984).

Цитируемая литература

1. *Benfey O. T.* (ed.) Classics in the Theory of Chemical Combination, Dover, New York, 1963, p. 151.
2. *Sandstrom J.* *Top. Stereochem.*, **14**, 83 (1982).
3. *Eiglspreger A., Kasten F., Mannschreck A.* *J. Mol. Structure*, **126**, 421 (1985).
4. *Bijvoet J. M., Peerdeman A. F., van Bommel A. J.* *Nature*, **168**, 271 (1951).
5. *Buding H., Deppisch B., Musso H., Snatzke G.* *Angew. Chem.*, **97**, 503 (1985).
6. *Cahn R. S., Ingold C. K., Prelog V.* *Experimentia*, **12**, 81 (1956).
7. *Cahn R. S., Ingold C. K., Prelog V.* *Angew. Chem. Int. Ed.*, **5**, 385, 511 (1966).
8. *Prelog C., Helmchen G.* *Angew. Chem.*, **94**, 614 (1982); *Int. Ed.*, **21**, 567 (1982).

3. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ИЛИ ЭНАНТИОМЕРНОЙ ЧИСТОТЫ

Один из наиболее важных вопросов, возникающих при изучении оптически активных соединений, — это вопрос о том, как определять их чистоту. Причем в данном случае это, во-первых, чистота соединения как таковая в том плане, в каком она определяется обычными аналитическими методами, используемыми в органической химии, и, во-вторых, его энантиомерная чистота, т.е. чистота, показывающая содержание какого-то конкретного энантиомера. В данной книге рассматриваются только энантиомерная чистота соединений и имеющиеся на сегодняшний день методы ее определения. Эти методы можно разбить на две основные группы в зависимости от того, предусматривают они или не предусматривают разделение энантиомеров.

3.1.1. МЕТОДЫ, НЕ ТРЕБУЮЩИЕ РАЗДЕЛЕНИЯ ЭНАНТИОМЕРОВ

К числу основных методов определения энантиомерного состава, не требующих предварительного разделения энантиомеров, относятся: поляриметрия, ядерный магнитный резонанс (ЯМР), изотопное разбавление, калориметрия и ферментативные методы. Все эти методы, за исключением ЯМР, основываются на измерении разностного эффекта и, следовательно, требуют для сравнения данные об оптически чистом энантиомере.

3.1.1.1. ПОЛЯРИМЕТРИЯ

В основе этого метода лежит уникальное свойство хиральных соединений — способность поворачивать плоскость поляризации плоскополяризованного света. Бийо [1] первым показал, что некоторые природные соединения обладают этим свойством. Очень кратко это явление можно объяснить следующим образом: поляризованный свет, т.е. свет, плоскость поляризации которого ограничена единственной плоскостью, состоит из двух векторов, циркулярно поляризованных в левую и правую стороны соответственно

(рис.3.1). Поскольку эти векторы являются хиральными объектами, к тому же взаимными антиподами, они ведут себя по-разному при взаимодействии с хиральными молекулами. При прохождении через среду, содержащую хиральные молекулы, они вследствие этого распространяются с различной скоростью. В результате суммарный вектор, который определяет плоскость поляризации, окажется повернутым.

Поворот плоскости, или *оптическое вращение*, α зависит от ряда факторов, таких как концентрация растворенного вещества, длина оптического пути, тип растворителя, температура, длина волны света и т. д. Для того чтобы получить величину, пригодную для характеристики оптически активного соединения, необходимо стандартизовать условия измерения. *Удельное вращение* $[\alpha]$ определяют согласно уравнению (3.1):

$$[\alpha]_{\lambda}^T = 100\alpha/lc \quad (3.1)$$

где α — измеренное оптическое вращение, T — температура, °C, l — длина оптического пути в кювете, дм, c — концентрация раствора, г/100 мл.

Удельное вращение часто в очень большой степени зависит от типа растворителя и может также зависеть от используемой концентрации вещества. Поэтому данные параметры всегда должны быть указаны. Запись, подобная следующей: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +192$ ($c = 2$, диоксан) [это удельное вращение (оптически чистого) гормона прогестерона], содержит всю необходимую информацию. Впоследствии для любого исследователя не составит труда проанализировать это соединение при его синтезе.

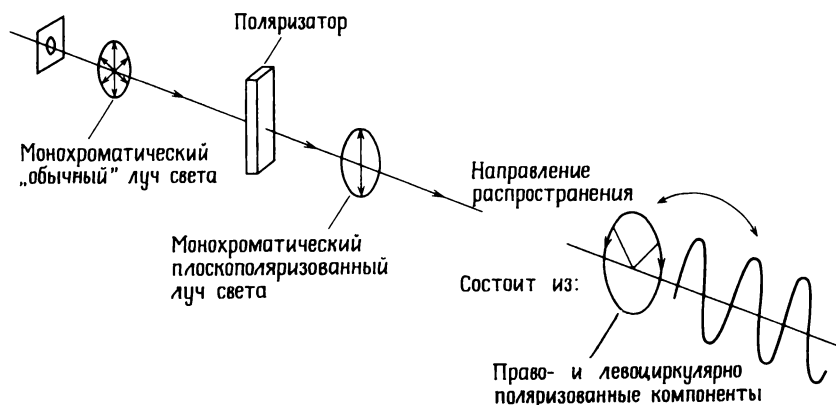


Рис. 3.1. Выделение плоскополяризованного света из обычного монохроматического.

Если обозначить удельное вращение оптически чистого соединения $[\alpha]_{\text{макс}}$, то оптическую чистоту $P(\%)$ образца с удельным вращением $[\alpha]$ можно найти из следующего соотношения:

$$P = 100[\alpha]/[\alpha]_{\text{макс}} \quad (3.2)$$

Выражение (3.2) является определением оптической чистоты. Поскольку оно базируется на экспериментально определенных хирооптических свойствах, то может содержать систематические ошибки и не всегда соответствовать действительному энантиомерному составу или энантиомерной чистоте. Строго говоря, оптическая чистота линейно связана с энантиомерной чистотой (отражающей *истинный* состав) только в том случае, если для молекул энантиомеров в растворе отсутствует ассоциация. Поэтому методы, позволяющие разделить энантиомерные формы, в общем случае более предпочтительны. Также очевидно, что точность, с которой можно определить оптическую чистоту методом поляриметрии, не столь высока, как получаемая при помощи методов, включающих разделение энантиомеров.

Кроме того, для поляриметрического определения оптической чистоты необходимо знать удельное вращение вещества в оптически чистом состоянии. Если такие данные отсутствуют и если экспериментатор не располагает оптически чистым образцом, $[\alpha]_{\text{макс}}$ следует определять непрямыми методами.

3.1.1.2. ЯДЕРНЫЙ МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС

Спектры ЯМР энантиомеров не отличаются друг от друга, если энантиомеры не превращены в диастереомерные производные, что уже само по себе требует наличия оптически активного реагента. Помимо превращения энантиомеров в диастереомеры путем взаимодействия с подходящим хиральным реагентом (этот наиболее старый метод был предложен Мислоу и Мошером [3]), имеются два «прямых» метода. Первый, предложенный Пирклом и соавт. [4—8], базируется на использовании хирального растворителя. Особенно часто таким растворителем служит R-(—)-2,2,2-трифтор-1-фенилэтанол. Растворитель вызывает различные химические сдвиги у энантиомеров (на ядрах, которые в других условиях полностью идентичны), и соотношение энантиомеров можно определить путем интегрирования площадей пиков.

Важно отметить, что оптическая чистота растворителя не влияет на результаты интегрирования, т. е. на соотношение площадей

пиков, а влияет только на *разделение* пиков. Основы этого метода проиллюстрированы на рис.3.2, где приведен реальный пример определения оптической чистоты.

Расщепление сигналов, возникающее вследствие различия в химических сдвигах, вызванных взаимодействием с растворителем, в действительности является следствием предпочтительности взаимодействия одного из энантиомеров с хиральным растворителем. Как мы увидим позднее, этот же принцип реализуется в хиральной жидкостной хроматографии, где предпочтительное взаимодействие одного из энантиомеров с хиральной неподвижной фазой (ХНФ) является основой разделения. Фактически именно исследования в области ЯМР-спектроскопии привели Пиркла и соавторов к созданию ХНФ, получивших широкое распространение.

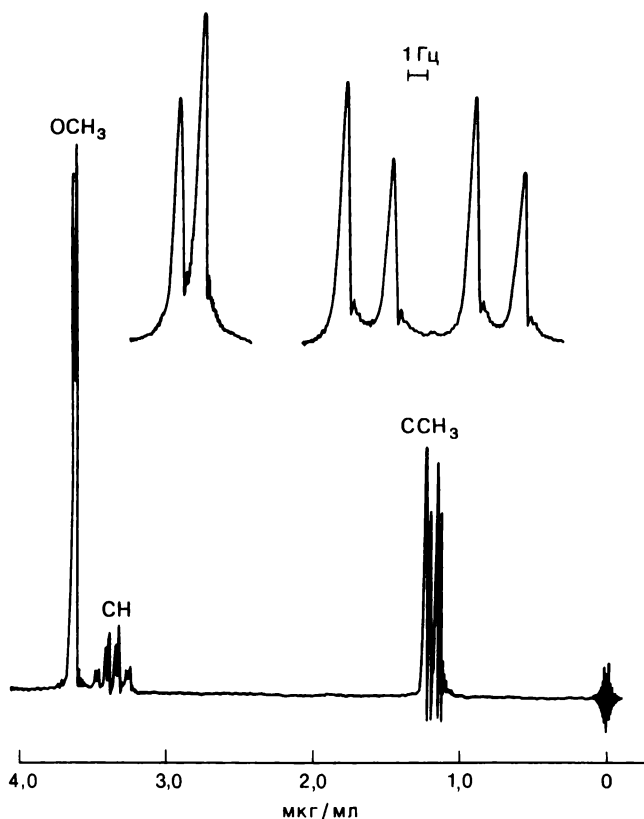


Рис. 3.2. Определение энантиомерного состава энантиомернообогащенного метилового эфира аланина методом ЯМР в растворе оптически активного 2,2,2-трифтор-1-фенилэтанола [9] (с разрешения Am. Chem. Soc.).

Рассмотрим причины возникновения различия в химических сдвигах и методы его использования для энантиомерного анализа. Соединение С (энантиомеры C_R и C_S) взаимодействует с растворителем S (энантиомеры S_R и S_S). В результате в равновесном растворе присутствуют следующие соединения:

Соединение	Концентрация, моль/л
------------	----------------------

C_S	p	
C_R	p'	
C_S-S_S	q	$p + q + r = [C_S]_{\text{общ}}$
C_R-S_R	q'	$p' + q' + r' = [C_R]_{\text{общ}}$
C_S-S_R	r	
C_R-S_S	r'	

Обозначим химический сдвиг δ данного типа ядер в C_S и C_R соответственно δ_S и δ_R . Тогда

$$\delta_{C_S}^{\text{набл.}} = (p \delta_{C_S} + q \delta_{C_S-S_S} + r \delta_{C_S-S_R})/[C_S]_{\text{общ}} \quad (3.3)$$

$$\delta_{C_R}^{\text{набл.}} = (p' \delta_{C_R} + q' \delta_{C_R-S_R} + r' \delta_{C_R-S_S})/[C_R]_{\text{общ}}$$

Известно, что $\delta_{C_S} = \delta_{C_R}$, $\delta_{C_S-S_S} = \delta_{C_R-S_R}$ и $\delta_{C_S-S_R} = \delta_{C_R-S_S}$, следовательно, для рацемического растворителя $[S_S]_{\text{общ}} = [S_R]_{\text{общ}}$, поскольку $q = q'$ и $r = r'$ и, таким образом, $\delta_{C_S}^{\text{набл.}} = \delta_{C_R}^{\text{набл.}}$. Если растворитель не рацемат, т.е. $[S_S]_{\text{общ}} \neq [S_R]_{\text{общ}}$, то $q \neq q'$ и $r \neq r'$ и, следовательно, $\delta_{C_S}^{\text{набл.}} \neq \delta_{C_R}^{\text{набл.}}$, что и означает расщепление резонансных сигналов. Таким образом, если $[S_S]_{\text{общ}}$ или $[S_R]_{\text{общ}}$ равно нулю (т.е. используется оптически чистый растворитель), расщепление сигналов максимально.

Однако следует иметь в виду, что необходимым условием расщепления сигналов является лишь наличие энантиоселективного взаимодействия энантиомеров с растворителем. Часто этот эффект оказывается слишком мал, чтобы быть обнаруженным экспериментально. Более того, различные ядра в образовавшихся диастереомерных сольватах испытывают совершенно разное влияние хирального растворителя, и обычно в целях энантиомерного анализа интерес представляют только ядра, ближайшие к хиральному центру (рис.3.2).

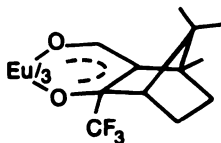


Рис. 3.3. Структура хирального сдвигающего реагента [трис(3-трифторметилокси-метил)-(+)-камфорато]-европия(III) ($\text{Eu}[(+)\text{-facam}]_3$), вызывающего расщепление сигнала и его сдвиг в слабое поле в спектрах ЯМР соединений, способных взаимодействовать с атомом металла.

Значительно более универсален метод ЯМР, базирующийся на использовании лантаноидных сдвигающих реагентов; он сочетает высокое разрешение, обусловленное псевдоконтактным сдвигом сигналов в слабое поле [9], с их расщеплением вследствие энантиоселективного взаимодействия с хиральным лантаноидным комплексом [10]. Принцип этого метода отражен на рис. 3.3. Обычно β -дикетоны (в форме енолов) образуют прочные комплексы с ионами металлов ряда лантаноидов, например с Eu^{3+} или Pr^{3+} . Эти парамагнитные комплексы могут объединяться или каким-то образом взаимодействовать с соединениями, имеющими электронодонорные группы, такими как амины, аминокислоты, спирты, кетоны и эфиры, вызывая значительный сдвиг сигналов в слабое поле для ядер, не слишком удаленных от центров взаимодействия. И поскольку хиральные β -дикетоны вполне доступны, то доступны и хиральные сдвигающие реагенты. На рис. 3.3 показан в качестве примера ком-

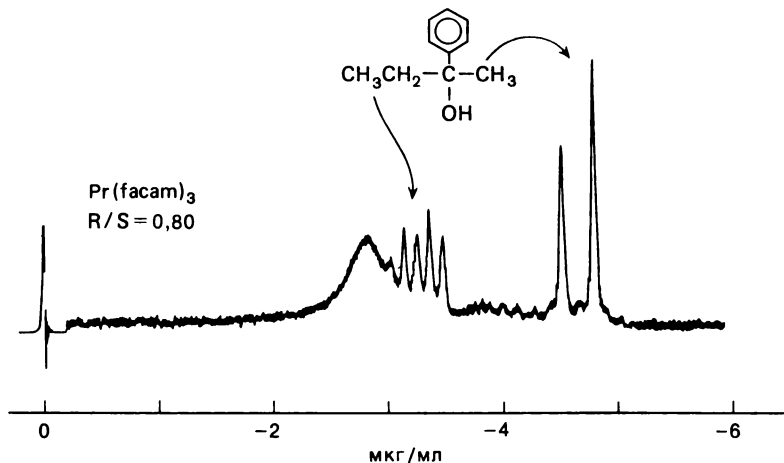


Рис. 3.4. Прямое определение соотношения концентрации энантиомеров не полностью разделенного 2-фенилбутанола-2 с помощью ЯМР в тетрахлориде углерода в присутствии 0,3 М $\text{Pr}[(+)\text{-facam}]_3$ [27] (с разрешения Am. Chem. Soc.).

плекс, синтезированный на основе (+)-камфоры. Реагенты обычно хорошо растворимы в типичных для ЯМР растворителях типа тетрахлорида углерода или дейтерохлороформа, и для наблюдаемого спектрального сдвига часто исследуют зависимость от концентрации добавленного сдвигающего реагента. При использовании хиральных сдвигающих реагентов можно значительно улучшить разрешение спектра и, следовательно, улучшить разделение резонансных линий, соответствующих двум энантиомерам. В результате энантиомерный состав может быть найден более точно. Применение метода иллюстрирует рис.3.4.

Данные, полученные при интегрировании спектров ЯМР, дают соотношение концентраций энантиомеров (r), и энантиомерную чистоту или энантиомерный избыток (e.e.) можно рассчитать по следующей формуле:

$$\text{e.e.} = [(1 - r)/(1 + r)] \times 100\% \quad (3.4)$$

3.1.1.3. ИЗОТОПНОЕ РАЗБАВЛЕНИЕ

Этот метод требует определения двух переменных, а именно удельного вращения и содержания изотопа. Первая из этих величин определяется поляризметрически, а вторая — или с помощью масс-спектрометра, или с помощью жидких сцинтилляционных счетчиков для β -излучающих радиоизотопов. Наиболее простой прием состоит в следующем: образец неизвестной оптической чистоты смешивают с изотопно меченным рацематом того же соединения. Предположим, что a — масса образца (энантиомерной чистоты P и удельного вращения $[\alpha]$, (R)-форма предполагается в избытке), а b — масса рацемического соединения с изотопным содержанием I_0 . Содержание изотопа в смеси $a+b$ дается следующей формулой:

$$I(R) = \frac{bI_0}{b + a(1 + P)} \text{ и } I(S) = \frac{bI_0}{b + a(1 - P)} \quad (3.5)$$

Так как изотопный состав не меняется в ходе последующих экспериментов, то уравнение (3.5) можно использовать для необходимых расчетов.

После кристаллизации смеси $a+b$ будет получен новый образец с оптической чистотой P' и удельным вращением $[\alpha']$. Определив изотопный состав этого образца I' , можно установить максимальное оптическое вращение соединения $[\alpha]_{\text{макс}}$ и, следовательно, оптическую чистоту исходного образца. Легко вывести, что

$$I' = I(R) \frac{(1 + P')}{2} + I(S) \frac{(1 - P')}{2} \quad (3.6)$$

Объединяя уравнения (3.5) и (3.6) и исключая $I(R)$ и $I(S)$, получим

$$I' = I_0 \frac{b^2 + ab - abPP'}{b^2 + 2ab + a^2(1 - P^2)} \quad (3.7)$$

Но $P = [\alpha]/[\alpha]_{\text{макс}}$ и $P' = [\alpha']/[\alpha]_{\text{макс}}$ [см. уравнение (2)]. После подстановки этих выражений в (3.7) и преобразования получаем следующее уравнение:

$$[\alpha]_{\text{макс}} = \left(\frac{I' a^2 [\alpha]^2 - I_0 ab [\alpha] [\alpha']}{I' (a + b)^2 - I_0 b (a + b)} \right)^{1/2} \quad (3.8)$$

Найденное значение $[\alpha]_{\text{макс}}$ подставляют в уравнение (3.2) и определяют оптическую чистоту образца.

3.1.1.4. КАЛОРИМЕТРИЯ

Детальное рассмотрение этого метода выходит за рамки данной книги, и ниже приведено только его схематическое описание. Наиболее важное понятие в данном методе — это так называемая дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Принцип калориметрии — это определение энергии, выделяемой или поглощаемой образцом, как функции температуры. Приборы для ДСК содержат две ячейки (для образца и сравнительную), к которым необходимо подводить различную по величине энергию, чтобы температура их была одинаковой. Это различие в энергии сканируется во времени при линейном градиенте температуры. Такое микрокалориметрическое устройство позволяет находить как температуру, так и энтальпию фазовых переходов (подобных плавлению). Если исследуются хиральные соединения, то записываются ДСКграммы для образца неизвестной оптической чистоты и для рацемата. Они содержат всю необходимую информацию (температуру плавления и энтальпию плавления рацемата, а также температуру окончания плавления образца T_f) для расчета энантиомерного состава по уравнению Пригожина — Дефея [11].

3.1.1.5. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ

Многие ферментативные реакции высокоселективны, и многие ферменты, особенно в реакциях с аминокислотами, различают энантиомеры с полной селективностью [12]. Следовательно, методы, основанные на ферментативных каталитических реакциях аминокислот, особенно полезны для точного определения высокой степени энантиомерной чистоты путем изучения реакции примесного

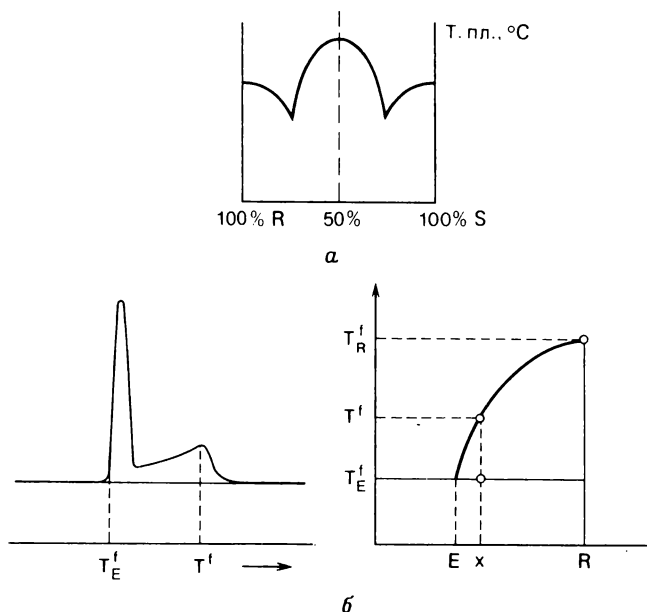


Рис. 3.5. Типичная диаграмма плавления рацемического соединения (а) и принцип определения энантимерного состава методом ДСК (б) [28] (с разрешения изд-ва).

энантиомера. В этом случае можно определить до 0,1% этого энантиомера в присутствии 99,9% его оптического антипода.

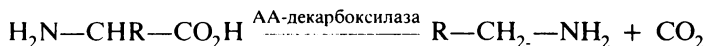
Наиболее предпочтительны два типа реакций:

1) окисление:



и

2) декарбоксилирование:



Для первой реакции коммерчески доступны оксидазы как L-, так и D-аминокислот. Во второй реакции имеющиеся ферменты катализируют декарбоксилирование только L-аминокислот, что позволяет определять оптическую чистоту только D-аминокислот.

3.1.2. МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА РАЗДЕЛЕНИИ ЭНАНТИОМЕРОВ

Из числа методов, входящих в эту группу, практически используются только основанные на хроматографическом разделении.

Подробно эти методы рассматриваются в следующей главе, а здесь обсуждаются только их теоретические аспекты.

Основные типы хроматографии подразделяются в соответствии с агрегатным состоянием подвижной фазы и образца. В газовой хроматографии (ГХ) образец должен быть достаточно летучим, чтобы перемещаться подвижной газовой фазой, что в общем случае требует повышенной температуры. По этой же причине полярные соединения подвергают хроматографическому разделению в виде производных, отличающихся повышенной летучестью. В жидкостной хроматографии (ЖХ) предварительного превращения исследуемых соединений в их производные, как правило, не требуется; оно проводится лишь в некоторых случаях с целью повышения чувствительности обнаружения.

Вплоть до недавнего времени в ГХ и ЖХ применялись практически только ахиральные фазы, т. е. их основу составляли оптически неактивные соединения. Следовательно, непосредственное разделение энантиомеров хроматографическими методами не представлялось возможным. Вследствие этого хроматографические разделения, ставившие своей целью определение энантиомерного состава, были ограничены разделением диастереомерных производных, полученных взаимодействием с оптически чистым реагентом (схема 3.1).

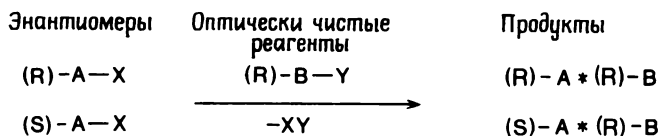


Схема 3.1. Принципиальная схема хиральной дериватизации энантиомеров с целью получения диастереомеров, которые можно разделить хроматографически на нехиральных неподвижных фазах.

Поскольку с момента создания ГХ были разработаны разнообразные методы дериватизации, то нет ничего удивительного в том, что многие из этих реакций, но с использованием оптически активных реагентов были применены и для хиральной дериватизации энантиомеров. Ряд подобных методов дериватизации получил распространение и в жидкостной хроматографии.

На результаты таких *непрямых* методов энантиомерного анализа влияет целый ряд факторов, которые будут рассмотрены в следующей главе.

Принципиально иной подход реализован в *прямых* хроматографических методах, где энантиомеры разделяются с помощью хи-

Таблица 3.1. Различные хроматографические методы определения оптической чистоты

Принцип	Метод	Способ осуществления
Хиральная дериватизация	Непрямой	На обычных (ахиральных) колонках в режимах ГХ и ЖХ
Без хиральной дериватизации (иногда с целью повышения селективности и(или) чувствительности используется обычная дериватизация)	Прямой	ГХ: на колонках с хиральной неподвижной фазой ЖХ: на колонках с хиральной неподвижной фазой или на ахиральных колонках с хиральной подвижной фазой

ральной хроматографии. В этом случае неподвижная фаза является оптически активным соединением, что обуславливает различие во времени удерживания энантиомеров. В условиях ГХ такое разделение является единственно возможным. Однако в условиях ЖХ энантиомеры можно разделить как этим методом, так и при помощи хиральных подвижных фаз или путем добавления хиральных модификаторов в подвижную фазу. Этот прием подробно рассмотрен в гл. 7. Различные хроматографические методы определения оптической чистоты суммированы в табл. 3.1.

3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНОЙ КОНФИГУРАЦИИ

Абсолютная конфигурация показывает нам истинное расположение в пространстве атомов или групп атомов. Под *относительной* конфигурацией мы подразумеваем следующее: молекулу А можно стереохимически связать с молекулой В, даже не зная их абсолютную конфигурацию. Вторая концепция проще, так как в этом случае необходимо лишь представлять себе стереохимию реакций, в результате которых осуществляется превращение А в В или наоборот. Такие конфигурационные соотношения в очень элегантной форме были получены для того, чтобы осуществить корреляцию между соединениями с неизвестной хиральностью и теми соединениями, абсолютная конфигурация которых уже известна. Пример подобной корреляции представлен на рис. 3.6. Здесь показано, как (+)-фенилалленкарбоновые кислоты путем окисления перманганатом через промежуточное образование бромлактона превращаются в (+)-алкилминдальные кислоты. Поскольку абсолютная конфигурация последней известна, так же как и стереохимия реакций, полу-

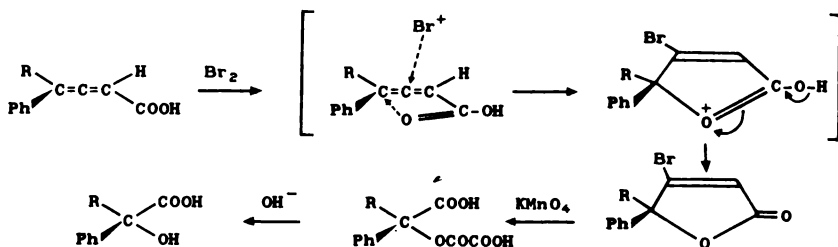


Рис. 3.6. Конфигурационные соотношения между фенилалленкарбоновыми кислотами и замещенными в положении 2 миндальными кислотами [29] (с разрешения изд-ва).

ченная корреляция позволяет нам определить абсолютную конфигурацию (+)-аллена.

Как уже упоминалось выше (см. разд. 2.2), проблему определения абсолютной конфигурации, т. е. вопрос о том, как можно получить информацию о пространственной ориентации атомов в молекуле оптически активного соединения, не удавалось решить в течение долгого времени. Ее решение явилось результатом наблюдения специальных эффектов при рассеянии рентгеновских лучей.

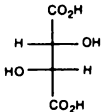
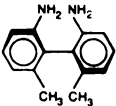
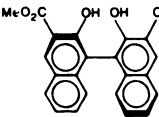
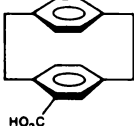
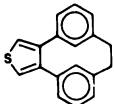
3.2.1. РЕНТГЕНОВСКАЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЯ АНОМАЛЬНОГО РАССЕЯНИЯ

Этот метод, который был введен в практику Бийо в 1949 г., основан на интерпретации аномального рассеяния (дисперсии), вызываемого присутствующим в кристаллической решетке тяжелым атомом.

Хотя этот эффект известен уже давно и еще в 1928 г. был использован для определения абсолютной полярности сульфида цинка [13], он считался принципиально неприемлемым для определения абсолютной конфигурации хиральных молекул. Бийо показал, что его можно применять и для установления абсолютной полярности кристаллической структуры, содержащей хиральные молекулы [14]. В первом опубликованном сообщении было описано определение структуры кристалла рубидиевой соли (+)-винной кислоты [15]. Поскольку каких-либо простых методов, которые позволили бы установить стереохимическое родство между соединениями с различным типом хиральности, не существует, применение метода Бийо к соединениям с аксиальной и планарной хиральностью явилось особенно важным.

С появлением современных компьютеризованных дифрактометров метод Бийо был в значительной степени усовершенствован, и теперь нет необходимости вводить в кристаллическую решетку тя-

Таблица 3.2. Абсолютная конфигурация ключевых соединений, принадлежащих к различным типам хиральности, найденная методом аномального рассеяния рентгеновских лучей

Соединение	Тип хиральности	Найденная структура	Абсолютная конфигурация	Литература
(+)-Винная кислота (в виде соли Rb)	Центральная		D- = (R, R)	15
(+)-2,2'-Диамино-6,6'- диметилдифенил (в виде комплекса с Co(салицил- альдегидом) ₂)	Аксиальная		R- (M-)	17
(+)-2,2'-Диокси-3,3'-ди- этоксикарбонилдинафтил (в виде комплекса с бром- бензолом)	Аксиальная		R- (M-)	18
(-)-[2,2]-Парациклофан-4- карбоновая кислота	Планарная		R-	19
(+)-[2](1,3)Бензо[0](3,4)- тиофенол[0](1,3)бензе- нофан	Планарная		M-	20

желый атом, который служил бы источником аномального рассеяния. Современный уровень измерения интенсивности рассеянного света позволяет использовать с этой целью легкие атомы, например кислород. Соответственно абсолютная конфигурация (+)-винной кислоты была перепроверена на самой винной кислоте [16].

Некоторые ключевые соединения, абсолютная конфигурация которых установлена методом Бийо, представлены в табл. 3.2.

3.2.2. СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ (ДОВ,ЦД) И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА КОРРЕЛЯЦИЯХ

Эти методы, как и химические корреляции, не являются прямыми и требуют сравнения с образцом с известной абсолютной конфигурацией, поэтому их следовало бы называть корреляционными.

Если оптическая активность хирального соединения измеряется и записывается как функция длины волны, то в итоге получается кривая дисперсии оптического вращения (ДОВ). Если в структуре соединения отсутствуют хромофорные группы, оптическое вращение непрерывно уменьшается с увеличением длины волны, и получается так называемая плавная кривая ДОВ. Однако если в исследуемой области спектра у соединения окажутся полосы поглощения, то они вызовут появление эффекта Коттона [21], т. е. на кривой будет наблюдаться один или больше пиков и впадин (экстремумов). *Знак и величина* эффекта Коттона, молекулярная амплитуда a , определяются согласно уравнению (3.9), в котором $[\Phi]_1$ и $[\Phi]_2$ — молекулярное вращение в более длинноволновой (индекс 1) и в более коротковолновой (индекс 2) областях спектра соответственно. Молекулярное вращение в свою очередь определяется уравнением (3.10), где M — молекулярная масса соединения.

$$a = ([\Phi]_1 - [\Phi]_2)/100 \quad (3.9)$$

$$\Phi = [\alpha]M/100 \quad (3.10)$$

Сходным методом, но с использованием кругового дихроизма (т. е. различия в поглощении лево- и правополяризованных компонент циркулярно поляризованного света хиральным соединением) дифференциальное дихроичное поглощение ($\Delta\epsilon = \epsilon_S - \epsilon_R$) и молекулярную эллиптичность можно измерить как функции длины волны. Эффект Коттона часто лучше оценивать из кривых кругового дихроизма.

На рис. 3.7 приведены кривые дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма, их связь с УФ-спектрами и показано, как определяют знак и величину эффекта Коттона. Рассматриваемое соединение содержит две хромофорные группы с максимумами поглощения при 217 и 293 нм соответственно. Если мы будем обсуждать только последнюю полосу поглощения, то, как следует из рисунка, она показывает положительный эффект Коттона ($a = +214$) и λ_0 (290 нм) хорошо соответствуют максимумам поглощения в спектре кругового дихроизма и в УФ-спектре поглощения. Если бы изучался антипод этого соединения, то кривые кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения были бы полностью обращены по знаку относительно оси x .

Принято различать хромофоры, которые внутренне хиральны или внутренне дисимметричны, и хромофоры, которые внутренне симметричны, но асимметрично возмущены, т. е. такие хромофоры, в которых переходы становятся оптически активными под влиянием асимметричного окружения. Теоретически и эксперименталь-

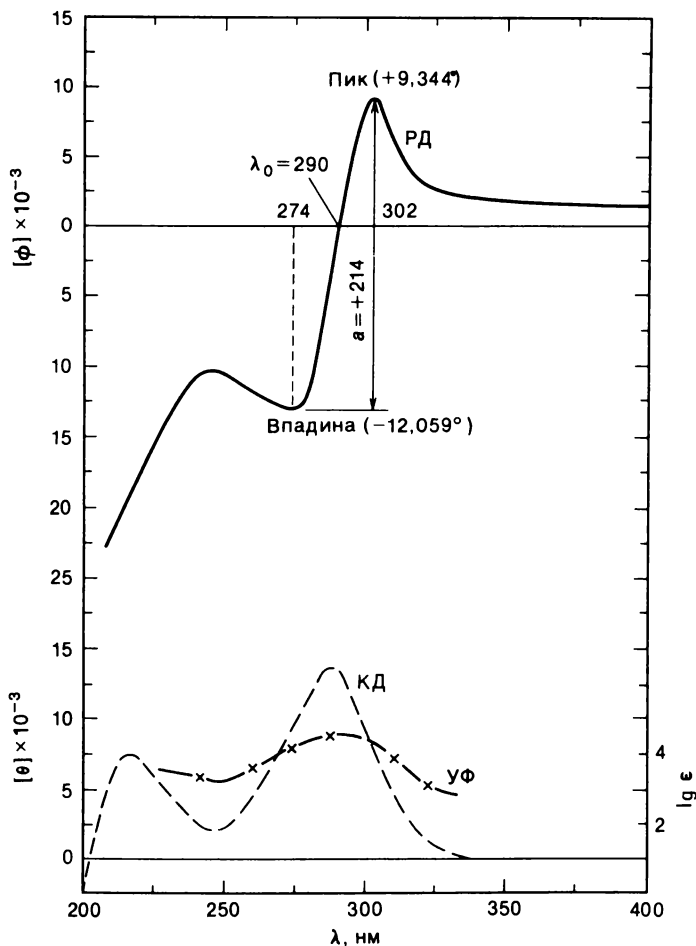


Рис. 3.7. Соотношение между РД-, КД- и УФ-спектрами оптически активного соединения [30] (с разрешения изд-ва).

но изучено большое число представителей обоих классов. В результате рассмотрения молекулярной геометрии окружения хромофора, являющегося источником эффекта Коттона, были выведены определенные правила для предсказания положительного или отрицательного вклада в эффект Коттона различных групп, связанных с хромофором. Более подробное обсуждение этого вопроса выходит за рамки данной книги, а тем читателям, которых интересует этот вопрос, следует обратиться к работам Джерасси [22], Краббе [23] и ряда других авторов [24, 25]. Однако важно отметить, что, если

оптическое вращение, измеряемое обычно в длинноволновой области [589 нм (D-линия Na) или 546 нм (линия Hg)], дает слишком мало информации для определения абсолютной конфигурации, знак эффекта Коттона можно использовать либо для корреляции соединения с неизвестной стереохимией со структурно родственным соединением с известной абсолютной конфигурацией, либо в некоторых случаях для прямого определения абсолютной конфигурации при помощи правил (октантных, квадрантных, секторных), выведенных для данного хромофора.

Привлечение хроматографических методов для установления стереохимических корреляций началось лишь недавно, но представляется весьма многообещающим. Так как вопрос детально рассмотрен в следующих главах, то ниже изложены лишь принципиальные основы метода.

Для небольшого числа случаев предпочтительную адсорбцию одного из двух энантиомеров на хиральной неподвижной хроматографической фазе можно удовлетворительно объяснить на молекулярном уровне и сформулировать более или менее общий механизм хирального распознавания. Таким образом для серии структурно родственных соединений можно установить корреляции между порядком элюирования энантиомеров и их абсолютной конфигурацией. Если различия в удерживании достаточно заметны, то этот метод может дать вполне надежные результаты при наличии очень небольшого количества вещества. Похожий на корреляционные методы прием, основанный на кинетическом разделении энантиомеров, предложен Хорео [26]. В его основе лежит энергетическое различие диастереомерных состояний, которое достаточно хорошо известно. Можно ожидать, что привлечение молекулярного моделирования и расчетных методик сделает эти методы в будущем более распространенными.

Рекомендуемая литература

Crabbe P., Recent Application of Optical Rotatory Dispersion and Optical Circular Dichroism in Organic Chemistry, *Top. Stereochem.*, 1, 93 (1967).

Crabbe P., Parker A. C. Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism, in *Techniques of Chemistry*, Vol. 1, Physical Methods of Chemistry, A. Weissberger and B. W. Rossiter (eds.), Part IIIC, Wiley-Interscience, New York, 1972, p. 183.

Izumi Y., Tai A. Stereodifferentiating Reactions, Kodansha, Tokyo, Academic Press, New York, 1977.

Kagan H. W. (ed.) Stereochemistry, Fundamentals and Methods, Vol. 1—3, Thieme Verlag, Stuttgart, 1977.

Klyne W., Buckingham J. Atlas of Stereochemistry, 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford, 1978.

Pirkle W. H., Hoover D. J. NMR Chiral Solvent Agents, *Top. Stereochem.*, **13**, 263 (1982).
Morrison J. D. (ed.) *Asymmetric Synthesis*, Vol. 1, Analytical Methods, Academic Press, New York, 1983.

Цитируемая литература

1. Biot J. B. *Mem. Acad. Sci. Inst. Fr.*, **15**, 93 (1983).
2. Consiglio G., Pino P., Flowers L. I., Pittman C. U., Jr. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1983**, 612.
3. Raban M., Mislow K. *Top. Stereochem.*, **2**, 216 (1967).
4. Pirkle W. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 1837 (1966).
5. Burlingame T. G., Pirkle W. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 4294 (1966).
6. Pirkle W. H., Beare S. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5485 (1967).
7. Pirkle W. H., Beare S. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6250 (1968).
8. Pirkle W. H., Beare S. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5150 (1961).
9. Hinckley C. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5160 (1969).
10. Whitesides G. M., Lewis D. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6979 (1970).
11. Prigogine I., Defay R. *Chemical Thermodynamics*, 4th Ed.; Longmans, London 1967.
12. Greenstein J. P., Winitz M. *The Chemistry of Amino Acids*, Vol. 2, Wiley, New York, 1961, p. 1738.
13. Nishikawa S., Matsukawa R. *Prog. Imp. Acad. Japan*, **4**, 96 (1928).
14. Bijvoet J. M. *Proc. Koninkl. Ned. Wetenschap.*, **B52**, 313 (1949).
15. Bijvoet J. M., Peerdeman A. F., van Bommel A. J. *Nature*, **168**, 271 (1951).
16. Hope H., de la Camp U. *Acta Crystallog.*, **A28**, 201 (1972).
17. Pignolet L. H., Taylor R. P., Horrocks W. DeW. Jr., *Chem. Commun.* 1968, 1443.
18. Akimoto H., Shiori T., Iitaka Y., Yamada S. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 3967.
19. Tribout J., Martin R. H., Doyle M., Wynberg H. *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 2839 (footnote).
20. Vogtle F., Palmer M., Fritz E., Lehmann U., Meurer K., Mannschreck A., Kastner F., Irngartner H., Huber-Patz U., Puff H., Friedrichs E. *Chem. Ber.*, **116**, 3112 (1983).
21. Cotton A. M. *Ann. Chim. Phys.*, **8**, 347 (1896).
22. Джерасси К. Дисперсия оптического вращения, применение в органической химии. — М.: Мир, 1962.
23. Grabbe P. *Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry*, Holden-Day, San Francisco, 1965.
24. Velluz L., Legrand M., Grosjean M. *Optical Circular Dichroism: Principles, Measurements and Applications*, Verlag Chemie, Weinheim, 1965.
25. Sneath G. (ed.) *Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry*, Heyden, London, 1967.
26. Horeau A. *Tetrahedron*, **31**, 1307 (1975).

4. СОВРЕМЕННЫЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

4.1. ОБЗОР ОСНОВ ТЕОРИИ ХРОМАТОГРАФИИ

Прежде чем перейти к обсуждению хиральной хроматографии, целесообразно обсудить некоторые основные понятия хроматографии вообще. Годом рождения хроматографии считается 1900 г., именно тогда русский химик Михаил Цвет обнаружил, что растительный экстракт, пропущенный через стеклянную колонку, заполненную карбонатом кальция, образует окрашенные зоны. Вплоть до 1930 г. важность этого открытия, сделанного при изучении химии каротиноидов, не была должным образом оценена [1]. Однако после 1930 г. началось быстрое развитие хроматографии, и сегодня это наиболее мощный и универсальный метод разделения в химии.

Основной принцип хроматографии — распределение соединений между двумя фазами, одна из которых (подвижная фаза) перемещается относительно другой (неподвижная фаза). Различные виды хроматографии подразделяются в зависимости от природы этих двух фаз (рис. 4.1).

Важнейшей частью хроматографической системы является хроматографическая колонка, заполненная неподвижной фазой, через которую протекает подвижная фаза и в которой происходит разделение смеси на индивидуальные компоненты. Пробу вводят в колонку при помощи специального устройства ввода, а разделенные

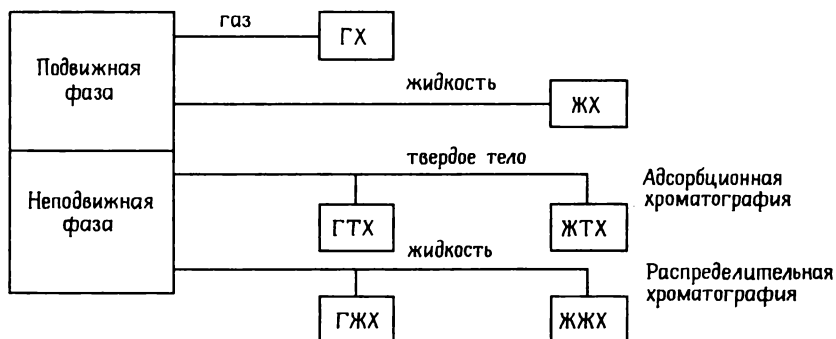


Рис. 4.1. Классификация различных видов хроматографии.

компоненты обнаруживают при помощи подходящего детектирующего устройства.

В идеале профиль хроматографической зоны, регистрируемый детектором, должен иметь гауссову форму, что соответствует полностью симметричному пику. Теоретически это отвечает полностью линейной изотерме адсорбции, т. е. такой ситуации, когда отношение фазового распределения не зависит от концентрации. На практике это наблюдается довольно редко ввиду целого ряда причин, которые здесь обсуждаться не будут.

В процессе перемещения вдоль колонки хроматографическая зона уширяется вследствие дисперсионных процессов. Детальный расчет этого явления выходит за рамки данной книги; читатели, желающие более глубоко ознакомиться с этим разделом хроматографии, могут обратиться к специальным работам, приведенным в конце этой главы. Однако фундаментальные уравнения хроматографии, которые позволяют понять сравнительные преимущества различных типов энантиомерных разделений, следует рассмотреть.

Хроматографическая колонка может быть охарактеризована эффективностью, которая является мерой ее способности к транспортировке соединения с малым уширением пика. Эффективность можно выразить в виде высоты, эквивалентной теоретической тарелке (N). N легко определить из хроматограммы (рис. 4.2) при помощи следующего уравнения:

$$N = 16(t_R/w)^2, \quad H = L/N \quad (4.1)$$

где t — время удерживания, w — ширина пика в основании и L — длина колонки.

Эффективность колонки соответственно обратно пропорциональна величине N . Современные полые капиллярные колонки для ГХ и насадочные колонки для аналитической ЖХ характеризуются очень малыми значениями N (типичные значения $\sim 0,025$ мм). Капиллярные колонки в ГХ имеют обычно такую длину ($L = 20\text{—}200$ м), что число тарелок, приходящееся на колонку, может быть чрезвычайно большим ($N = 2 \cdot 10^5$ и более достаточ-

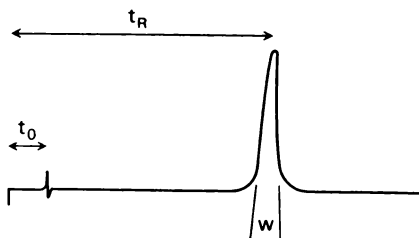


Рис. 4.2. Время удерживания и ширина пика, используемые для определения эффективности колонки и высоты, эквивалентной теоретической тарелке.

но обычные величины). Такие колонки способны также воспринять большое число хроматографических пиков, т. е. они обладают большой пиковой емкостью. Столь большое число тарелок трудно получить для насадочных колонок в ЖХ, поскольку их длина обычно меньше 0,3 м; из-за малого размера частиц (диаметр 3—10 мкм), используемых для упаковки колонок, для них характерны высокие значения противодавления, в связи с чем длина колонок ограничена. Это осложнение удалось, однако, преодолеть путем внедрения в ЖХ длинных полых капиллярных колонок [2], но у них также есть недостаток — очень низкая скорость перемещения подвижной фазы (часто < 1 мл/мин) и соответственно очень большое время анализа, обычно достигающее нескольких часов.

Удерживание вещества в колонке можно выразить или временем его удерживания (t_R), или его удерживаемым объемом ($V_R = t_R F$, где F — скорость движения подвижной фазы), или через коэффициент емкости (k'), который непосредственно связан с константой распределения в системе неподвижная—подвижная фаза. Коэффициент емкости определяется следующим выражением:

$$k' = A_s / A_m \quad (4.2)$$

где A_s и A_m — количество вещества в неподвижной и подвижной фазах соответственно. Пусть V_s и V_m — объемы соответствующих фаз (в адсорбционной хроматографии V_s часто аппроксимируется площадью поверхности), тогда

$$k' = C_s V_s / C_m V_m = K V_s / V_m \quad (4.3)$$

V_m обычно записывают как V_0 — мертвый (или свободный) объем колонки, который не дает вклада в разделение. Соответственно чистый объем V_n можно записать как $V_n = V_R - V_0$. Поскольку $K = V_n / V_s$, то объединяя это выражение с уравнением (4.3), получим

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (4.4)$$

Это выражение позволяет найти коэффициент емкости непосредственно из хроматограммы.

Теперь рассмотрим хроматографическое разделение двухкомпонентной смеси (1 и 2). Как следует из хроматограммы, показанной на рис. 4.3, $k'_2/k'_1 = K_2/K_1 = \alpha$, где α — коэффициент разделения. Более того, поскольку $\Delta G = -RT \ln K$, то можно получить выражение $\Delta \Delta G = RT \ln \alpha$.

Следовательно, коэффициент разделения, который находят непосредственно из хроматограммы, оказывается эквивалентным величине энергии, которую можно выразить в кДж/моль. К этому вопросу мы еще вернемся позднее.

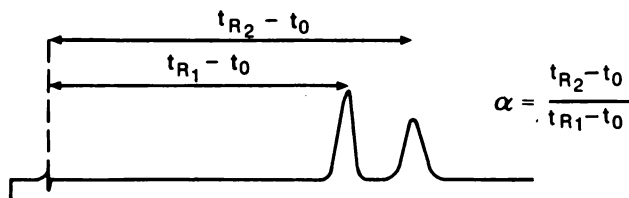


Рис. 4.3. Селективность (которая непосредственно связана с различием во взаимодействии пары соединений с неподвижной фазой) и ее определение из хроматограммы.

личине энергии, которую можно выразить в кДж/моль. К этому вопросу мы еще вернемся позднее.

Исходя из уравнения (4.4) α можно представить как

$$\alpha = (V_{R1} - V_0) / (V_{R2} - V_0) \quad (4.5)$$

Таким образом, коэффициент разделения является просто отношением исправленных удерживаемых объемов двух компонентов. Если мертвый объем колонки V_0 известен, то коэффициент разделения легко определяется из уравнения (4.5).

Важно помнить, что коэффициент разделения α является мерой относительного разделения пиков и при заданных условиях разделения (неподвижная и подвижная фазы, температура и т. д.) остается постоянным. Он не зависит от параметров, не влияющих на константу равновесия системы, таких как скорость потока, размер колонки, размер частиц и т. д. Однако эти параметры оказывают решающее влияние на эффективность колонки N [см. уравнение (4.1)].

Разрешение двух пиков (R_s) зависит, таким образом, как от α , так и от N и может быть найдено из хроматограммы (рис. 4.4) при

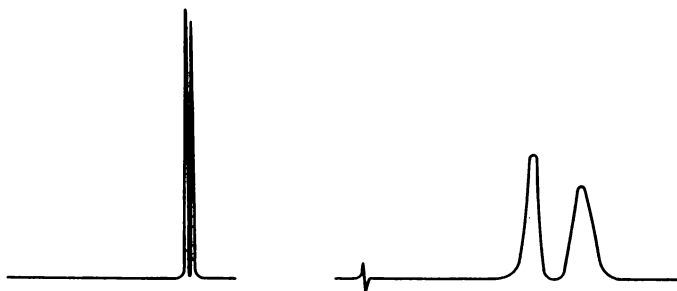


Рис. 4.4. Разрешение является функцией как эффективности колонки, так и селективности данной неподвижной фазы, что иллюстрируется двумя приведенными хроматограммами с одним и тем же разрешением. Слева: высокая эффективность колонки в сочетании с малой селективностью; справа: низкая эффективность колонки в сочетании с высокой селективностью.

помощи следующего выражения:

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1})/(w_1 + w_2) = 2\Delta t_R/(w_1 + w_2) \quad (4.6)$$

Как видно из этого выражения, R_s определяется как коэффициент разделения, деленный на среднюю ширину пиков в основании. Поскольку ширина гауссова пика в основании равна 4σ (где σ — стандартное отклонение пика), то отсюда следует, что при Δt_R , равном 4σ , R_s равно 1, что соответствует всего 2%-ному перекрытию пиков. При «разделении 6σ », т. е. при $R_s = 1,5$, наблюдается полное разделение пиков, тогда как при $R_s < 0,8$ разделение уже неудовлетворительное.

Уравнение (4.6) можно преобразовать к виду

$$R_s = \frac{\alpha - 1}{4\alpha} \frac{k'_2}{1 + k'_2} \sqrt{N} \quad (4.7)$$

где R_s представлено как функция определенных ранее параметров. Следует заметить, что если α близок к 1, то небольшие изменения α вызывают значительные изменения R_s . Так, например, изменение α от 1,1 до 1,2 приводит к удвоению величины R_s вследствие влияния коэффициента $(\alpha - 1)/\alpha$. Уравнение (4.7) часто записывают в более простом виде путем введения понятия числа эффективных теоретических тарелок $N_{\text{эфф}}$. Согласно определению, $N_{\text{эфф}} = 16[(t_R - t_0)/w]^2$ (ср. уравнение (4.1)), уравнение (4.7) можно записать в более простой форме:

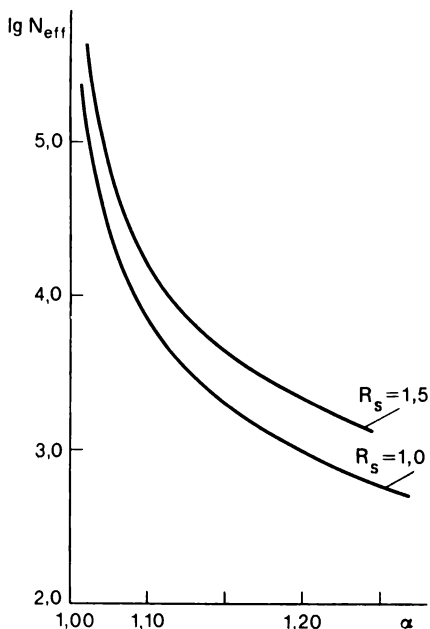
$$R_s = \frac{\alpha - 1}{4\alpha} \sqrt{N_{\text{эфф}}} \quad (4.8)$$

где коэффициент $k'_2/(1 + k'_2)$ входит в $N_{\text{эфф}}$: $N_{\text{эфф}} = N[k'/(1 + k')]^2$. Исходя из графического представления уравнения (4.8) при заданном значении R_s эффективное число тарелок, необходимое для получения данного разрешения пиков, можно представить в виде функции α . Подобная зависимость показана на рис. 4.5. Как следует из этого рисунка, чтобы получить разрешение 6σ ($R_s = 1,5$), при $\alpha = 1,05$ требуется 15 700 эффективных теоретических тарелок, тогда как при $\alpha = 1,15$ необходимое число тарелок составляет всего 2110.

4.2. ПРИБОРЫ

Аппаратурное оснащение систем для проведения хроматографического анализа методом ГХ или ЖХ является довольно простым.

Рис. 4.5. Зависимость числа теоретических тарелок от величины селективности α при постоянном значении разрешения. Обратите внимание на резкое возрастание числа тарелок, необходимых для поддержания разрешения при очень малых величинах α .



В них входят система подачи подвижной фазы в колонку, устройство ввода пробы, разделительная колонка и система обнаружения разделенных компонентов. В ГХ важным является также наличие термостата, в котором размещается колонка, и отдельных термостатируемых пространств для системы ввода и детектора. Чрезвычайно быстрое совершенствование приборов для ГХ и ЖХ привело к тому, что в настоящее время сформировалась самостоятельная область приборостроения, задачей которой является разработка приборов для хроматографии. Целью данной главы отнюдь не является подробное рассмотрение современного уровня оснащённости хроматографии, мы лишь хотели бы привлечь внимание читателя на те аспекты этой проблемы, которые важны при разделении энантиомеров. Для более детального ознакомления с хроматографическими приборами читателю следует обратиться к обстоятельной работе Поля и Шутте (см. список литературы к данной главе).

4.2.1. ПРИБОРЫ ДЛЯ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Принципиальная схема газохроматографической системы представлена на рис. 4.6. Подвижная фаза, или газ-носитель, должна оставаться инертной в процессе хроматографического разделения, и

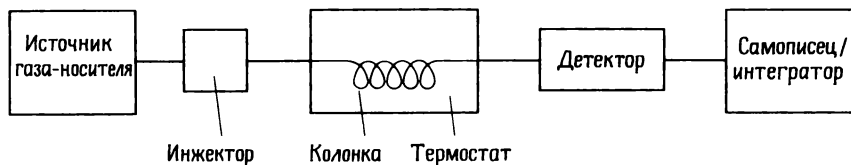


Рис. 4.6. Основные узлы газового хроматографа.

ее выбор в основном определяется типом используемого детектора. Предпочтительны азот, водород, гелий или аргон. Среди названных газов водород обладает наименьшей вязкостью, что особенно важно в том случае, если разделение предполагается проводить на длинных капиллярных колонках, где требуются относительно высокие скорости подвижной фазы. С такой ситуацией приходится иметь дело на практике, если, например, термостойкость неподвижной фазы ограничена, но при низкой температуре время удерживания слишком велико. Кривая Ван-Деемтера, связывающая высоту, эквивалентную теоретической тарелке, для данной колонки с линейной скоростью подвижной фазы, по которой можно оптимизировать эффективность колонки, выглядит совершенно различным образом для азота и водорода. Как показывает рис. 4.7, кривая, полученная для водорода, имеет существенно более пологий минимум, что соответствует значительно более высокой эффективности колонки при высоких скоростях потока.

Газ-носитель попадает в колонку через инжектор и выходит через детектор. В настоящее время разработано очень много различных способов ввода пробы в колонку, особенно в капиллярную. Обычно в блоке ввода пробы температура поддерживается примерно на 50°C выше, чем в колонке, чтобы испарение сорбата проис-

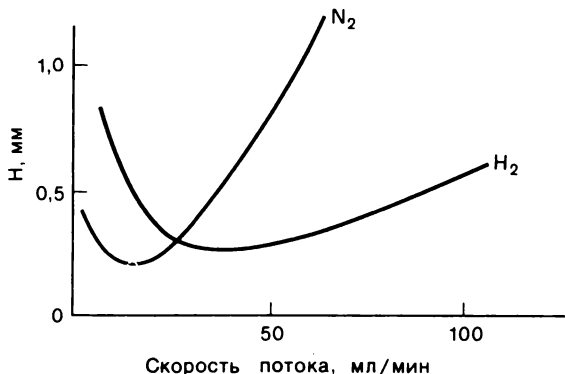


Рис. 4.7. Различие в диффузионных свойствах двух газов-носителей, как оно отражается на зависимости Ван-Деемтера.

ходило заведомо быстро и чтобы он сразу же перемещался в колонку. В инжектор пробы обычно вводятся в виде растворов с помощью микрошприца через прокладку.

Если ввод пробы в насадочную колонку не вызывает каких-либо трудностей, то с капиллярными колонками дело обстоит иначе, поскольку в этом случае приходится иметь дело с намного меньшим количеством вещества. Ввести малое точно определенное количество пробы в капиллярную колонку можно путем расщепления потока, т. е. направляя в колонку лишь определенную часть пробы. Это один из способов ввода пробы в капиллярную колонку. Количество пробы, поступающей в этом случае в колонку, определяется отношением расщепления, которое обычно находится в пределах $1/20$ — $1/200$. Поскольку расщепление потока вызывает определенную дискриминацию в отношении высококипящих компонентов, то этот метод не вполне пригоден для количественного анализа. В то же время следует помнить, что для определения энантиомерного состава с применением *хиральных* неподвижных фаз пригоден любой способ введения пробы. По совершенно очевидным причинам отношение площадей пиков энантиомеров не зависит от экспериментальных условий.

Другой метод ввода пробы в капиллярные колонки не требует расщепления потока и особенно полезен при хроматографировании очень разбавленных проб, поскольку в этом случае образец концентрируется на входе в колонку и затем непосредственно вводится в нее. В этом методе проба с помощью специального шприца вводится в колонку без предварительного нагревания или смешения с газом-носителем.

Как уже говорилось выше (разд. 4.1), капиллярные колонки заметно превосходят насадочные по эффективности (и по ВЭТТ). Чтобы перейти к обсуждению основных методов модификации колонок в ГХ, рассмотрим сначала рис. 4.8, на котором показано поперечное сечение колонок различных типов. Насадочные колонки

Насадочная колонка

Плая капиллярная колонка



(стекло или сталь)



(обычное или кварцевое стекло)

Внутр. диам. > 2 мм

Внутр. диам. $< 0,5$ мм

SCOT

WCOT

НФ на

НФ на

подложке

стенках

Рис. 4.8. Различные типы колонок, используемых в газовой хроматографии.

всегда содержат жидкую неподвижную фазу, нанесенную на инертную подложку, которой обычно служит диатомитовая земля. Такие колонки полностью заполнены. В то же время в центре так называемых полых колонок остается незаполненное пространство. В таких колонках неподвижную фазу можно наносить на специальную подложку (SCOT-колонки) или же непосредственно на стенки капилляра (WCOT-колонки). Большинство современных капиллярных колонок принадлежит ко второму типу.

Сами колонки обычно изготавливают из стекла, металла или кварцевого стекла, причем последнее применяется с 1979 г. Природа внутренней поверхности стенок колонки оказывает решающее влияние на прочность удерживания нанесенной неподвижной фазы. Внутреннюю поверхность капилляра можно покрыть жидкой неподвижной фазой путем выпаривания, что дает пленки желаемой толщины, а это в свою очередь определяет емкость колонки и ее способность к удерживанию сорбата. Обычно толщина пленки составляет 0,1—0,3 мкм. Для колонок из кварцевого стекла необходима особая техника иммобилизации неподвижной фазы, в противном случае ее вымывание из колонки может стать препятствием для работы при повышенных температурах. С этой целью проводят сшивание нанесенной полимерной неподвижной фазы, используя для этого различные приемы. Хотя механизм этих реакций до конца не известен, весьма вероятно, что в некоторой степени имеет место образование ковалентной связи с поверхностью стенки. Главный результат этой процедуры — получение колонок с очень малым вымыванием неподвижной фазы при повышенных температурах и высокой устойчивостью к растворителям. Более того, такая техника иммобилизации позволяет заметно увеличить толщину пленки.

Поскольку разрешение имеет первостепенное значение при разделении энантиомеров посредством ГХ, наибольший интерес представляют колонки WCOT. Методики нанесения неподвижной фазы и ее термостойкость, также имеющие важное значение, будут рассмотрены в последующих главах.

Для наблюдения за разделенными компонентами, выходящими из газохроматографической колонки, разработан ряд детекторов. Наибольшее распространение получили детекторы ионизационного типа, принцип действия которых состоит в измерении изменения в электропроводности, вызванного изменением ионного тока в детекторе. Наиболее широко применяются детекторы с пламенной ионизацией (ПИД). Они отвечают всем требованиям, предъявляемым к хорошим детекторам в ГХ, т. е. отличаются высокой чувствитель-

ностью, очень хорошей стабильностью, быстрым откликом (1 мс), малым мертвым объемом (1 мкл) и большим диапазоном линейности. Поступающие в детектор этого типа компоненты элюата сжигаются в водородном пламени, при этом образуются положительные ионы, повышающие проводимость электрического контура.

Еще большие чувствительность и селективность имеет детектор электронного захвата (ДЭЗ), принадлежащей к тому же классу ионизационных детекторов. Как следует из самого названия этого детектора, он работает по принципу поглощения электронов анализируемым соединением, что выдвигает определенные требования к структуре этих соединений. В ДЭЗ молекулы газа-носителя ионизируются под действием β -излучения. Ионизация порождает тепловые электроны, которые вызывают стабильный фоновый ток, если к ячейке ДЭЗ приложена разность потенциалов. Если элюируемые из колонки соединения способны захватывать электроны, величина фонового тока понижается и на самописце появляется соответствующий сигнал. ДЭЗ, которые первоначально были использованы для высокочувствительного обнаружения галогенированных углеводородов, прекрасно зарекомендовали себя и при обнаружении производных аминов, amino- и оксикислот и других подобных соединений. Галогенированные ацилирующие агенты, преимущественно перфторированные, служат для введения электронозахватных групп в amino- и оксикислоты путем образования летучих амидов и эфиров. Чувствительность ДЭЗ зависит главным образом от структуры анализируемого соединения. Основное требование — это способность соединения принимать отрицательный заряд вследствие электронного захвата. Соответственно при помощи этого детектора можно обнаруживать галогенированные и нитроароматические соединения, многоядерные ароматические углеводороды и сопряженные карбонильные соединения.

4.2.2. ПРИБОРЫ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Поскольку в ЖХ подвижная фаза жидкая, система подачи жидкости составляет важную часть прибора для ЖХ. Высокоэффективные колонки обычно создают заметное противодавление, поэтому для пропускания жидкости через колонку при контролируемой скорости потока необходимы насосы высокого давления. Типичная схема прибора для ЖХ показана на рис. 4.9. Образец вводят в виде раствора шприцем через устройство ввода — обычно дозирующую петлю. Аналитическое разделение проводят на колонках внутренним диаметром 4—5 мм и длиной 15—25 см. Для заполнения коло-

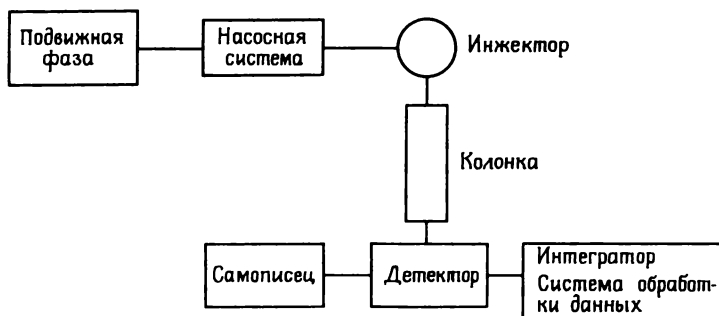


Рис. 4.9. Основные узлы жидкостного хроматографа.

нок используется большое число различных материалов, но наибольшее распространение на сегодняшний день получили сорбенты на основе силикагеля. Если исключить методы ЖХ, основанные на ситовом эффекте, то разделения, выполняемые этим методом, осуществляются главным образом на неподвижных фазах, связанных с носителем (силикагель) ковалентными связями. Химия связывания лигандов с поверхностью силикагелевых частиц развивалась довольно быстро, и в настоящее время имеется большое число связанных фаз, предназначенных для ионообменной, обращенно-фазовой и аффинной хроматографии. К синтезу ковалентно-связанных фаз мы еще вернемся в связи с получением хиральных фаз для ЖХ. В табл. 4.1 приведены некоторые наиболее общие типы сорбентов на основе силикагеля.

ЖХ традиционно подразделяют на нормально-фазовую и обращенно-фазовую. В хроматографии первого типа разделение прово-

Таблица 4.1. Различные типы модифицированного силикагеля, используемые как сорбенты в жидкостной хроматографии

Привитая (адсорбированная) группа	Тип хроматографии
Алкил	Обращенно-фазовая
Фенил	
Нитрил	Нормально-фазовая или обращенно-фазовая
Эфирная	
Нитро	
Диольная	Нормально- или обращенно-фазовая, анионообменная
Амино	
Диметиламино	
Четвертичная аммониевая	Анионообменная
Сульфо	Катионообменная

дят при помощи органической подвижной фазы, полярность которой ниже, чем у неподвижной фазы (разд. 4.1). С точки зрения взаимодействия сорбат—неподвижная фаза нормально-фазовую ЖХ можно охарактеризовать скорее как жидко-твердофазную, т. е. адсорбционную, или как жидко-жидкостную, т. е. распределительную, в зависимости от того, является ли неподвижной фазой твердая поверхность или адсорбированная вода (или какая-то другая полярная жидкость). Часто такое отнесение провести довольно трудно, и пограничные ситуации являются достаточно обычными.

Типичные сорбенты для нормально-фазовой ЖХ — немодифицированный силикагель и оксид алюминия. Участие полярных центров адсорбции, имеющих на поверхности этих носителей, в процессе удерживания подтверждается часто наблюдаемыми большими коэффициентами разделения геометрических изомеров.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза, по определению, менее полярна, чем подвижная, роль которой обычно выполняют водные растворы. Это имеет то преимущество, что целый ряд параметров подвижной фазы можно варьировать с целью изменения величины удерживания. Так, у водной подвижной фазы можно менять pH, тип буферного раствора и его силу, вводить добавки солей и органические модификаторы и т. д. Это открывает много интересных возможностей в процессе разделения энантиомеров, что мы и увидим позднее. Схема 4.1 показывает, как можно систематизировать различные типы ЖХ.

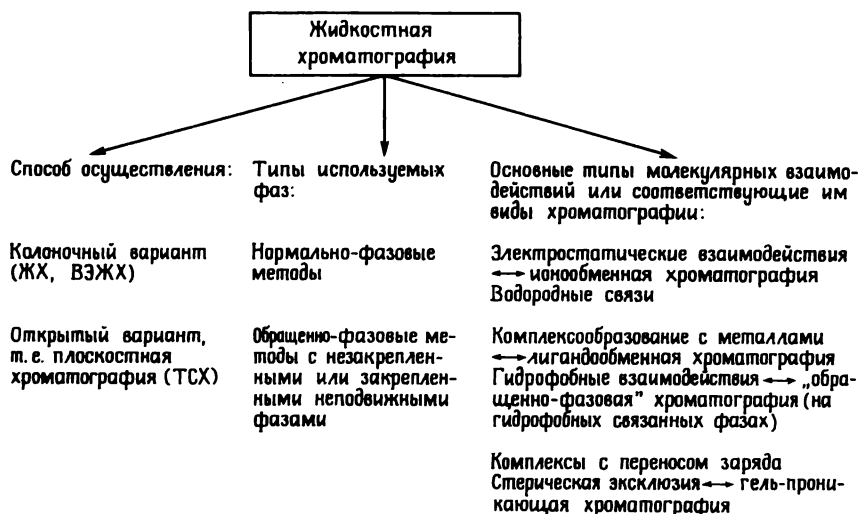


Схема 4.1. Основные типы жидкостной хроматографии.

Элюируемые из колонки соединения можно обнаруживать при помощи самых различных детекторов, но наиболее общеприняты следующие четыре. Рефрактометрический детектор (РД) относится к числу универсальных, так как измеряет свойство, присущее всем веществам, но он относительно малочувствителен. УФ-детектор — стандартный детектор для ЖХ, равнозначный ПИД в ГХ. Он может быть использован для наблюдения за разделением в большинстве систем ЖХ, но его чувствительность сильно зависит от строения соединения. В общем случае, особенно при наличии детектора с переменной длиной волны, перекрывающего область от 190 до 360 нм, этот тип детекторов позволяет получать прекрасные хроматограммы. Относительно недавно в практику вошли так называемые детекторы с диодной линейкой, позволяющие получить полный УФ-спектр для любой точки хроматограммы. Этот метод особенно удобен для идентификации и определения гомогенности перекрывающихся пиков.

Флуоресцентные детекторы обладают высокой селективностью и часто очень высокой чувствительностью. Помимо обнаружения соединений с природной флуоресценцией с их помощью можно обнаруживать производные, полученные введением флуорофорных групп до или после разделения.

И наконец, электрохимические детекторы, получившие распространение как высокоселективные и чувствительные детекторы для обнаружения таких соединений, которые способны к электрохимическому окислению или восстановлению. Электрохимические детекторы работают только с проводящей водной подвижной фазой, и, следовательно, они наиболее подходят для обращенно-фазовой или ионнообменной хроматографии.

4.3. РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ ЧЕРЕЗ ОБРАЗОВАНИЕ КОВАЛЕНТНЫХ ДИАСТЕРЕОМЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ. ОБЗОР

Как указывалось в разд. 3.2, энантиомеры можно разделить в виде диастереомерных производных, получаемых по реакции с оптически активными реагентами. Поскольку диастереомеры обладают различными физическими и химическими свойствами, эти производные можно разделить обычными хроматографическими методами. Часто такие методы достаточно просты в применении, особенно в ГХ, где дериватизация необходима в любом случае. Однако недостатком этих методов являются определенные трудности в интерпретации результатов.

Во-первых, чрезвычайно важно знать оптическую чистоту модифицируемого агента. Только если она соответствует 100%, результаты аналитического разделения непосредственно отвечают энантиомерному составу. Причина этого показана на схеме 4.2. Если мы разделяем энантиомеры соединения А в виде диастереомерных производных (I и II), полученных реакцией с хиральным реагентом (+)-В, загрязнение его энантиомером (–)-В является недопустимым. Ведь продукты, получаемые в результате реакции с (–)-В (III и IV), образуют энантиомерные пары с основными продуктами (IV с I и III с II) и таким образом вносят добавочный вклад в соответствующие пики. Возможный результат такого вклада лучше всего показать на примере.

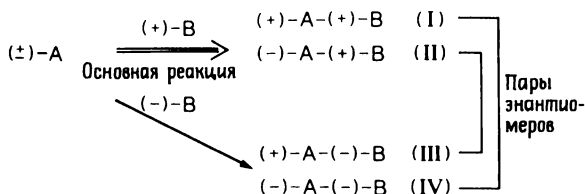
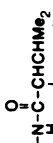
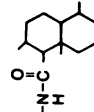

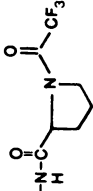
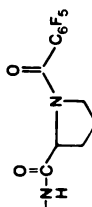
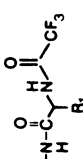
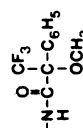


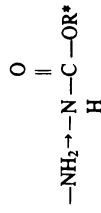
Схема 4.2. Пример использования для хиральной дериватизации реагента с оптической чистотой менее 100%. Поскольку энантиомеры нельзя разделить на нехиральной неподвижной фазе, продукты I и IV, а также II и III дают один пик.

Предположим, что А состоит из (+)-формы 99%-ной оптической чистоты. Предположим также, что (+)-В имеет оптическую чистоту 97%. По определению (см. разд. 3.1.1) это означает, что в реакционной смеси содержится 99,5% (+)-А и 0,5% (–)-А и 98,5% (+)-В и 1,5% (–)-В. Примем, что реакция протекает полностью, тогда мы будем иметь следующие пропорции для I—IV: 98,0075, 0,4925, 1,4925 и 0,0075% соответственно. Поскольку пики соединений I и IV накладываются на хроматограмме друг на друга, так же как и пики соединений II и III, наблюдаемые два пика соотносятся друг с другом как 98,015 и 1,985% соответственно. Таким образом, если не учитывать оптическую чистоту дериватизирующего реагента, то А на 98% состоит из (+)-формы, что соответствует оптической чистоте 96%, и в истинное значение вносится заметная ошибка.

Во-вторых, количественный анализ основывается на предположении, что реакция дериватизации протекает полностью. Если это не так, то различный выход продуктов может вызывать большую ошибку. Также необходимо быть уверенным, что реакция не сопровождается рацемизацией или эпимеризацией. Соединения, содержащие асимметрический атом углерода и способные изменять конфи-

Таблица 4.2. Реакции хиральной модификации, получившие распространение в ГХ

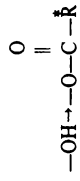
Модифицируемая группа	Хиральный модифицирующий реагент	Структура производного	Тип анализируемых соединений	Литература
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{NH}_2 \rightarrow -\text{N}-\text{C}-\text{R}^* \end{array}$	2-Хлоризовалериохлорид		Аминокислоты Амины	7—9 10
	Дриманоилхлорид		Аминокислоты Амины	11 11
	Хризантемоилхлорид		Аминокислоты Амины	
	N-ТФА-пролилхлорид		Аминокислоты Амины	10, 12, 13 14—16
	N-(Пентафторбензоил) пролилхлорид		Амины	17—18
	N-ТФА-аланилхлорид и его гомологи (R = CH3, CH(CH3)2, CH2CH(CH3)2, C6H5)		Амины	16
	(S)-2-Метоксн-2-трифторметилфенацетилхлорид (МТФА-Cl)		Амины	19—21



Ментилхлорформиат

Аминокислоты
Амины

22
22

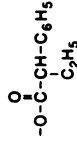


2-Фенилпропионилхлорид

Оксихлориды
Спирты

23
23

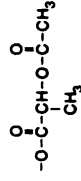
2-Фенилбутилхлорид



Спирты

24—26

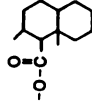
Хлорангидрид О-ацетилмолочной кислоты:



Спирты

27—29

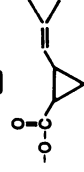
Дриманонилхлорид



Оксихлориды

11

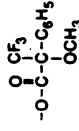
Хризантемоилхлорид



Оксихлориды
Спирты

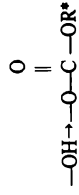
11
11

МТФА-Cl



Амфетамины (ОН)

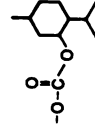
19—21



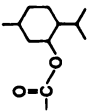
(—)-Ментилхлорформиат

Оксихлориды
Спирты

22
22, 30—32



Продолжение табл. 4.2.

Модифицируемая группа	Хиральный модифицирующий реагент	Структура производного	Тип анализируемых соединений	Литература
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{OH} \rightarrow -\text{O}-\text{C}-\text{N}-\ddot{\text{R}} \\ \text{H} \end{array}$	1-Фенилэтилизоцианат	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{O}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \parallel \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Оксикислоты	6,33
$-\text{CO}_2\text{H} \rightarrow -\text{CO}_2\ddot{\text{R}}$	Алканола-2 ($\text{R}_1 = \text{n-C}_2-\text{C}_6$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$)	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \\ -\text{C}-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	Аминокислоты α -Оксикислоты Кетокислоты	27,28,34—37 29, 38—40 41
	(-)-Ментол		Аминокислоты α -Оксикислоты Другие кислоты	4, 42—44 45 46—51
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{CO}_2\text{H} \rightarrow -\text{C}-\text{N}-\text{R}^* \\ \text{H} \end{array}$	(+)-4-Метил-2-пентиламин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CHMe}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Аминокислоты	52
	Метиловые эфиры аминокислот	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ -\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{Me} \\ \parallel \\ \text{O} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Аминокислоты	3,53

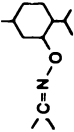
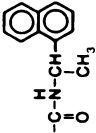
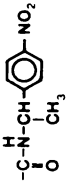
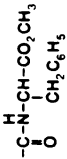
$\text{>C=O} \rightarrow \text{>C=N-N-R}^*$ H	(+)-2,2,2-Трифтор-1-фенил- гидразин	>C=N-N-CF_3 H	Кетоны	54
$\text{>C=O} \rightarrow \text{C=N-O-R}^*$	O-(—)-Ментилгидроксиламин		Углеводы	55

Таблица 4.3. Реакции хиральной модификации, получившие распространение в ЖХ

Модифицируемая группа	Хиральный модифицирующий реагент	Структура производного	Тип анализируемых веществ	Литература
$\begin{array}{c} \parallel \\ -\text{NH}_2-\text{N}-\text{C}-\text{R}^* \\ \\ \text{H} \end{array}$	N-Карбоксиангидриды или БОК-производные L-аминокислот	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{N}-\text{C}-\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{H} \quad \text{R}' \end{array}$	Аминокислоты	56—60
	N-ТФА-пролилхлорид	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{N}-\text{C}-\text{CH}-\text{N}^+\text{CF}_3 \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \quad \text{Cyclopropyl} \end{array}$	Аминоспирты	70, 71
	Хлорангидрид (S)-О-метил-миндальной кислоты	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{N}-\text{C}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \quad \text{OCH}_3 \end{array}$		72
	(-)-1-Метокси-1-метил-1-(1-нафтил)уксусная кислота			
	(-)-1-Метокси-1-метил-1-(2-нафтил)уксусная кислота		Эфиры аминокислот	73, 74
$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ -\text{NH}_2-\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{R}^* \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \quad \text{H} \end{array}$	2,3,4,6-Тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилизотиоцианат (ГИТК)		Аминокислоты Аминоспирты	61, 62 63, 64

2,3,4-Три-О-ацетил-β-D-арабинофуранозил изотиоцианат (АИТК)	Эфедрины Амфетамины	75 76
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—NH}_2 \rightarrow \text{N} \text{—} \text{C} \text{—} \text{N} \text{—} \text{R}^* \\ \quad \quad \quad \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—N—C—CH—} \\ \quad \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	Амины 66
1-Фенилэтилизоцианат	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—N—C—CH—} \\ \quad \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	
1-(1-Нафтил)этилизоцианат	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—N—C—CH—} \\ \quad \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \\ \text{C}_{10}\text{H}_7 \end{array}$	
МТФА-Cl	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—O—C—} \text{C}_6\text{H}_4 \text{—} \text{OCH}_3 \\ \quad \quad \quad \\ \text{CF}_3 \end{array}$	Терпеноиды Спирты 77—79
1-Фенилэтилизоцианат	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—O—C—} \text{C}_6\text{H}_5 \text{—} \text{CH—} \\ \quad \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$	66, 80
1-(1-Нафтил)этилизоцианат	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—O—C—} \text{C}_{10}\text{H}_7 \text{—} \text{CH—} \\ \quad \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$	80
1-Фенилэтиламин	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{—C—N—CH—} \\ \quad \quad \quad \parallel \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	Карбоновые кислоты 81
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—OH} \rightarrow \text{O} \text{—} \text{C} \text{—} \text{R}^* \end{array}$		
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—OH} \rightarrow \text{O} \text{—} \text{C} \text{—} \text{N} \text{—} \text{R}^* \\ \quad \quad \quad \text{H} \end{array}$		
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—OH} \rightarrow \text{O} \text{—} \text{C} \text{—} \text{N} \text{—} \text{R}^* \\ \quad \quad \quad \text{H} \end{array}$		
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—CO}_2\text{H} \rightarrow \text{C} \text{—} \text{N} \text{—} \text{R}^* \\ \quad \quad \quad \parallel \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{O} \end{array}$		

Продолжение табл. 4.3.

Молифицируемая группа	Хиральный молифицирующий реагент	Структура производного	Тип анализируемых веществ	Литература
	1-(1-Нафтил)этиламин		Карбоновые кислоты	82
	1-(4-Нитрофенил)этиламин		Карбоновые кислоты	83
	Метилвый эфир фенил-аланина		Карбоновые кислоты	84

гурацию через промежуточное образование карбаниона или карбонового иона, следует модифицировать особенно осторожно, чтобы сохранить необходимую конфигурационную стабильность в условиях слишком высокой кислотности или основности.

Первостепенную важность имеет также расстояние между двумя хиральными центрами в полученном диастереомерном производном. В общем случае центры должны располагаться как можно ближе друг к другу, чтобы обеспечить максимальное различие в хроматографических свойствах. Обычно два хиральных центра разделяют три связи, а те производные, в которых их разделяют четыре связи, часто оказываются бесполезными.

Для детального и углубленного ознакомления с методами разделения энантиомеров через диастереомерные производные читателям рекомендуется обратиться к недавно вышедшей книге Соутера (см. список литературы).

4.3.1. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В 1960 г. было показано, что диастереомерные дипептиды D,L-фенилаланина с L-аланином можно разделить методом ГХ в виде N-трифторацелированных метиловых эфиров [3]. Это привело к использованию аминокислотных производных в виде хиральных N-модифицирующих агентов для разделения методом ГХ аминокислот в виде диастереомерных дипептидных производных. Обычно для получения таких производных прибегают к реакции с N-трифторацетил-L-пролилхлоридом, который можно получить с высокой оптической чистотой из L-пролина благодаря устойчивости этой циклической аминокислоты к рацемизации. Другие хиральные реагенты, применяемые для модификации аминогрупп в аминокислотах, принадлежат к классу 2-хлорацетилхлоридов. Эти соединения также можно получить из соответствующих аминокислот.

Хиральная модификация карбоксильной группы проводится при помощи различных оптически активных спиртов, таких как 2-бутанол или его более высокомолекулярные гомологи. Для получения диастереомерных эфиров для ГХ был также использован (–)-ментол [4].

Гидроксильные группы в спиртах или оксикислотах обычно модифицируют реакцией с (–)-ментилхлорформиадом [5], которая дает диастереомерные эфиры, или с (+)-либо (–)-фенилэтилизотиоцианатами [6], получая карбаматы.

Существует целый ряд других хиральных модифицирующих реагентов. В табл. 4.2 приведен список таких реагентов и указаны ссылки на оригинальные статьи.

4.3.2. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Большинство ранних работ в этой области, как и в ГХ, посвящено аминокислотам, главным образом стереохимическому анализу при пептидном синтезе. Одна из весьма обстоятельных работ, посвященных разделению диастереомерных дипептидов на катионообменных сорбентах, выполнена Маннингом и Муром [56, 57]. В качестве хиральных модифицирующих реагентов эти авторы выбрали N-карбоксиангидриды различных аминокислот. Данный метод в дальнейшем был усовершенствован: были использованы N-оксисуццинимидные эфиры БОК-L-аминокислот с последующим удалением БОК-группы в трифторуксусной кислоте [58]. Как выяснилось, при разделении методом обращенно-фазовой ЖХ таких дипептидов D,D- или L,L-формы элюируются раньше, чем D,L- или L,D-диастереомеры. ЯМР-исследования показали, что только у последних, в их наиболее стабильной конформации, гидрофобные боковые цепи имеют *цис*-ориентацию. Логично предположить, что именно такая ориентация обеспечивает наиболее эффективное взаимодействие с гидрофобной неподвижной фазой [59, 60]. Для хиральной модификации аминокислот в ОФ-ЖХ могут также служить изотиоцианаты тетраацетилглюкозы (ГИТЦ) и триацетиларабинозы (АИТЦ) [61, 62]. К последним можно прибегать и при разделении аминов [63] или аминок спиртов [64]. Оптически активный 1-фенилизотиоцианат [65] оказался очень полезным реагентом для модификации хиральных аминов для ОФ-ЖХ. Его 1-нафтильный аналог был использован для превращения спиртов в диастереомерные карбаматы, которые можно разделить при помощи нормально-фазовой ЖХ [66, 67]. Вполне доступными хиральными модифицирующими реагентами являются также метиловые эфиры L-аминокислот, таких как L-фенилаланин [68] или L-фенилглицин [69].

Наиболее распространенные в ЖХ методы модификации хиральными соединениями представлены в табл.4.3.

Рекомендуемая литература

Gil-Av E., Nurok D. Resolution of Optical Isomers by Gas Chromatography of Diastereoisomers, *Adv. Chromatogr.*, **10**, 99 (1972).

Snyder L. R., Kirkland J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley, New York, 1974.

Blau K., King G. S. Handbook of Derivatives for Chromatography, Heyden, London, 1978.

Poole C. F., Schuette S. A. Contemporary Practice of Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1984.

Souter R. W. Chromatographic Separation of Stereoisomers, CRC Press, Boca Raton, 1985.

Цитируемая литература

1. *Ettre L. S., Zlatkis A.* (eds.) 75 Years of Chromatography, A Historical Dialogue, Elsevier, Amsterdam, 1979.
2. *Novotny M.* Anal. Chem., **53**, 1294A. (1981).
3. *Weygand F., Kolb B., Prox A., Tilak M., Tomida I.* Z. Physiol. Chem., **322**, 38 (1960).
4. *Halpern B., Westley J. W.* Chem. Commun., 1965, 421.
5. *Annett R. G., Stumpf P. K.* Anal. Biochem., **43**, 515 (1972)
6. *Hamberg M.* Chem. Phys. Lipids, **6**, 152 (1971).
7. *Westley J. W., Halpern B.* In Gas Chromatography, C. L. A. Harbourn (ed.), Inst. of Petrol., London, 1968, p. 119.
8. *Halpern B., Westley J. W.* Chem. Commun., 1965, 246.
9. *Lände S., Landowe R. A.* Tetrahedron, 1966, 3085.
10. *Halpern B., Westley J. W.* Chem. Commun., 1966, 34.
11. *Brooks C. J. W., Gilbert M. T., Gilbert J.* Anal. Chem., **45**, 896 (1973).
12. *Halpern B., Westley J. W.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **19**, 361 (1965).
13. *Halpern B., Westley J. W.* Tetrahedron Lett., 1966, 2283.
14. *Westley J. W., Halpern B.* Anal. Chem., **40**, 2046 (1968).
15. *Souter R. J.* Chromatogr., **108**, 265 (1975).
16. *Karger B. L., Stern R. L., Keane W.* Anal. Chem., **39**, 228 (1967).
17. *Matin S. B., Rowland M., Castagnoli N., Jr.* J. Pharm. Sci., **62**, 821 (1973).
18. *Matin S. B., Wan S. H., Knight B.* Biomed. Mass. Spectrom., **4**, 118 (1973).
19. *Dale J. A., Dull D. L., Mosher H. S. J.* Org. Chem., **34**, 2543 (1969).
20. *Gal J., Ames M. M.* Anal. Biochem., **83**, 266 (1977).
21. *Gal J. J.* Pharm. Sci., **66**, 169 (1977).
22. *Westley J. W., Halpern B. J.* Org. Chem., **33**, 3978 (1968).
23. *Hammarstrom S., Hamberg M.* Ann. Biochem., **52**, 169 (1973).
24. *Gilbert J. D., Brooks C. J. W.* Chem. Commun., 1973, 194.
25. *Gilbert J. D., Brooks C. J. W.* Anal. Lett., **6**, 639 (1973).
26. *Guette J. P., Horeau A.* Tetrahedron Lett., 1965, 3049.
27. *Charles R., Fischer G., Gil-Av E.* Isr. J. Chem., **1**, 234 (1963).
28. *Gil-Av E., Charles R., Fischer G. J.* Chromatogr., **17**, 408 (1965).
29. *Julia S., Sans S. M. J.* Chromatogr. Sci., **17**, 651 (1979).
30. *Hammarstrom S.* FEBS Lett., **5**, 192 (1969).
31. *Hamberg M.* Anal. Biochem., **43**, 515 (1971).
32. *Annett R. G., Stumpf P. K.* Anal. Biochem., **47**, 638 (1972).
33. *Pereria W.* Anal. Lett., **3**, 23 (1970).
34. *Bailey M. E., Hass H. B. J.* Am. Chem. Soc., **63**, 1969 (1941).
35. *Pollock G. E., Oyama V. I.* J. Gas Chromatogr., **4**, 126 (1966).
36. *Pollock G. E., Kawachi A. H.* Anal. Chem., **40**, 1356 (1968).
37. *Raulin F., Khare B. N. J.* Chromatogr., **75**, 13 (1973).
38. *Gil-Av E., Nurok D.* Proc. Chem. Soc., **75**, 13 (1973).
39. *Kargar B. L., Stearn R. L., Rose R. L., Keane W.* in Gas Chromatography, A. B. Littlewood (ed.), Inst. of Petrol., London, 1967. p. 240.
40. *Kamerling J. P., Duran M., Gervig G. J., Ketting D., Bruinvis L., Vliegenhart J. F. G., Wadman S. K. J.* Chromatogr., **222**, 276 (1981).
41. *Schweer H. J.* Chromatogr., **243**, 149 (1982).
42. *Vitt S. V., Saporovskaya M. B., Gudkova J. V., Belikov V. M.* Tetrahedron Lett., 1965, 2575.
43. *Hasegawa M., Matsubara I.* Anal. Biochem., **63**, 308 (1975).
44. *Klein R. J.* Chromatogr., **170**, 468 (1979).

45. *Kamerling J. P., Gerwig G. J., Vliegenhart J. F. G., Duran M., Ketting D., Wadman S. K.*, *J. Chromatogr.*, **143**, 117 (1977).
46. *Maslean I., Eglinton G., Douraghi-Zadeh K., Ackman R. G., Hooper S. N.* *Nature*, **218**, 1019 (1968).
47. *Cox R. E., Maxwell J. R., Eglinton E., Pillinger C. T.* *Chem. Commun.*, 1970, 1639.
48. *Ackman R. G., Cox R. E., Eglinton G., Hooper S. N., Maxwell J. R.*, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 392 (1972).
49. *Murano A.* *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2203 (1972).
50. *Miyakado M., Onno N., Okuno Y., Hirano M., Fujimoto K., Yoshioka H.* *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 267 (1975).
51. *Horiba M., Kithara H., Takahashi H., Yamamota S., Murano A., Oi N.*, *Agr. Biol. Chem.*, **43**, 2311 (1979).
52. *Halpern B., Chew L. F., Westley J. W.* *Anal. Chem.*, **39**, 399 (1967).
53. *Weygand F., Prox A., Schmidhammer A., Konig W.*, *Angew. Chem.*, **75**, 282 (1963).
54. *Pereira W. E., Solomon M., Halpern B.* *Aust. J. Chem.*, **24**, 1103 (1971).
55. *Schweer H. J.* *Chromatogr.*, **243**, 149 (1982).
56. *Manning J. M., Moore S. J.* *Biolog. Chem.*, **243**, 5591 (1968).
57. *Manning J. M. J.* *Biolog. Chem.*, **246**, 2926 (1971).
58. *Mitchell A. R., Kent S. B., Chu I. C., Merrifield R. B.* *Anal. Chem.*, **50**, 637 (1978).
59. *Kroeff E. P., Piezyk D. J.* *Anal. Chem.*, **50**, 1053 (1978).
60. *Lundanes E., Geibrokk T. J.* *Chromatogr.*, **149**, 214 (1978).
61. *Nimura N., Ogura H., Kinoshita T. J.* *Chromatogr.*, **202**, 375 (1980).
62. *Kinoshita T., Kasahara Y., Nimura N.* *J. Chromatogr.*, **210**, 77 (1981).
63. *Sedman A. J., Gal J. J.* *Chromatogr.*, **278**, 199 (1983).
64. *Nimura N., Kasahara Y., Kinoshita T. J.* *Chromatogr.*, **213**, 327 (1981).
65. *Tompson J. A., Holtzman J. L., Tsura M., Holtzman J. L.* *J. Chromatogr.*, **238**, 470 (1982).
66. *Pirkl W. H., Hauske J. R. J.* *Org. Chem.*, **42**, 1839 (1977).
67. *Pirkl W. H., Simmons K. A., Boeder C. W.* *J. Org. Chem.*, **44**, 4891 (1979).
68. *Schmidtchen F. P., Rausenbach P., Simon H. Z.* *Naturforsch.*, **32b**, 98 (1977).
69. *Helmchen G., Volter H., Schule W.* *Tetrahedron Lett.*, 1977, 1417.
70. *Hermansson J., von Bahr C. J.* *Chromatogr.*, **221**, 109 (1980).
71. *Silber B., Riegelman S. J.* *Pharm. Exp. Ther.*, **215**, 643 (1980).
72. *Helmchen G., Strubert W.* *Chromatographia*, **7**, 713 (1974).
73. *Goto J., Hasegawa M., Nakamura S., Shimada K., Nambara T.* *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 847 (1977).
74. *Goto J., Hasegawa M., Nakamura S., Shimada K., Nambara T. J.* *Chromatogr.*, **152**, 413 (1978).
75. *Gal J. J.* *Chromatogr.*, **307**, 220 (1984).
76. *Miller K. J., Gal J., Ames M. M.* *J. Chromatogr.*, **307**, 335 (1984).
77. *Loew P., Johnson W. S.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 3765 (1971).
78. *Koreeda M., Weiss G., Nakanishi S. J.* *Am. Chem. Soc.*, **95**, 239 (1973).
79. *Imai K., Marumo S.* *Tetrahedron Lett.*, 1976, 1211.
80. *Ruttiman A., Schiedt K., Vecchi M. J.* *High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **612**, 612 (1983).
81. *Tamura S., Kuzuna S., Kawai K., Kishimoto S. J.* *Pharm Pharmacol.* **33**, 701 (1981).
82. *Vecchi M., Muller R. K. J.* *High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **2**, 195 (1983).
83. *Scott C. G., Petrin M. J., McCorcle T. J.* *Chromatogr.*, **125**, 157 (1976).
84. *Bergot B. J., Anderson R. J., Schooley D. A., Henrick C. A.* *J. Chromatogr.*, **155**, 97 (1978).

5. ТЕОРИЯ ХИРАЛЬНОГО ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО НЕПОСРЕДСТВЕННОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРОВ

В предыдущих главах было показано, что разделение энантиомеров в виде диастереомерных производных связано с рядом неудобств, которые в определенной степени препятствуют распространению этого метода. Поэтому непосредственное разделение, т. е. разделение с применением хиральных неподвижных фаз, представляет большой интерес и как аналитический, и как препаративный метод. Оно позволяет проводить разделение энантиомеров без какой-либо предварительной их модификации, особенно в ЖХ, и поэтому разработке новых хиральных фаз в последние несколько лет уделялось особое внимание. Задача данной главы — дать общее представление о различных подходах, развиваемых в этой области.

5.1. НЕОБХОДИМЫЕ УСЛОВИЯ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ХИРАЛЬНОЙ НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗОЙ

В любом виде хроматографии разделение обусловлено различным удерживанием сорбата на каком-либо типе неподвижной фазы. Мы уже видели, что хроматографический процесс можно представить в виде серии равновесных процессов и что константу равновесия, описывающую распределение соединения между неподвижной и подвижной фазами, можно связать с хроматографическим коэффициентом разделения. Обычно в зависимости от того, является ли неподвижная фаза твердой или жидкой, хроматографию подразделяют на адсорбционную и распределительную. С появлением связанных органических фаз в ЖХ и закрепленных покрытий на колонках из кварцевого стекла в ГХ эта классификация стала не столь очевидной. Тем не менее характер молекулярных взаимодействий с неподвижной фазой, определяющий удерживание, должен рассматриваться как вопрос первостепенной важности.

Однако для последующего обсуждения нам полезно представить удерживание не как явление, вызванное образованием связей с неподвижной фазой, а скорее как явление, обусловленное различием в длине пути, который должны пройти разделяемые компоненты по

колонке. В принципе в гель-проникающей хроматографии (ее еще называют эксклюзионной или ситовой), которая особенно важна в химии белков, разделение осуществляется главным образом вследствие различия в стерических размерах молекул: большие молекулы, поскольку они не способны диффундировать в мелкие поры матрицы, элюируются быстрее, чем малые молекулы.

Теория хиральной хроматографии (т. е. разделение, в котором хиральная неподвижная фаза селективно удерживает один из энантиомеров более прочно, чем другой) еще находится в начале своего развития. Для объяснения разделения оптических изомеров в ЖХ и ГХ предложен ряд моделей хирального распознавания, которые во многих случаях основаны на модели «трехточечного взаимодействия», выдвинутой Далглишем в 1952 г. [1]. Согласно этой теории, для хирального распознавания необходимы три одновременно осуществляющихся контакта между энантиомером и неподвижной фазой. Ситуация, вызывающая появление энантиоселективности, наглядно представлена на рис. 5.1. Совершенно очевидно, что эта модель определяет условия, достаточные для возникновения энантиоселективности. Тем не менее следует задать вопрос, всегда ли необходимы эти условия? Как мы увидим в дальнейшем, во многих случаях эти условия не являются необходимыми.

Далглиш пришел к своей модели после изучения разделения ряда ароматических аминокислот методом бумажной хроматографии. Он предположил, что гидроксильные группы целлюлозы образуют водородные связи с амино- и карбоксильной группами аминокислоты. Третий контакт, согласно его взглядам, — это взаимодействие с заместителями в ароматическом ядре.

Правило трехточечного взаимодействия часто использовалось в очень некритической форме. Поэтому данную модель необходимо проанализировать более подробно. Совершенно понятно, что для определения конфигурации хирального объекта путем сравнения с некоторой пробой необходимо, чтобы между ними присутствовали одновременно как минимум три существенных пространственных

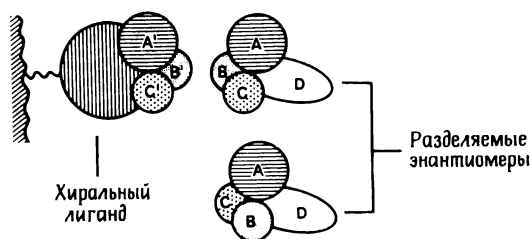


Рис. 5.1. Модель «трехточечного взаимодействия», предложенная Далглишем.

контакта, или взаимодействия. Это минимальное число контактов, однако, не обязательно соответствует трем точкам связывания, если они рассматриваются как молекулярные взаимодействия. В принципе вполне возможно, что молекулярную стерическую дифференциацию могут вызывать только стерические взаимодействия. В адсорбционной хроматографии, тем не менее, всегда должен присутствовать какой-либо тип взаимодействия с сорбентом. В определенных условиях он может возникать и в результате нековалентного связывания. Так, водородная связь, как и ионные или дипольные взаимодействия, значительно усиливаются в неполярных растворителях, тогда как гидрофобные взаимодействия играют важную роль в водных средах и т. д.

5.2. НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ АСПЕКТЫ МОДЕЛЕЙ ХИРАЛЬНОГО РАСПОЗНАВАНИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОСТИ

Хроматографическое разделение оптических изомеров обусловлено диастереомерной ассоциацией хиральной среды, созданной в колонке, и энантиомерных сорбатов. Разнообразие экспериментальных условий, при которых наблюдалось непосредственное разделение оптических изомеров, также свидетельствует о том, что необходимое различие в ассоциации может быть следствием различия в типах молекулярных взаимодействий. Ассоциация, которую количественно можно выразить через константу равновесия, является функцией как связывающих, так и отталкивающих взаимодействий, вовлеченных в этот процесс. Отталкивание обычно можно рассматривать как следствие стерических взаимодействий, но оно может вызываться и диполь-дипольными взаимодействиями, тогда как связывающие взаимодействия могут иметь самую различную природу. Это и водородная связь, и электростатическое или диполь-дипольное притяжение, и взаимодействия с переносом заряда, и гидрофобные взаимодействия (в водных системах). Как мы увидим в дальнейшем, уже одного типа связывающих взаимодействий может оказаться достаточным для разделения энантиомеров. Например, совершенно очевидно, что для разделения энантиомеров в некоторых видах как ГХ, так и ЖХ достаточно даже удерживания, обусловленного образованием всего лишь водородной связи. Тот факт, что энантиомерные сорбаты, несущие только один заместитель, способный к образованию водородных связей, можно разделить в этих условиях, указывает, что для проявления хиральной дискриминации в этом виде хроматографии необходим только один тип удерживающих сил.

Если мы выберем модель одноточенного связывающего взаимодействия, различие в константах связывания двух энантиомеров с хиральным связывающим центром можно рассматривать как следствие того, что это взаимодействие заставляет один из энантиомеров принимать невыгодную для него конформацию. К этому же объяснению часто прибегают при рассмотрении взаимодействий фермент—субстрат для объяснения субстратной специфичности последнего.

Давайте пойдем в выяснении причин хирального распознавания немного дальше и зададим вопрос, возможно ли оно на основе только стерического соответствия? Другими словами, могут ли быть созданы хиральные пустоты, допускающие преимущественное вхождение в них только одного из двух энантиомеров? И хотя до сих пор еще не было создано никаких хиральных неподвижных фаз (ХНФ), действие которых было бы основано главным образом на эффекте стерического исключения из хиральных пустот (см. разд. 7.1.3), несколько недавно появившихся работ по использованию метода «молекулярных отпечатков» представляются весьма интересными в этом плане [2]. Идея состоит в том, чтобы создать жесткую хиральную полость в полимерной сетке таким образом, чтобы она была приемлемым окружением только для одного из двух энантиомеров. Другими типами ХНФ, в которых стерическое соответствие имеет первостепенное значение, являются фазы, действие которых основано на эффекте включения; к числу таковых относятся, например, циклодекстриновые фазы и фазы, содержащие краун-эфиры. Эти фазы рассматриваются в гл. 7.

В последующих разделах приведено теоретическое рассмотрение некоторых основных типов связывания, возможных в процессах энантиоселективной сорбции.

5.2.1. КООРДИНАЦИОННЫЕ КОМПЛЕКСЫ С ПЕРЕХОДНЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Переходные металлы характеризуются наличием незаполненных внутренних *d*-орбиталей и способностью образовывать комплексы с теми лигандами, которые могут предоставить свои электроны для заполнения этих орбиталей. Такая координация обеспечивает очень строгую геометрию, так что лиганды могут занимать в пространстве только определенные положения. Донорные атомы лигандов удерживаются в комплексе на строго определенных расстояниях и в строго определенной ориентации. И как результат — эта так называемая координационная сфера плотно заполнена лигандами и молекулами растворителя. Последние образуют также вто-

рую (внешнюю) высокоорганизованную сферу. Таким образом, стабильность комплекса в большей степени зависит от его стереохимии. Если же в координационной сфере присутствуют два или более хиральных лиганда, их взаимодействие (непосредственное или через молекулы растворителя в первой или второй координационной сфере) может привести к различию в стабильности комплексов и, следовательно, к энантиоселективности.

Эти принципы реализованы и в газовой, и в жидкостной хроматографии. Однако помимо различия в стабильности диастереомерных комплексов необходимым условием успешного использования этого метода в хроматографии является достаточная кинетическая лабильность образующихся комплексов, т. е. их образование и диссоциация должны быть быстрыми в хроматографической шкале времени. В ряде случаев увеличение скорости обмена лигандов можно достигнуть повышением температуры, но этот прием не является общим. Стабильность комплексов сильно зависит также от самого переходного металла, и в ЖХ предпочтительным металлом считается Cu(II) , образующая наиболее прочные комплексы, а Ni(II) , Co(II) или Zn(II) , образующие менее прочные комплексы, находят применение в ГХ.

И в том и в другом случае основная идея метода состоит в использовании хиральной неподвижной фазы, содержащей закреплен-

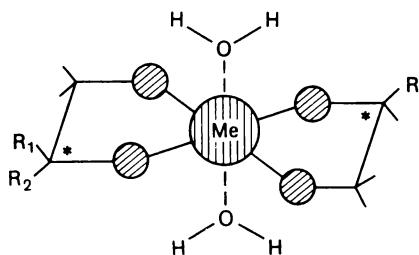
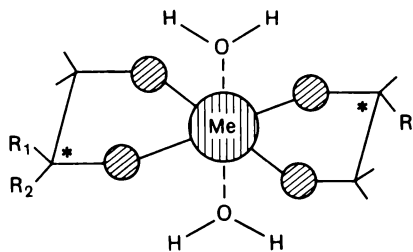


Рис. 5.2. Принципиальная схема хирального лигандного обмена, используемого для хроматографического разделения оптических изомеров: при взаимодействии хирального селектора (слева) и соответствующих энантиомеров (справа) происходит обратимое образование диастереомерных комплексов металлов.



ный хиральный лиганд, образующий координационные соединения с ионами переходных металлов. В процессе пропускания соответствующей рацемической смеси через колонку происходит образование смешанно-лигандных сорбционных комплексов по обменному или вытеснительному механизму. Такой лигандообменный процесс схематически представлен на рис. 5.2.

5.2.2. КОМПЛЕКСЫ С ПЕРЕНОСОМ ЗАРЯДА (КПЗ)

Этот особый механизм взаимодействия требует наличия у взаимодействующих соединений π -электронных систем. Ароматические системы, выступающие и как донорная, и как акцепторная компонента, часто образуют стабильные КПЗ. Такие ароматические π — π -взаимодействия совместно с дополнительными полярными взаимодействиями (водородные связи, диполь-дипольные взаимодействия) обеспечивают весьма высокую активность хиральных лигандов селекторов, используемых в ЖХ.

Обычно очень хорошими акцепторами π -электронов служат нитроароматические соединения, поскольку отрицательный заряд такой молекулы эффективно делокализован вследствие участия заместителей в резонансных структурах. К числу хороших доноров π -электронов относятся ароматические соединения, несущие электронодонорные заместители типа amino- или алкоксигруппы.

Хотя π — π -взаимодействий как главного источника удерживания вполне достаточно для разделения оптических изомеров конденсированных ароматических углеводородов с планарной хиральностью (гелицены, см. разд. 7.2.3), дополнительные связывающие взаимодействия увеличивают энантиоселективность, создаваемую лигандом. Очень удачный принцип структурной организации хирального лиганда, применяемого в сочетании с органическими растворителями (смесь гексан/пропанол-2), часто с большими значениями α , показан на рис. 5.3. Расположение групп вокруг хиральных центров в обоих партнерах соответствует одновременному трехточечному взаимодействию, при котором по крайней мере в двух точках обеспечивается связывающее взаимодействие (ситуация на рисунке отвечает взаимодействию более сильно удерживаемого энантиомера). Доказательства в пользу такого многоточечного взаимодействия были получены в результате исследования межмолекулярного ядерного эффекта Оверхаузуена в ЯМР [3], а также в результате проведения квантовомеханических расчетов [4].

Важная особенность таких систем — их взаимнообратимость, т. е. их наблюдаемая энантиоселективность не зависит от того, ка-

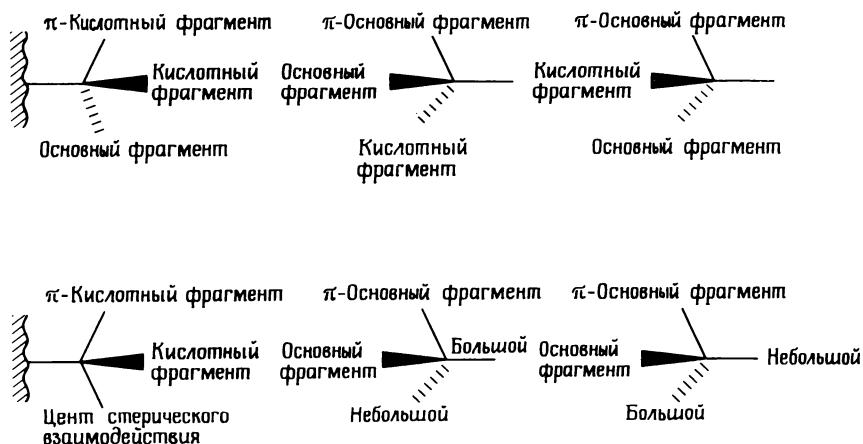


Рис. 5.3. Модель, используемая для объяснения энантиоселективности хиральных селекторов, образующих комплексы с переносом заряда [7] (с разрешения изд-ва).

кой из партнеров иммобилизован на неподвижной фазе. Использование подобной взаимообратимости позволяет находить новые селекторы для различных областей приложения.

5.2.3. КОМПЛЕКСЫ ВКЛЮЧЕНИЯ

Способность некоторых соединений вследствие особенностей их строения включать подходящие «гостевые» молекулы в свою структуру известна уже давно. Классическим примером соединений, обладающих подобными свойствами, являются мочевины и крахмал. Рентгеноструктурный анализ показал, что молекулы мочевины образуют комплексы благодаря наличию каналоподобных пустот, в которые легко входят неразветвленные алканы. Такие комплексы *n*-алкан—мочевина образуются самопроизвольно. Разветвленные алканы не могут входить в эти пустоты, поэтому данный эффект можно использовать для выделения *n*-алканов из смеси изомеров. Крахмал, как хорошо известно, образует комплексы включения с иодом. Циклодекстрины (декстрины Шардингера) — это кристаллические продукты разрушения крахмала, образующиеся под действием микроорганизмов (см. разд. 7.1.1.1). Полости α -циклодекстринов, построенных из шести остатков глюкозы, прекрасно подходят для образования комплексов включения с иодом или бензолом, но слишком малы для включения молекул бромбензола. В то же время β -циклодекстрин, состоящий из семи остатков

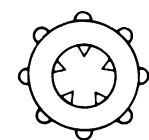
глюкозы, в отличие от α -формы осаждает бромбензол вследствие образования комплекса включения.

Жесткие стерические требования, обуславливающие возможность образования комплексов типа «хозяин—гость», предполагают, что это явление может быть стереоселективным. Следовательно, при использовании хирального «хозяина» можно разделить энантиомерные «гостевые» молекулы. Этот принцип полностью или отчасти используется в ряде методов жидкостной хроматографии, описываемых в гл. 7. Рассмотрим кратко процесс образования комплексов включения, действительно или предположительно имеющих место при разделении энантиомеров.

Рассмотрим два типа молекул-«хозяев», один из которых имеет гидрофильную внутреннюю поверхность и гидрофобную внешнюю, а второй — противоположное первому расположение полярных центров (рис. 5.4).

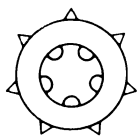
Гидрофильное внутреннее пространство в структуре «хозяина» *а* означает, что полость содержит гетероатомы подобные кислороду, у которых неподеленная пара электронов способна к образованию связи с такими акцепторами электронов, как катионы металлов или органические катионы. Гидрофобная внешняя поверхность придает комплексам «хозяин—гость» растворимость в органических средах, т. е. то свойство, которое используется в так называемом межфазном катализе (см. разд. 7.2.1). Один из типов таких соединений-«хозяев» обнаружен среди природных макроциклических полиэфиров, которые, как известно, способны связывать катионы щелочных металлов. Синтетические хиральные аналоги таких соединений, хиральные краун-эфиры, действительно проявляют заметную энантиоселективность по отношению к органическим аммониевым ионам. В этом случае ион аммония удерживается в полости вследствие образования водородных связей с эфирными кислородными атомами. Таким образом, в этом случае структурные и стерические требования «гостя» являются достаточно высокими.

В то же время гидрофобность внутренней поверхности соединения *б* означает, что пустоты вполне пригодны для включения угле-



„Хозяин” принимает гидрофильного „гостя”

а



„Хозяин” принимает гидрофобного „гостя”

б

△ Гидрофильные группы
○ Гидрофобные группы

Рис. 5.4. Упрощенная модель комплексов включения типа «хозяин-гость».

водородных фрагментов молекул. Включение не сопровождается образованием каких-либо связей, если оно вызвано главным образом гидрофобным эффектом и стерические требования выражены не столь жестко, как в предыдущем случае. К этому типу соединений-«хозяев» принадлежат циклодекстрины, которые будут рассмотрены в разд. 7.1.1.1 и 7.3.2. В условиях обращенно-фазовой хроматографии (водная среда) разделение энантиомеров возможно, как полагают, благодаря объединению гидрофобных взаимодействий, которые ответственны за процесс образования комплекса включения, и стерических эффектов, вызываемых заместителями, имеющимися в хиральной структуре у входа в полость.

Особый тип комплексов включения обнаружен в хиральных матрицах, образуемых набухшими производными микрокристаллической целлюлозы. Разделение на триацетилцеллюлозе, получаемой гетерогенным ацилированием с целью сохранения микрокристаллической структуры, как выяснилось, отчасти протекает по механизму стерического исключения. Так, в серии ароматических углеводородов (не обладающих в заметной степени способностью к образованию связей) бензол удерживается достаточно сильно, мезитилен (2,3,5-триметилбензол) — значительно слабее, а 1,3,5-три-*трет*-бутилбензол не удерживается (полностью исключается). Объяснить это можно тем, что полисахаридные цепи имеют сильно переплетенную структуру и образуют своего рода двумерное молекулярное сито, допускающее включение определенных плоских ароматических структур и исключающее, по стерическим причинам, более объемные структуры. Кроме того, более сильное удерживание бензола (по сравнению с толуолом) заставляет предположить, например, наличие карманов в структуре каналов и возможность вторичных эффектов.

5.3. ОБСУЖДЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ

5.3.1. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА КОЭФФИЦИЕНТ РАЗДЕЛЕНИЯ

Возвращаясь к теме, изложенной в предыдущей главе, и приведенному там определению α , мы можем быстро вывести уравнение (5.1), если примем во внимание, что каждый энантиомер находится в равновесии между подвижной и неподвижной фазами. Исходя из выражения, определяющего изменение свободной энергии $\Delta G^\circ = -RT \ln K$, различие в изменении свободной энергии для двух

энантиомеров $\Delta\Delta G^\circ = \Delta G_R^\circ - G_S^\circ$ можно представить в следующем виде: $-\Delta\Delta G^\circ = RT \ln K_R/K_S$, где $K = C_s/C_m$, K_R и K_S — константы равновесия и $K_R > K_S$ (произвольное предположение).

Согласно определению, $k' = KV_s/V_m$, что и дает выражение:

$$-\Delta\Delta G^\circ = RT \ln k'_R/k'_S = RT \ln \alpha \quad (5.1)$$

Таким образом, различие в свободной энергии связано со значением α , которое легко определить из хроматографических данных. Цифры, представленные в табл. 5.1, очень наглядны, так как показывают, насколько небольшие различия в энергиях необходимы для полного разделения оптических изомеров, если колонка обладает приемлемой эффективностью.

В предыдущих главах мы видели, что современная техника приготовления колонок может обеспечить получение очень высокоэффективных капиллярных колонок, которые в хороших аналитических газовых хроматографах позволяют добиться разделения до нулевой линии для пиков с величиной $\alpha < 1,05$. В колонках с числом эффективных теоретических тарелок, составляющем примерно $2 \cdot 10^5$, при $\alpha = 1,01$ наблюдается только 2%-ное перекрытие пиков ($R_s = 1,11$), что в свою очередь соответствует различию в энергии в 5,9 кал/моль (24,7 Дж/моль). Столь незначительные различия в энергии по крайней мере на порядок ниже тех значений, которые обычно отвечают конформационным изменениям в молекуле. Следовательно, связывание двух энантиомеров на данном хиральном участке неподвижной фазы может отвечать различным величинам свободной энергии уже просто потому, что один из энантиомеров по стерическим причинам должен принять энергетически менее выгодную конформацию.

Значительно меньшая эффективность колонок в ЖХ часто более чем компенсируется существенно большими значениями α , которые можно получить в этом виде хроматографии. В ряде случаев были

Таблица 5.1. Различие в свободной энергии, необходимое для получения $\alpha > 1$

α	$\Delta\Delta G$, кал/моль (Дж/мол)
1,05	29 (121)
1,10	56 (236)
1,50	240(1005)
2,00	410(1717)
10,00	1364(5705)

получены значения α равные 30 и более, что соответствует значению $\Delta\Delta G^\circ$ около 2 ккал/моль (8,4 кДж/моль). Обычно такие значения достигаются вследствие очень малого удерживания энантиомера, который элюируется первым. Это означает, что в колонке происходит высокоэнантиоселективная адсорбция, т. е. один из энантиомеров практически не связывается с ХНФ по стерическим причинам. Объяснить это исходя из модели трехточечного взаимодействия не так легко, скорее всего здесь реализуется своего рода механизм «хиральной стерической эксклюзии», связанный с представлением о «стерическом соответствии», включающим только одно связывающее взаимодействие.

Преобразуя уравнение (5.1) с целью включения энтальпийного и энтропийного членов (путем использования уравнения Гиб-

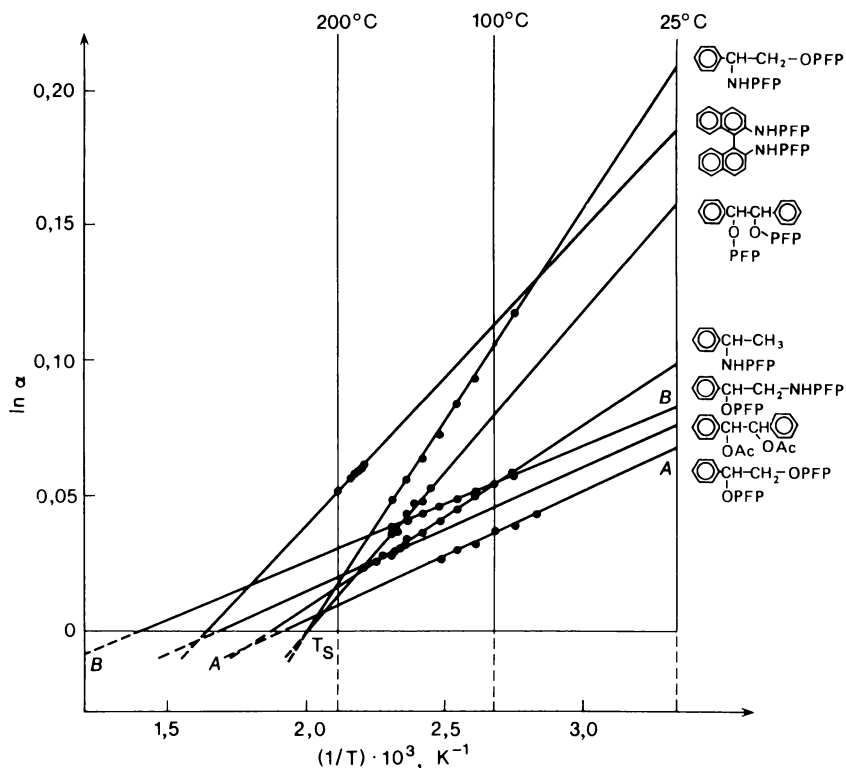


Рис. 5.5. Пример снижения селективности разделения энантиомеров с повышением температуры в ГХ. Приведенная зависимость позволяет определить энтальпийный и энтропийный вклады в разделение. Хроматографирование всех соединений проводилось на одной и той же колонке [5] (с разрешения изд-ва).

бса—Гельмгольца: $G = H - TS$), получаем выражение

$$\ln \alpha = - \frac{\Delta \Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta \Delta S^\circ}{R} \quad (5.2)$$

Таким образом, мы можем построить зависимость $\ln \alpha$ от $1/T$. Наклон этой линии пропорционален разности энтальпий, а пересечение с осью абсцисс ($\ln \alpha = 0$) дает температуру, при которой энтальпийный и энтропийный вклады взаимно компенсируют друг друга. В ГХ подобные эксперименты провести несложно [5]. Рис. 5.5 показывает типичный вид подобных зависимостей.

5.3.2. КОАЛЕСЦЕНЦИЯ ПИКОВ, ОБУСЛОВЛЕННАЯ РАЦЕМИЗАЦИЕЙ

В принципе взаимопревращение энантиомеров всегда можно представить каким-либо механизмом, предусматривающим образование ахирального промежуточного соединения. В растворе такие процессы часто катализируются кислотами или основаниями и вследствие этого связаны со стереохимическими превращениями положительно или отрицательно заряженных переходных промежуточных соединений. Типичным примером подобных процессов являются реакции рацемизации, протекающие через стадию образования карбониевого иона или карбаниона (схема 5.1).

В этой и подобных ситуациях величина энергетического барьера взаимопревращения энантиомеров зависит от влияния заместителей в переходном состоянии, ведущем к образованию ахирального промежуточного соединения.

Еще более простые механизмы рацемизации наблюдаются в тех случаях, когда хиральность вызывается в основном стерическими

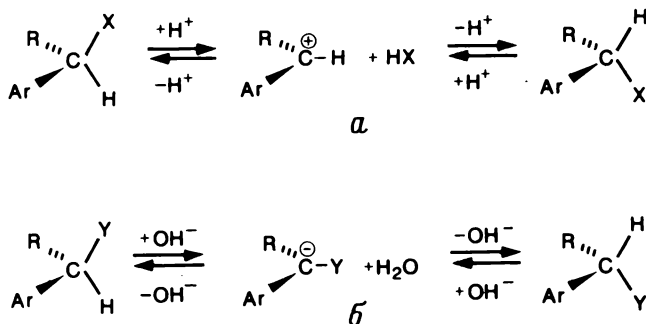


Схема 5.1. Примеры кислотного (а) и основного (б) катализа рацемизации, приводящего к образованию ахиральных заряженных интермедиатов.

затруднениями, как в соединениях с аксиальной или планарной хиральностью. Так, если в качестве примера выбрать атропоизомеры (схема 5.2), энергетический барьер внутреннего вращения вокруг центральной связи может быть достаточно высоким, чтобы воспрепятствовать сколько-нибудь заметной рацемизации оптически активной формы в растворе при комнатной температуре. Это в свою очередь делает возможным выделение в оптически активном состоянии. Однако очень часто температуру следует довольно сильно понизить, чтобы уменьшить скорость внутреннего вращения, ведущего к взаимопревращению энантиомеров.

Если принять во внимание подобные реакции рацемизации в связи с хроматографическими методами непосредственного разделения оптических изомеров, станет очевидным, что во многих случаях условия хроматографического разделения играют важную роль. В общем можно сказать, что если хроматографические условия выбраны таким образом, что скорость рацемизации существенна в хроматографической шкале времени, результаты разделения отличаются от обычных. Элюирующийся первым энантиомер во время прохождения по колонке частично превратится в энантиомер, который элюируется последним. Этот процесс приведет к размыванию заднего фронта («хвостованию») первого пика. Соответственно энантиомер, элюирующийся последним, с той же самой скоростью превращается в свой антипод. Это вызовет размывание переднего фронта у второго пика. Суммарный результат этого процесса — усиление перекрывания пиков, так что разделение до нулевой линии не достигается. Если же рацемизация идет достаточно быстро в сравнении с хроматографическим процессом, то произойдет полное

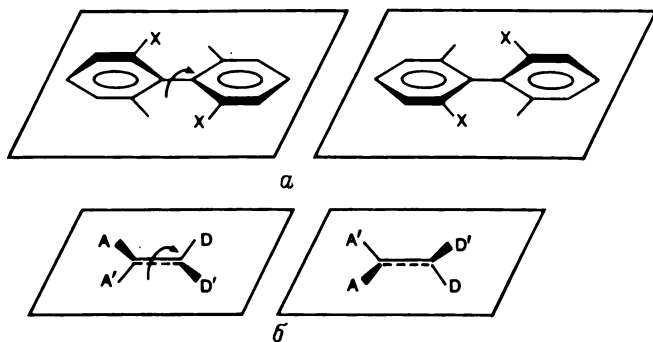


Схема 5.2. Термическая рацемизация, приводящая к изменению конформации молекулы вследствие внутреннего вращения, в биарильной системе (а) и в системе поляризованного алкена (б).

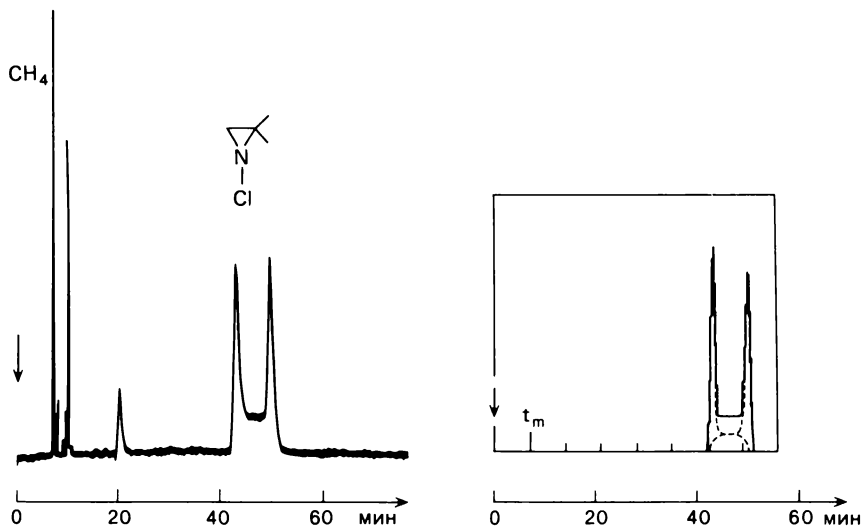


Рис. 5.6. Примеры хроматограмм, наблюдаемых в тех случаях, когда разделение сопровождается рацемизацией [8] (с разрешения изд-ва).

слияние пиков. Эта ситуация изображена на рис. 5.6. Следовательно, рацемизация непосредственно обнаруживается на хроматограммах, полученных на хиральных фазах. И наоборот, по данным о коалесценции хроматографических пиков при помощи соответствующей компьютерной программы можно рассчитать скорость рацемизации. Однако эта область изучена еще недостаточно. Кроме того, следует иметь в виду, что наблюдаемая скорость рацемизации может отличаться от определяемой в растворе, поскольку реакция может катализироваться поверхностью, с которой растворенное вещество вступает в контакт в процессе прохождения через колонку [6].

В разд. 8.5 мы еще вернемся к хроматографии оптических изомеров соединений, склонных к рацемизации.

Рекомендуемая литература

- Porath J. Explorations into the Field of Charge-Transfer Adsorption, *J. Chromatogr.*, **159**, 13 (1978) (*Chromatogr. Rev.*, **22**, 13 (1978)).
 Davankov V. A. Resolution of Racemates by Ligand-Exchange Chromatography, *Adv. Chromatogr.*, **18**, 139 (1980).
 Atwood J. L., Davis J. E. D., McNicol D. D. (eds.) *Inclusion Compounds*, Academic Press, London, 1984.
 Worsch D., Vögtle F. Separation of Enantiomers by Clathrate Formation, *Top. Curr. Chem.*, **140**, 21 (1987).

Цитируемая литература

1. *Dalglish C. J. Chem. Soc., 1952, 137.*
2. *Wulff G. in Polymeric Reagents and Catalysis, W. T. Ford (ed.), ACS, Washington DC, 1986, p. 186.*
3. *Pirkle W. H., Pocharsky T. C. J. Am. Chem. Soc., 108, 5627 (1986).*
4. *Lipkowitz K. B., Demeter D. A., Parish C. A., Darden T. Anal. Chem., 59, 1731 (1987).*
5. *Koppenhöfer B., Bayer E. Chromatographia, 19, 123 (1984).*
6. *Blaschke G. Angew. Chem., 92, 14 (1980).*

6. ХИРАЛЬНАЯ ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Хиральная газовая хроматография является во многих случаях непревзойденным аналитическим методом, главным образом вследствие высокой пиковой емкости, достигаемой в современных капиллярных колонках. В последние два десятилетия этот метод интенсивно развивается и область его приложения постоянно увеличивается.

6.1. РАЗРАБОТКА ХИРАЛЬНЫХ НЕПОДВИЖНЫХ ФАЗ, ОБРАЗУЮЩИХ ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ С СОРБАТОМ

6.1.1. ПРОИЗВОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТ И ОЛИГОПЕПТИДОВ

В 1966 г. Гил-Ав и сотр. [1] установили, что оптические изомеры ряда эфиров N-трифторацетил-D,L-аминокислоты можно разделить на стеклянной капиллярной колонке длиной 100 м, покрытой хиральной фазой, а именно N-трифторацетил-L-изолейцином. Они предположили, что причиной сорбции и хиральной дискриминации является образование водородных связей между соответствующими амидными группами и карбонильными атомами кислорода ХНФ и сорбата. Этот первый действительно успешный результат вызвал интерес у многих исследователей, и в последующие годы исходя из аминокислот в качестве хиральной основы было получено и исследовано большое число ХНФ. Четыре основных структурных типа (рис. 6.1) были изучены особенно подробно. Как выяснилось, в диапазоне используемых температур эфиры N-ТФА-аминокислот (1) и эфиры N-ТФА-дипептидов (2) ($R' = \text{CF}_3$) в общем случае показывают большее удерживание и селективность α , чем карбонилбис (эфиры аминокислот) (3).

Общими проблемами для ГХ являются летучесть и термостойкость неподвижной фазы. ХНФ со структурой 1 следует применять при относительно низких температурах, лишь немного выше температуры плавления, с дипептидными фазами (2) дело обстоит существенно лучше. Более того, хиральная дискриминация у этих фаз

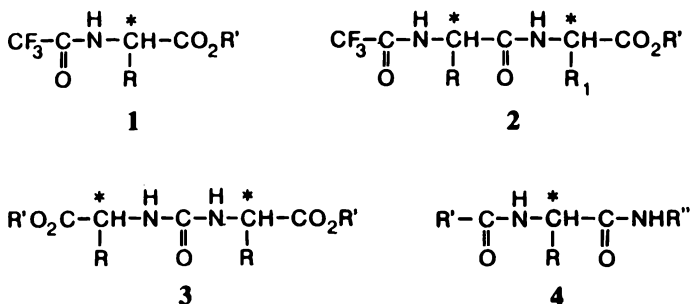


Рис. 6.1. Структуры ХНФ, использовавшихся в первых работах по разделению энантиомеров методом ГХ.

может оказаться достаточно высокой, чтобы позволить проводить разделение на небольших насадочных колонках. Так, Гил-Ав и Файбуш [2] смогли успешно разделить энантиомеры *трет*-бутилового эфира N-ТФА-D,L-аланина на 2-метровой насадочной колонке с дипептидной ХНФ циклогексиловым эфиром N-ТФА-L-валил-L-валина (2, R = R₁ = ±(CH₃)₂CH, R' = цикло-C₆H₁₁).

Первая ХНФ цианамидного типа [*трет*-бутиламид N-лауроил-L-валина (4, R = (CH₃)₂CH, R' = C₁₁H₂₃, R'' = (CH₃)₃C)] была получена в 1971 г. Она обладает большой термической устойчивостью, что позволяет использовать ее при температурах до 130 °C, и высокой энантиоселективностью. На этой ХНФ было проведено разделение ряда производных аминокислот (табл. 6.1).

Таблица 6.1. Энантиоселективность, достигнутая при использовании *трет*-бутиламида N-лауроил-L-валина в хиральной газовой хроматографии ([3] с разрешения автора и Royal Soc. Chem.)^a

Соединение	α(L/D)	Соединение	α(L/D)
Аланин	1,188	Пролин	1,057
Валин	1,170	О-ТФА-серин	1,101
О-ТФА-треонин	1,117	Аспарагиновая кислота	1,078
<i>трет</i> -Лейцин	1,084	Глутаминовая кислота	1,170
Аллоизолейцин	1,186	Метионин	1,215
Изолейцин	1,159	Фенилаланин	1,262
Лейцин	1,280	О-ТФА-тирозин	1,262

^a Капиллярная колонка (0,02 дюйм × 150 фут), температура 130 °C, газ-носитель гелий. Все соединения хроматографированы в виде их N-ТФА-метилвых эфиров.

Проблема получения эффективных ХНФ для разделения энантиомеров методом ГХ достаточно сложна. Во-первых, ХНФ должна иметь необходимые термические свойства: низкую температуру плавления и высокую температуру кипения. Использование три- и более высоких пептидов в качестве пептидных фаз ограничено из-за высоких температур плавления этих соединений. В то же время многие производные самих аминокислот имеют низкую температуру плавления и такое высокое давление пара, что это приводит к сильному вымыванию неподвижной фазы при рабочих температурах колонки. Во-вторых, стереохимическая структура ХНФ должна допускать хиральную дискриминацию, т. е. диастереомерные сольваты, образующиеся при растворении рацемического сорбата в ХНФ, должны различаться по энергии. В-третьих, эффективность колонки, т. е. число теоретических тарелок, должно быть высоким, что предполагает отсутствие ухудшения процессов массопередачи.

Совершенно ясно, что удерживаться на ХНФ, образующих с сорбатом водородные связи, могут лишь относительно полярные сорбаты. Большая часть исследований была выполнена с аминокислотами в виде их *N*-ацильных производных и эфиров. Ниже приводятся основные результаты и выводы, полученные в ходе систематических исследований.

Как правило, увеличение селективности разделения энантиомеров α достигается понижением температуры колонки. Причина этого заключается в различном влиянии температуры на энтальпию ассоциации энантиомеров с неподвижной фазой; это различие уменьшается с ростом температуры (см. разд. 5.3). Отсюда следует, что производные должны быть по возможности более летучими. Однако полярные соединения часто лучше разделяются на энантиомеры, чем неполярные. Это, в частности, было установлено при изучении разделения производных 2-оксикислот, амиды которых показывают большие значения α , чем соответствующие сложные эфиры. Экспериментально также было найдено, что на дипептидных фазах *N*-трифторацильные производные эфиров аминокислот разделяются лучше, чем соответствующие *N*-пентафторпропионильные (*N*-ПФП) или *N*-гептафторбутирильные (*N*-ГФБ) производные.

Природа сложноэфирной группы также играет очень важную роль, однако этот вопрос изучен пока недостаточно. По тем же самым причинам, что были отмечены выше (температура колонки), с увеличением длины алкильной цепи α обычно уменьшается. В то же время для успешного разделения, как уже давно было показано, необходим определенный объем эфирной алкильной группы. Так,

сравнение этильного и изопропильного производных N-ТФА-D,L-аланина на двух различных дипептидных фазах при 110 °С показало, что изопропильное производное даст существенно большее значение α [4]. В соответствии с этими наблюдениями изучение разделения энантиомеров аминокислот с помощью хиральной ГХ было проведено с использованием изопропиловых эфиров N-ТФА-аминокислот.

В процессе изучения некоторых ХНФ типа карбонил-бис(эфир аминокислоты) выяснилось, что этот тип фаз переходит из изотропного в жидкокристаллическое состояние при понижении температуры и что величина α при этом существенно возрастает [5—7].

Исследование хиральных неподвижных фаз для ГХ, образующих водородные связи с сорбатом, проводилось очень интенсивно, и число соответствующих публикаций достаточно велико. Особенно велико число амидных и диамидных фаз, полученных для этой цепи. Исчерпывающее перечисление этих и подобных ХНФ для ГХ и описание их применения даны в прекрасном обзоре Соутера. Несколько фаз подобного типа, синтезированных японскими исследователями [8—11], содержат хиральный аминный фрагмент и демонстрируют широкую область применения. В последнее время в продаже появились капиллярные колонки из кварцевого или обычного стекла с нанесенными неподвижными фазами такого типа.

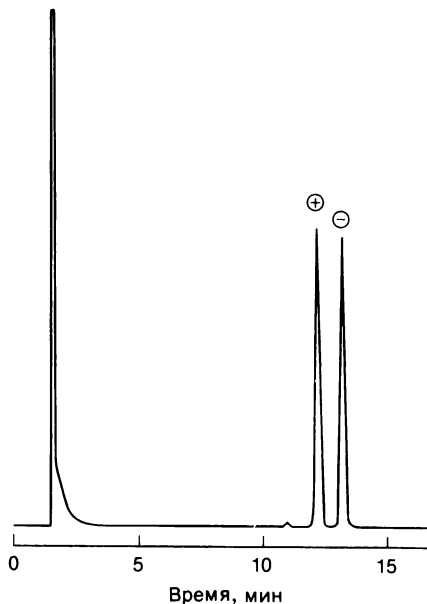
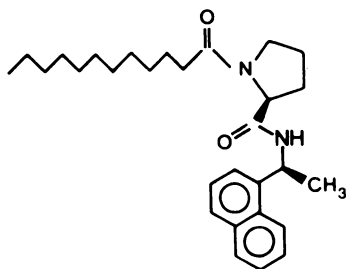


Рис. 6.2. Разделение энантиомеров N-ТФА-1-фенилэтиламина на капиллярной колонке из кварцевого стекла (0,25 мм × 25 м), покрытой (S)-1-(α -нафтил)этиламидом N-лауроил-L-пролина (Sumirax-CC OA 500). Температура 130 °С, гелий (0,8 мл/мин), ПИД (с разрешения Sumimoto Chemical Co.).

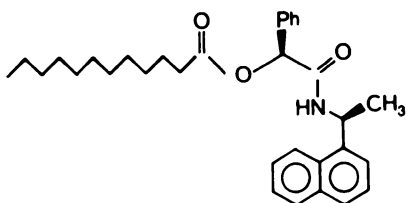
Структура и свойства этих ХНФ указаны ниже. Интересно отметить, что эти же фазы с неполярными элюентами можно применять и в ЖХ.

(S)-1-(α -Нафтил)этиламид N-лауроил-L-пролина (**5**) отличается наиболее высокой термостойкостью, и им, как и (S)-1- α -нафтилэтиламидом O-лауроил-(S)-миндальной кислоты (**6**), можно пользоваться при разделении соединений, подобных N-защищенным эфирам аминокислот, эфирам O-ТФА α -оксикислот, *трет*-бутиламидам карбоновых кислот, сложным эфирам, нитрилам и N-перфторацетиламидам. Разделяющую способность **5** наглядно демонстрирует рис. 6.2.

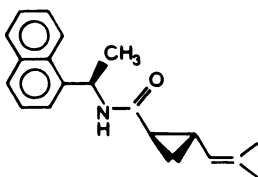
Две другие фазы того же типа в качестве общего элемента содержат (R,R)-*транс*-хризантемовую кислоту: это N-(1R,3R)-*транс*-хризантемоил-(R)-1-(α -нафтил)этиламид (**7**) и (R)-1-(α -нафтил)этил-



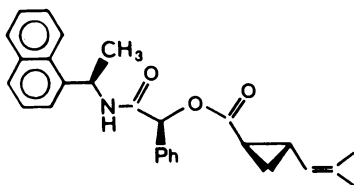
5



6



7



8

амид O-(1R,3R)-*транс*-хризантемоил-(S)-миндальной кислоты (**8**).

Наиболее основательно изучено применение фазы **7**, но обе фазы, по-видимому, наиболее пригодны для разделения различных сложных эфиров. Допустимый температурный интервал при этом сравнительно мал (наивысшая приведенная температура 150 °C, рекомендуемая максимальная температура 110 °C).

6.1.2. ПРИВИТЫЕ ФАЗЫ ПОЛИСИЛОКСАНОВОГО ТИПА

Новый этап развития хиральной ГХ начался в 1977 г., когда впервые ХНФ низкой молекулярной массы диамидного типа (L-валин-*трет*-бутиламид) была через аминогруппу ковалентно закреплена на силиконовой полимерной подложке и таким образом была получена ХНФ с самой высокой на настоящее время термостойкостью [12, 13]. Синтез такой фазы показан на схеме 6.1. Первая стадия ее получения — гидросилилирование аллилцианида метилдихлорсиланом. Последующий гидролиз под действием щелочи приводит к 3-карбоксипропилзамещенному полисилоксану. Далее следует «разбавление» карбоксильных групп путем «уравновешивания» полисилоксана с мономером диметилсилоксана (фактически он существует в виде циклического тримера) и гексаметилдисилоксаном в условиях кислотного катализа. На последней стадии хиральные группы закрепляются на полимерной цепи посредством реакции конденсации с образованием стабильной амидной связи. Экспе-

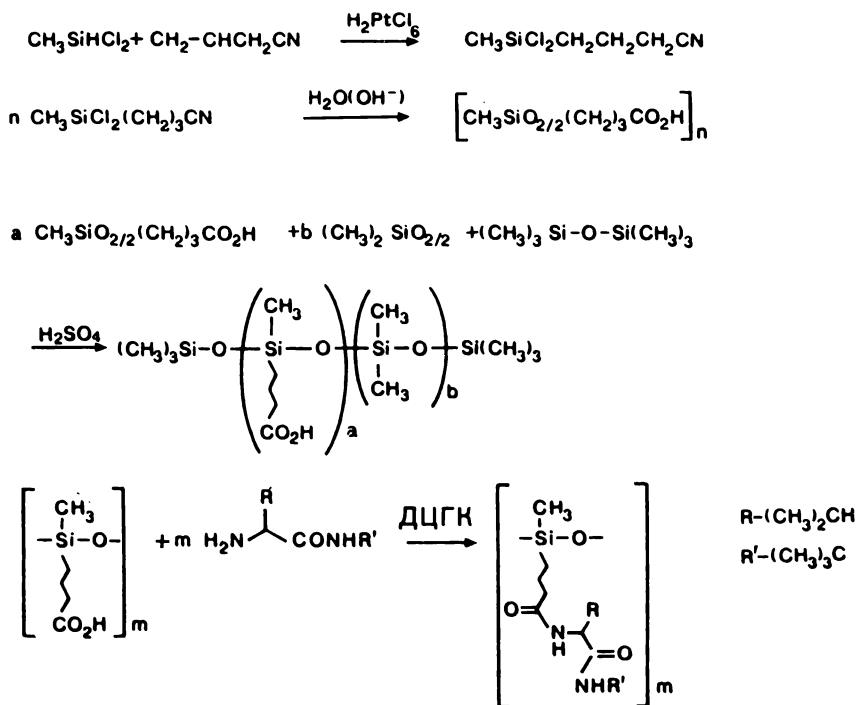


Схема 6.1. Реакции, используемые для получения L-валин-*трет*-бутиламидной фазы, связанной с полисилоксаном.

риментально найдено, что разбавление, т. е. соотношение b/a , должно находиться в пределах 5—7. Основная причина такого выбора — высокая вязкость полимера при меньших соотношениях.

К тем же самым подходам можно прибегнуть и в целях закрепления других хиральных лигандов. И в настоящее время синтезирован ряд различных полисилоксанов с хиральными заместителями. Тем не менее полисилоксан-*L*-валин-*трет*-бутиламид остается наиболее ценной неподвижной фазой. В продаже имеются капиллярные колонки, покрытые этой фазой (торговая марка «Chirasil-Val»).

Разработаны и другие подходы к синтезу хиральных замещенных полисилоксанов [14—15]. Большинство коммерчески доступных полисилоксанов для ГХ содержат цианогруппы, которые легко гидролизовать до карбоксильных групп, пригодных для дальнейшего закрепления хиральных лигандов — *трет*-бутиламид *L*-валина. Такие фазы показывают несколько иную разделяющую способность в сравнении с Chirasil-Val вследствие различия в силиконовых матрицах, обусловленного главным образом наличием фенильных заместителей.

В 1981 г. тот же принцип превращения цианопропилсиликонов в материалы, пригодные для модификации хиральными производными, был использован для введения в структуру последних нескольких новых хиральных лигандов [16—19]. Гидролиз цианогрупп и их восстановление до первичных аминов позволяют проводить модификацию оптически активными кислотами. Одна из наиболее интересных фаз, полученная в ходе таких исследований, содержит *L*-валин-(R)-1-фенилэтиламид, ковалентно связанный с полисилоксаном, и пригодна для разделения широкого круга рацематов, включая О-ТФА-производные углеводов. Реакции, применяемые при дериватизации цианопропилсиликонов по этому методу, показаны на схеме 6.2.

Современные исследования ХНФ сконцентрированы прежде всего на хиральных фазах полисилоксанового типа. Поэтому далее мы рассмотрим механизм хирального распознавания двух оптических антиподов, основанный на образовании различных водородных связей именно на этих фазах.

Как уже упоминалось в предыдущих главах, концепция трехточечного взаимодействия, хотя и без должного экспериментального обоснования, была широко использована для создания моделей хирального распознавания. Так, энантиоселективность, наблюдаемая у первоначально синтезированных фаз в ГХ, была объяснена в предположении трехточечного взаимодействия между анализируемым веществом и хиральным сорбентом [20]. Эта точка зрения бы-

ла позднее признана неправомерной [21, 22] и не соответствующей экспериментальным данным [23, 24]. Этой модели прежде всего противоречит разделение модифицированных очень простых гидроксильных или карбонильных соединений, у которых в образовании водородной связи участвует лишь одна группа [25, 26].

Среди фаз для ГХ, работающих по принципу образования водородной связи, наиболее изучен полисилоксан с привитым *трет*-бутиламидом L-валина (Chirasil-Val). Расчеты показывают, что L-валинамид принимает β -складчатую или, что предпочтительнее, (R)- α -спиральную конформацию. При наличии связи с лигандом энергетическая выгодность конформации зависит также и от лиганда. Поэтому, исходя из экспериментальных результатов и теоретических соображений, авторы [27] полагают, что иммобилизованный в Chirasil-Val хиральный лиганд образует ассоциаты с сорбатом посредством водородных связей или по механизму интеркаляции (рис. 6.3, а), или в результате комплексообразования (рис. 6.3, б), когда полимерная молекула находится в конформации α -спирали. Первый механизм, который, как предполагают, реализуется у производных α -окси- или α -аминокислот, характеризуется взаимодействием двух молекул лиганда с каждым из сорбатов, в результате которого лиганд использует одну акцепторную для водородной связи группу (карбонильная группа валинамида) и две донорные для водородной связи группы (амидная NH-группа). В то же время, согласно второму механизму, концевой лиганд участвует в образовании связи со второй молекулой сорбата.

Очевидно, что такая модель не применима к сорбатам, не имеющим донорных групп. К числу соединений, которые были разделены на Chirasil-Val, относятся диэфиры и дикарбонильные соединения. На Chirasil-Val было осуществлено полное разделение атропизомеров 2,2'-бинафтолдипентафторпропионата, в процессе которого (R)-энантиомер элюируется раньше (S)-энантиомера. Это обусловлено тем, что для образования водородных связей с эфирными карбонильными группами (S)-энантиомера сорбата обеими NH-донорными группами L-валин-*трет*-бутиламида хиральный лиганд должен принять менее выгодную конформацию, чем та, в которой он взаимодействует с (R)-энантиомером эфира (ср. рис. 6.3, б).

6.2. ФАЗЫ НА ОСНОВЕ ХИРАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОВ

Совершенно иной тип ХНФ для капиллярной ГХ был предложен в 1977 г., когда впервые было показано, что для разделения ра-

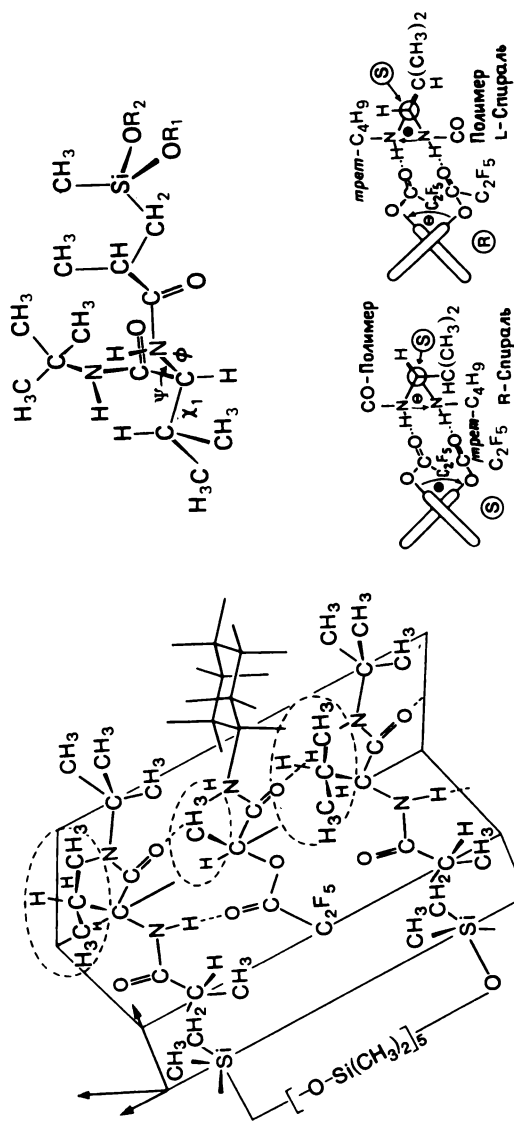


Рис. 6.3. Возможные структуры ассоциатов, образующихся за счет водородных связей между Chiral-Val и различными типами лигандов [27] (с разрешения Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen).

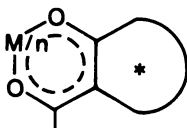


Рис. 6.4. Принципиальная структура комплексов металлов, используемых в качестве ХНФ.

Хиральный комплекс β -дикетон — металл; правовращающая группа представляет собой асимметрический циклический или бициклический элемент.

цемического 3-метилциклопентена можно использовать оптически активный хелат родия(I). Этому новому методу, основанному на координации с ионом металла, было дано название *комплексобразующая газовая хроматография*. Основной тип соединений, применяемых в комплексобразующей ГХ, приведен на рис. 6.4. Хиральный β -дикарбонильный лиганд принадлежит к тому же типу, что и выполняющие роль сдвигающих реагентов в ЯМР (см. разд. 3.1.1.2). При участии двух атомов кислорода он образует комплекс с переходным металлом, который и является энантиоселективным компонентом. Этот комплекс в виде раствора в сквала-

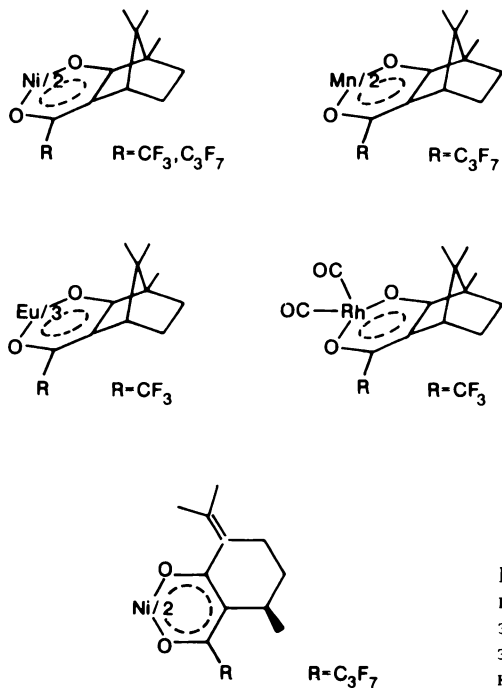


Рис. 6.5. Хиральные комплексы металлов, использованные для разделения энантиомеров методом комплексобразующей ГХ.

не ($C_{30}H_{62}$) и наносится на стенки капиллярных колонок. Удовлетворительная термостойкость и низкая летучесть комплекса позволяют работать на таких колонках в диапазоне температур от $> 20^{\circ}C$ до примерно $100^{\circ}C$. Поскольку энантиоселективный вклад в удерживание сорбата обусловлен электроноакцепторными свойствами металла, этот метод хорошо подходит для разделения относительно неполярных соединений с π - или неподеленными парами электронов, такими как циклические алкены, сложные эфиры, тиоэфиры и кетоны, но в то же время он пригоден для разделения таких соединений, как спирты и азиридины. Хиральные лиганды, входящие в эти комплексы, легко получают из оптически активных природных продуктов, а именно из (+)-(1R)-камфоры и родственного ей (+)-(R)-пулегона. Эти соединения превращают в β -дикарбонильные производные перфторацилированием по α -углеродному атому. Переход к комплексу металла легко осуществляется через натриевую соль [30]. Структура таких хиральных комплексов металлов показана на рис. 6.5.

6.3. ФАЗЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ВКЛЮЧЕНИЯ

В газожидкостной хроматографии, как недавно выяснилось, можно использовать эффект образования комплексов включения, который в свое время привел к появлению химии соединений типа «хозяин—гость» (см. разд. 5.2.3). Хиральным лигандом в данном случае служит циклодекстрин (ЦД), смешанный с полярным растворителем, выполняющим роль своего рода жидкой матрицы. В хиральной ГХ насадочные колонки заполняют цеолитами, покрытыми неподвижной фазой такого типа. Этот метод позволяет достигнуть значительной энантиоселективности при разделении энантиомеров ряда углеводородов. Однако разделение в режиме ГХ на этих колонках должно проводиться при слишком низких температурах ($< 70^{\circ}C$).

В первых сообщениях, описывающих применение такого типа сорбентов в ГХ, указывалось, в частности, что смесь изомерных ксилолов удалось успешно разделить на колонке, в которой роль хиральной фазы выполнял раствор β -ЦД в формамиде [31]. Сравнение активности α -ЦД и β -ЦД в разделении рацемических α - и β -пиненов показало, что только α -ЦД позволяет разделить оптические антиподы [32]. Однако для β -ЦД характерно значительно большее удерживание этих соединений, что свидетельствует об образовании более прочного комплекса β -ЦД—сорбат.

Новые сорбенты подобного типа позволят, по-видимому, до-

биться больших успехов в разделении энантиомеров углеводов с помощью ГХ. Другие аспекты этого метода рассмотрены в разд. 8.2.4.

6.4. ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ ПРЕИМУЩЕСТВА РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ХИРАЛЬНОЙ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Как следует из изложенного выше, методом хиральной ГХ в настоящее время можно проводить разделение самого широкого круга соединений. Общим для всех этих фаз является то, что они наиболее пригодны для разделения соединений, содержащих полярные функциональные группы, подобные амидным, эфирным или спиртовым. По этой и другим причинам различные N-ацилированные эфиры аминокислот были предпочтительным объектом исследований на таких фазах. Однако подобные соединения часто требуют высоких рабочих температур, что вызывает заметное вымывание ХНФ, несмотря на ее очень низкую летучесть. Мы видели, что эту проблему пытались решить путем повышения молекулярной массы лиганда или ковалентного связывания его с нелетучим инертным полимером. Увеличение молекулярной массы достигается или введением длинных углеводородных цепей, или увеличением числа полярных связей. Известная дилемма состоит в том, что в общем случае селективность разделения возрастает с уменьшением температуры [22], так что преимущества, обусловленные возрастанием термостойкости фазы, нейтрализуются уменьшением селективности, вызываемым повышением температуры.

В то же время ХНФ на основе комплексов металлов пригодны для разделения соединений со значительно меньшей полярностью, а следовательно, и большей летучестью. Поскольку способность к координации с атомом металла обнаружена даже у простых алкенов, не говоря уже о других соединениях с электронодонорными орбиталями (простые и сложные эфиры, тиоэфиры, и т. д.), многие соединения можно разделять, не переводя их в какие-либо производные. Это означает, что такие колонки часто могут успешно эксплуатироваться при относительно низких температурах. Как будет показано в дальнейшем, капиллярные колонки с ХНФ такого типа наиболее пригодны для анализа газовой фазы (например, при изучении синтеза хиральных алкенов). Кроме того, они весьма полезны при исследовании различных хиральных ферромонов.

И наконец, новый метод, в котором используется хиральный лиганд, образующий комплекс включения с анализируемым веществом, является единственно возможным при разделении энантиомеров.

ров неполярных насыщенных углеводородов. До сих пор разделение этим методом проводили на обычных насадочных колонках, но, вероятно, с целью повышения разрешения и пиковой емкости можно пользоваться и микрокапиллярными колонками типа SCOT или даже WCOT.

Различные типы ХНФ, а также их свойства и применение указаны в табл. 6.2.

Таблица 6.2. Типы соединений, применяемых в качестве неподвижных фаз в хиральной газовой хроматографии (звездочка означает, что данная фаза или колонка имеется в продаже: см. Приложение)

1. Карбонил-бис-(эфир аминокислоты)		Основной тип исследуемых соединений	Литература
Аминокислота	Использованный эфир		
L-Валин	Метиловый	N-Перфторациламины и аминокислоты	7
	Этиловый	То же	7
	Изопропиловый	— " —	7, 21, 33—39
	<i>трет</i> -Бутиловый	— " —	7
L-Лейцин	Изопропиловый	N-Перфторациламины	21
D-Лейцин	Изопропиловый	То же	6, 7
L-Пролин	Изопропиловый	— " —	34
L-Валин(1-)+глицин(1'-)	Изопропиловый	— " —	37
2. Эфиры N-ацилпептидов (основной тип исследуемых соединений: эфиры N-перфторациламинокислот)			
Пептид	Ацильная группа	Использованный эфир	Литература
L-Валил-L-валин	ТФА	Изопропиловый	20
		Циклогексильовый	22, 35, 40, 41
		<i>о</i> -Карборанил-изопропиловый	42
	Ацетил Лауроил	Изопропиловый	20
		Циклогексильовый	43
L-Валил-L-лейцин	ТФА	Лауроильовый	44
		Циклогексильовый	41, 45
	ПФП	Циклогексильовый	41
	Лауроил	Циклогексильовый	43
L-Лейцил-L-валин	ТФА	Циклогексильовый	43
L-Лейцил-L-лейцин	ТФА	Циклогексильовый	43
L-Норвалил-L-норвалин	ТФА	Циклогексильовый	46—49

2. Эфиры N-ацилпептидов (основной тип исследуемых соединений: эфиры N-перфторацетиламино-кислот)

Пептид	Ацильная группа	Использованный эфир	Литература
L-Норлейцил-L-нор-лейцин	ТФА	Циклогексильный	46
L-Изолейцил-L-изо-лейцин	ТФА	Циклогексильный	49
L-Аланил-L-аланин	ТФА	Циклогексильный	46, 47
L-Фенилаланил-L-лейцин	ТФА	Циклогексильный	50—53
L-Метионил-L-метионин	ТФА	Циклогексильный	54
L- α -Аминобутирил-L-аминобутановая кислота	ТФА	Циклогексильный	46, 49, 55
L-Лейцил-L-лейцил-L-лейцин	ТФА	о-Карбонилпропиловый	42
L-Лейцил-L-лейцил-L-лейцин	ТФА	Циклогексильный	41
L-Валил-L-валил-L-валин	ТФА	Изопропиловый	20

3. Замещенные триазины (основной тип исследуемых соединений: самый различный)

Соединения	Литература
N, N' -[2,4-(6-Этокси-1,3,5,-триазин)диил]бис(L-валил-L-валил-L-валин)изо-пропиловый эфир	56—60
N, N' -[2,4-(6-Этокси-1,3,5,-триазин)диил]бис(L-валил-L-валин)изопропиловый эфир*	56
N, N', N''-[2,4,6-(1,3,5-Триазин)триил]трис(N ^α -лауроил-L-лизин-трет-бутиламид)*	56, 58

4. Метилловые эфиры

Спирт	Кислота	Основной тип исследуемых соединений	Литература
(—)-Ментол	(+)-Винная (дизфир)	Перфторацетиламины и аминокислоты, другие амиды	61
Ментол (рацемат)	(—)-Молочная (дизфир)	То же	61

Продолжение табл. 6.2

5. Замещенные амиды, диамины и родственные соединения

А. Соединения, не связанные с полимерами

1) Амиды N-ациламинокислот

Аминокислота	Ацильная группа	Использованный амид	Литература
L-Валин	Лауроил	Изопропил Циклогексил, циклогептил, циклооктил и др. <i>трет</i> -Бутил	22 3, 22 62—64
	Изобутирил, пивалоил, <i>трет</i> -бутилацетил	Додецил	22
	Капроил	Гексил	53
	Докозаноил	<i>трет</i> -Бутил	12, 64
L-Лейцин	Докозаноил	<i>трет</i> -Бутил	63
	Лауроил	<i>трет</i> -Бутил	62, 63
L-Аланин	Лауроил	<i>трет</i> -Бутил	62, 63
L-Фенилаланин	Лауроил	<i>трет</i> -Бутил	62, 63
L-Фенилглицин	Лауроил	<i>трет</i> -Бутил	62, 63
L-Пролин	Лауроил	(S)- или (R)-1-(α -Нафтил)-этиламид*	9

2) Амиды O-ацилоксикислот

Оксикислота	Ацильная группа	Используемый амид	Литература
(S)-3-Фенилмолочная	БОК	<i>трет</i> -Бутил	17
(S)-Миндальная	Лауроил	(S)- или (R)-1-(α -Нафтил)этиламид*	9
	(1R, 3R)- <i>транс</i> -Хризантемоил	(S)- или (R)-1-(α -Нафтил)этиламид*	11, 65

3) Другие амиды

Ацильная группа	Используемый амид	Литература
Лауроил	(S)- или (R)-1-(α -Нафтил)этиламид	8, 66
	(S)- α -Фенилэтиламид	8
(1R, 3R)- <i>транс</i> -Хризантемоил	(R)-1-(α -Нафтил)этиламид*	10

В. Соединения, связанные с полисилоксановой матрицей (основной тип исследуемых соединений: соединения различных классов)

Фаза	Литература
L-Валин- <i>трет</i> -бутиламид/ полисилоксан (Chirasil-Val)	24, 67—69
L-Валин- <i>трет</i> -бутиламид/ модифицированный OV-225	14
L-Валин- <i>трет</i> -бутиламид/ модифицированный XE-60	80
L-Валин-(S)- или L-валин-(R)- α -фенил-этиламид/модифицированный OV-225 или XE-60	17, 19 81—86
О-БОК-L-Валин-или О-БОК-L-лейцин/модифицированный OV-225	16

6. Комплексы металлов

Лиганд	Металл	Основной тип исследуемых соединений	Литература
(1R)-3-ГФБ-камфолат	Cu	Широкий круг летучих соединений, например спирты, кетоны, сложные и простые эфиры, оксираны, спирокетали	86
	Mn		87, 88
	Ni		30, 89
(1R)-3-ТФА-камфолат	Mn		88
	Ni		90
	Rh(I)(дикарбонильный комплекс)		90

Медные комплексы оснований Шиффа (биядерные)

Лигандные компоненты		Амин	Литература
Альдегид			
Салициловый	(S)-2-Амино-1,1-дифенилпропанол-1		91
	(R)-2-Амино-1, 1-бис(5- <i>трет</i> -бутил-2-октилоксифенил)пропанол-1*		91, 92
	(S)-2-Амино-1,1-бис(5- <i>трет</i> -бутил-2-гептилоксифенил)-3-фенилпропанол-1*		92

Рекомендуемая литература

- Lochmuller C. H., Souter R. W.* Chromatographic Resolution of Enantiomers: Selective Review, *J. Chromatogr.*, **113**, 283 (1975); *Chromatogr. Rev.*, **19**, 283 (1975).
- Lochmuller C. H.* Gas Chromatographic Separation of Enantiomers, *Sep. Purif. Meth.*, **8**, 21 (1979).
- Liu R. H., Ku W. W.* Chiral Stationary Phases for Gas-Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers, *J. Chromatogr.*, **271**, 309 (1983). *Chromatogr. Rev.*, **27**, 309 (1983).
- Schurig V.* Gas Chromatographic Methods, in *Asymmetric Synthesis*, Vol. 1, J. D. Morrison (ed.), Academic Press, New York, 1983.
- Allenmark S.* Recent Advances in Methods of Direct Optical Resolution, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **9**, 1 (1984).
- Koppenhofer B., Bayer E.* Chiral Recognition in Gas Chromatographic Analysis of Enantiomers on Chiral Polysiloxanes, in *The Science of Chromatography*, F. Bruner (ed.), Elsevier, Amsterdam, 1985, p. 1.
- Souter R. W.* Chromatographic Separation of Stereoisomers, CRC Press, Boca Raton, 1985.
- Konig W. A.* The Practice of Enantiomer Separation by Capillary Gas Chromatography, *Hutting Verlag, Heidelberg*, 1987.

Цитируемая литература

1. *Gil-Av E., Feibush B., Charles-Siegler R.* *Tetrahed. Lett.*, 1966, 1009.
2. *Gil-Av E., Feibush B.* *Tetrahed. Lett.*, 1967, 3345.
3. *Feibush B.* *Chem. Commun.*, 1971, 544.
4. *Corbin J. A., Rhoad J. E., Rogers L. B.* *Anal. Chem.*, **43**, 327 (1971).
5. *Lochmuller C. H., Souter R. W.* *Phys. Chem.*, **77**, 3016 (1971).
6. *Lochmuller C. H., Souter R. W.* *J. Chromatogr.*, **87**, 243 (1973).
7. *Lochmuller C. H., Souter R. W.* *J. Chromatogr.*, **88**, 41 (1974).
8. *Oi N., Kitahara N., Inda Y., Doi T. J.* *Chromatogr.*, **213**, 137 (1981).
9. *Oi N., Kitahara N., Inda Y., Doi T. J.* *Chromatogr.*, **237**, 297 (1982).
10. *Oi N., Doi T., Kitahara N., Inda Y. J.* *Chromatogr.*, **239**, 493 (1982).
11. *Oi N., Kitahara H., Doi T.* *J. Chromatogr.*, **254**, 282 (1983).
12. *Frank H., Nicholson G. J., Bayer E.* *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 174 (1977).
13. *Frank H., Nicholson G. J., Bayer E.* *Angew. Chem.*, **90**, 396 (1978), (Int. Ed., 17, 363 (1978)).
14. *Saeed T., Sandra P., Verzele M. J.* *Chromatogr.*, **186**, 611 (1979).
15. *Saeed T., Sandra P., Verzele M. J.* *High Resol. Chromatog. Chromatog. Commun.*, **3**, 35 (1980).
16. *Konig W. A., Benecke I. J.* *Chromatogr.*, **209**, 91 (1981).
17. *Konig W. A., Benecke I., Sievers S. J.* *Chromatogr.*, **217**, 71 (1981).
18. *Konig W. A., Benecke I., Bretting H.* *Angew. Chem.*, **93**, 688 (1981).
19. *Benecke I., Schmidt E., Konig W. A. J.* *High Resol. Chromatog. Chromatog. Commun.*, **4**, 553 (1981).
20. *Feibush B., Gil-Av E.* *Tetrahedron*, **26**, 1361 (1970).
21. *Lochmuller C. H., Harris J. M., Souter R. W. J.* *Chromatogr.*, **71**, 405 (1972).
22. *Beitler U., Feibush B. J.* *Chromatogr.*, **123**, 149 (1976).
23. *Frank H., Nicholson G. J., Bayer E.* *Angew. Chem.*, **90**, 396 (1978), (Int. Ed., 17, 363 (1978)).
24. *Koppenhoffer B., Bayer E.* *Chromatographia*, **19**, 123 (1984).
25. *Koppenhoffer B., Allmendinger H., Nicholson G.* *Angew. Chem.*, **97**, 46 (1985).
26. *Koppenhoffer B., Allmendinger H.* *Chromatographia*, **21**, 503 (1986).
27. *Bayer E. Z. Naturforsch.*, **38b**, 1281 (1983).

28. Schurig V., Gil-Av E. *Isr. J. Chem.*, **15**, 96 (1976—1977).
29. Schurig V., *Angew. Chem.*, **1977**, 89, 419 (Int. Ed. 1977, 16, 110).
30. Schurig V., Burkle W. J. *Amer. Chem. Soc.*, **104**, 7573 (1982).
31. Sybilska D., Koscielski T. *J. Chromatog.*, **261**, 357 (1983).
32. Koscielski T., Sybilska D., Jurczak J. *J. Chromatogr.*, **280**, 131 (1983).
33. Corbin J. A., Rogers L. B. *Anal. Chem.*, **42**, 974 (1970).
34. Souter R. W. *J. Chromatog.*, **114**, 307 (1975).
35. Gorbin J. A., Rogers L. B. *Anal. Chem.*, **42**, 1786 (1970).
36. Feibush B., Gil-Av E. *J. Gas Chromatog.*, **5**, 257 (1967).
37. Lochmuller C. H., Hinshaw J. V., Jr. *J. Chromatog.*, **178**, 411 (1979).
38. Feibush B., Gil-Av E., Tamari T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 11*, 1972, 1197.
39. Rubinstein H., Feibush B., Gil-Av E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 11*, 1973, 2094.
40. Nakaparksin S., Birrell P., Gil-Av E., Oro J. *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 177 (1970).
41. Corbin J. A., Rhoad J. E., Rogers L. B. *Anal. Chem.*, **43**, 327 (1971).
42. Brazell R., Parr W., Andrawes F., Zlatkis A. *Chromatographia*, **9**, 57 (1976).
43. Abe I., Musha S. *J. Chromatog.*, **200**, 195 (1980).
44. Iwase H. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1608 (1975).
45. Parr W., Howard P. *Chromatographia*, **4**, 162 (1971).
46. Parr W., Howard P. *Anal. Chem.*, **45**, 711 (1973).
47. Parr W., Howard P. *J. Chromatog.*, **66**, 141 (1972).
48. Parr W., Howard P. *J. Chromatog.*, **67**, 227 (1972).
49. Howard P., Parr W. *Chromatographia*, **7**, 283 (1974).
50. Parr W., Vang C., Bayer E., Gil-Av E. *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 591 (1970).
51. Parr W., Yang C., Pleterski J., Bayer E. *J. Chromatog.*, **50**, 510 (1970).
52. Konig W., Parr W., Lichtenstein H. A., Bayer E., Oro J. *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 183 (1970).
53. Grohmann K., Parr W. *Chromatographia*, **5**, 18 (1972).
54. Andrawes F., Brazell R., Parr W., Zlatkis A. *J. Chromatog.*, **112**, 197 (1975).
55. Parr W., Howard P. *J. J. Chromatog.*, **71**, 193 (1972).
56. Oi N., Doi T., Kitahara H., Inda Y. *J. Chromatog.*, **208**, 404 (1981).
57. Oi N., Horiba M., Kitahara H. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2403 (1979).
58. Oi N., Horiba M., Kitahara H. *J. Chromatog.*, **202**, 299 (1980).
59. Oi N., Horiba M., Kitahara H. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1509 (1981).
60. Horiba M., Kida S., Yamamoto S., Oi N. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 281 (1982).
61. Oi N., Kitahara H., Doi T. *J. Chromatog.*, **207**, 252 (1981).
62. Chang S.-C., Charles R., Gil-Av E. *J. Chromatog.*, **235**, 87 (1982).
63. Chang S.-C., Charles R., Gil-Av E. *J. Chromatog.*, **238**, 29 (1982).
64. Charles R., Beittler U., Feibush B., Gil-Av E. *J. Chromatog.*, **112**, 121 (1975).
65. Oi N., Takai R., Kitahara H. *J. Chromatogr.*, **256**, 154 (1983).
66. Weinstein S., Feibush B., Gil-Av E. *J. Chromatog.*, **126**, 97 (1976).
67. Frank H., Rettenmeier A., Weicker H., Nicholson G. J., Bayer E. *Anal. Chem.*, **54**, 715 (1982).
68. Frank H., Nicholson G. J., Bauer E. *J. Chromatog.*, **146**, 197 (1978).
69. Leavitt A. L., Sherman W. R. *Methods Enzymol.*, **89**, 3 (1982).
70. Bailey E., Farmer P. B., Lamb J. H. *J. Chromatog.*, **200**, 145 (1980).
71. Frank H., Rettenmeier A., Weicker H., Nicholson G. J., Bayer E. *Clin. Chim. Acta*, **105**, 201 (1980).
72. Nicholson G. J., Frank H., Bayer E. *J. High Resol. Chromatogr. Chromatog. Commun.*, **2**, 411 (1979).
73. Chinghai W., Frank H., Guanghua W., Liangmo Z., Bayer E., Peichang E. *J. Chromatog.*, **262**, 352 (1983).
74. Frank H., Gerhardt J., Nicholson G. J., Bayer E. *J. Chromatog.*, **270**, 159 (1983).

75. *McErlane K. M., Pillai G. J. Chromatog., 274, 129 (1983).*
76. *Haegeler K. D., Schoun J., Alken R. G., Huebert H. D. J. Chromatog., 274, 103 (1983).*
77. *Liu J. H., Ku W. W. Anal. Chem., 53, 2180 (1981).*
78. *Abe I., Kuramoto S., Musha S., J. High Resol. Chromatog. Chromatog. Commun., 6, 366 (1983).*
79. *Frank H., Woiwode W., Nicholson G., Bayer E. Leibigs Ann. Chem., 1981, 354.*
80. *Abe I., Kuramoto S., Musha S., J. Chromatog., 258, (1983).*
81. *Konig W. A., Benecke I. J. Chromatog., 269, 19 (1983).*
82. *Konig W. A., Benecke I., Ernst K. J. Chromatog., 253, 267 (1982).*
83. *Konig W. A., Benecke I., Sievers S. J. Chromatog., 238, 427 (1982).*
84. *Konig W. A., Franke W., Benecke I. J. Chromatog., 239, 227 (1982).*
85. *Konig W. A., Benecke I., Bretting H. Angew. Chem., 93, 688 (1981) (Int. Ed., 20, 693 (1981)).*
86. *Weber R., Schurig V. Naturwiss., 68, 330 (1981).*
87. *Weber R., Hintzer K., Schurig V. Naturwiss., 67, 453 (1980).*
88. *Schurig V., Weber R. J. Chromatog., 217, 51 (1981).*
89. *Schurig V., Burkle W., Zlatkis A., Poole C. Naturwiss., 66, 423 (1979).*
90. *Schurig V. Chromatographia, 13, 263 (1980).*
91. *Oi N., Shiba K., Tani T., Kitahara H., Doi T. J. Chromatog., 211, 274 (1981).*
92. *Oi N., Horiba M., Kitahara H., Doi T., Tani T., Sakakibara T. J. Chromatog., 202, 305 (1980).*

7. ХИРАЛЬНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В сравнении с совершенно очевидной концепцией хиральной ГХ, где разделение энантиомеров осуществляется в результате взаимодействия с хиральной неподвижной фазой, концепция хиральной ЖХ является более сложной. Здесь возможны две принципиально различные ситуации в зависимости от того, обусловлена ли энантиодифференциация хиральным распознаванием неподвижной фазы или же хиральным компонентом подвижной фазы, образующим диастереомерные комплексы непосредственно в процессе хроматографического разделения. Экспериментально легко различить два варианта, в одном из которых используются хиральная колонка (т. е. колонка с хиральной неподвижной фазой) и ахиральная подвижная фаза, в другом — ахиральная колонка и хиральная подвижная фаза. В последнем случае, однако, реальный механизм разделения зависит от относительного сродства хиральных компонентов элюента к неподвижной фазе и разделяемому соединению соответственно. В одном из предельных вариантов хиральные компоненты подвижной фазы могут сильно сорбироваться на неподвижной фазе, превращая ее тем самым в ХНФ, и процесс разделения может рассматриваться как хиральное распознавание ХНФ, полученной таким образом. В другом предельном варианте хиральные компоненты элюента имеют значительно меньшее сродство к неподвижной фазе, нежели к разделяемому соединению. Это означает, что в подвижной фазе образуются диастереомерные комплексы и их разделение осуществляется как разделение диастереомеров обычной ЖХ. Между этими двумя предельными случаями возможен самый широкий спектр промежуточных ситуаций, зависящих от того, где образуется диастереомерный комплекс — на поверхности подвижной фазы, или же в подвижной фазе, или там и там.

Хиральные сорбенты для ЖХ можно классифицировать в соответствии с их общим структурным типом. Некоторые из них построены на основе синтетических или природных полимеров и полностью хиральны по своей природе. Другие содержат низкомолеку-

Таблица 7.1. Классификация основных методов непосредственного разделения оптических изомеров с помощью ЖХ

Вид хирального селектора	Основной принцип разделения	Емкость	Эффективность колонки
Неподвижная фаза	Полностью хиральные полимерные неподвижные фазы, природные (полисахариды и их производные, белки) или синтетические (синтетические полимеры с хиральными заместителями или с встроенными хиральными пустотами)	От аналитической до препаративной	От низкой до средней в зависимости от того, используется ли подложка
Неподвижная фаза	Связанный с матрицей синтетический хиральный лиганд	От аналитической до препаративной	От средней до сравнительно высокой
Подвижная фаза	Введение хиральных добавок в подвижную фазу	Аналитическая	От средней до сравнительно высокой

лярный хиральный лиганд, связанный с жесткой несжимаемой матрицей, обычно силикагелем. Имеются также сорбенты, состоящие из полимера, закрепленного на силикагеле с целью улучшения селективности и эффективности разделения.

Примерная классификация различных видов хиральной ЖХ представлена в табл. 7.1. Эта классификация составлена в основном по типам хроматографических сорбентов без учета процессов сорбции, происходящих с их участием, поскольку последние часто достаточно сложны и трудно поддаются расшифровке.

7.1. ХИРАЛЬНЫЕ НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ

Одними из первых в качестве сорбентов для разделения оптических изомеров были испытаны природные соединения, и в частности сахара, поскольку уже давно известно, что эти соединения хиральны, и поскольку они относительно доступны. Еще в 1938 г. было осуществлено частичное разделение рацемических производных камфоры на колонке с лактозой [1]. Лактоза еще в течение не-

скольких лет служила материалом для упаковки колонок, и на ней впервые удалось почти полностью разделить энантиомеры. (В 1944 г. было опубликовано сообщение о том, что основание Трегера разделено на колонке с лактозой длиной 0,9 м [2].) Разделяющая способность полисахаридов, в частности целлюлозы, была впервые обнаружена при попытке разделить рацемические аминокислоты методом бумажной хроматографии [3—5]. При этом выяснилось, что эти соединения в некоторых случаях дают два пятна на бумажной хроматограмме. Далглиш развил свою теорию трехточечного взаимодействия в 1952 г. на базе данных о бумажной хроматографии рацемических аминокислот [6]. Известны и другие ранние работы по непосредственному разделению энантиомеров аминокислот посредством бумажной хроматографии [7] и тонкослойной хроматографии на целлюлозе (ТСХ) [8]. Все это способствовало использованию целлюлозы и ее производных, а также крахмала и циклодекстринов в хиральной ЖХ. В настоящее время в качестве потенциальных хиральных сорбентов изучается ряд природных полисахаридов.

Принципы применения хиральных полимеров были осуществлены в различных вариантах со множеством различных типов полностью синтетических полимеров, и результаты этих исследований представляются весьма обнадеживающими.

Более того, энантиоселективность белков, обнаруженная в начале при изучении равновесий в растворах (см. обзоры [9, 10]), также была успешно применена в аналитической хиральной ЖХ.

7.1.1. ПОЛИСАХАРИДЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ

7.1.1.1. НЕМОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ

A. Целлюлоза

Этот линейный полисахарид, поли- β -D-1,4-глюкозид (рис. 7.1, *a*), образует очень длинные цепи, содержащие по меньшей мере 1500 остатков (+)-D-глюкозы в каждой молекуле. Молекулярная масса целлюлозы находится в пределах от $2,5 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^6$ и более. В целлюлозных волокнах эти длинные молекулы сгруппированы в параллельные пучки и удерживаются вместе посредством многочисленных водородных связей, образующихся между гидроксильными группами. В природной целлюлозе имеются, кроме того, частично кристаллические области. Эти области не восстанавливаются при переосаждении целлюлозы из раствора. Как следует из рис. 7.1, *a*, повторяющийся фрагмент (+)-D-глюкозы содержит пять хиральных

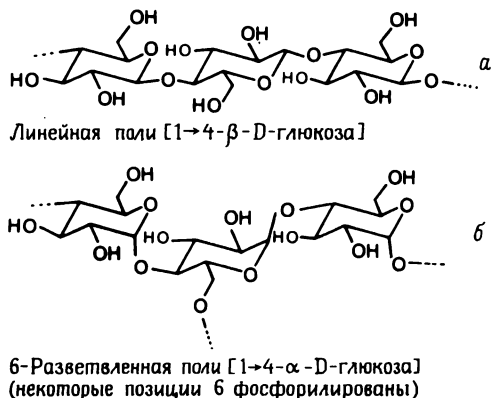


Рис. 7.1. Химическая структура целлюлозы (а) и аминопектина (б) — основных компонентов крахмала.

центров и три гидроксильные группы. Все заместители в кольце находятся в экваториальном положении.

Установлено, что частичный гидролиз природной целлюлозы разбавленными минеральными кислотами приводит к материалу с высокой степенью кристалличности, поскольку гидролитическое расщепление происходит преимущественно в аморфных участках. Такой материал содержит примерно 200 остатков глюкозы на полимерную цепь, и его обычно называют кристаллической целлюлозой [11]. Некоторые фирмы выпускают ее под названием авицел (Avicel).

Хотя в последнее время основное внимание уделяется производным целлюлозы, очень хорошие результаты получены также при разделении на немодифицированной целлюлозе, и о них следует упомянуть особо. Все без исключения соединения, которые удалось успешно разделить на немодифицированной целлюлозе, являются высокополярными и имеют многочисленные группы, способные к образованию водородных связей. Некоторые типичные результаты таких разделений суммированы в табл. 7.2.

Таблица 7.2. Примеры оптических разделений, выполненных с помощью жидкостной хроматографии на целлюлозе

Тип соединения	Вид ЖХ	Литература
Аминокислоты и их производные	Бумажная	3—5, 7, 12
	Тонкослойная	8, 13, 14
	Колоночная	15—17
Диаминокарбоновые кислоты	Колоночная	18
Синтетические алкалоиды	Колоночная	19, 20
Катехины	Колоночная	21

Относительно недавно было обнаружено [22], что обработка целлюлозы разбавленной щелочью вызывает потерю разделяющих свойств вследствие превращения нативной метастабильной формы в реорганизованную и стабильную аморфную форму.

Б. Крахмал

Другим широко распространенным полисахаридом, также построенным из остатков (+)-D-глюкозы, является крахмал. Он имеет более сложную структуру, чем целлюлоза, и содержит примерно 20% амилозы и 80% амилопектина, последний является нерастворимой фракцией крахмала. Амилопектин и амилоза состоят преимущественно из остатков (+)-D-глюкозы, связанных α -гликозидной связью. Но в то время как амилоза — это линейный полимер, амилопектин вследствие C_1-C_6 -связывания является разветвленным (рис. 7.1, б).

В зависимости от исходного материала частицы крахмала могут иметь различные размеры. Картофельный крахмал является относительно грубым (60—100 мкм), и, как выяснилось, именно он наиболее предпочтителен для колоночной хроматографии. Тем не менее, несмотря на доступность и такое важное свойство, как отсутствие набухания в водных средах (что обеспечивает хорошее протекание элюента через колонку), он получил лишь очень ограниченное распространение.

Как и целлюлоза, крахмал наиболее пригоден для разделения

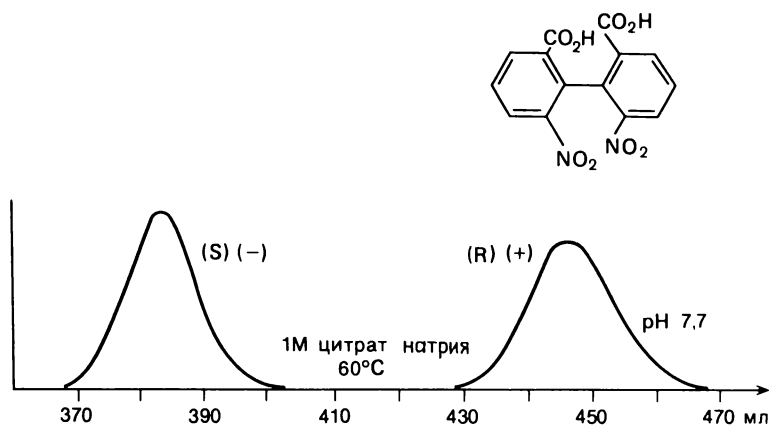


Рис. 7.2. Разделение атропиоизомеров на колонке с крахмалом [25] (с разрешения изд-ва).

полярных ароматических соединений. Особенно хорошо освещено его использование для разделения атропоизомеров, содержащих полярные заместители [23—27]. Эти разделения наглядно демонстрируют влияние природы подвижной фазы и чрезвычайно большое влияние ионной силы. На рис. 7.2 показано разделение рацемата 2,2'-динитродифеновой кислоты на колонке, заполненной крахмалом, при элюировании 1М цитратным буфером с рН 7,7 при 60°C. Наблюдаемая селективность разделения вполне удовлетворительна, но эффективность колонки очень умеренная.

В. Циклодекстрины

В 1908 г. Шардингером [29] были открыты новые кристаллические сахара — так называемые декстрины, которые образуются при разрушении крахмала под действием микроорганизмов *Bacillus pasteurii*. Эти соединения являются обычными β -1,4- α -гликозидами, циклизированными в кольца из 6—12 остатков. Самые малые по размеру циклодекстрины (6—8 остатков), получившие название α -, β - и γ -циклодекстрины (ЦД) соответственно, образуют комплексы включения с различными соединениями подходящего размера. Диаметр кольца β -ЦД равен 8 Å, а его объем составляет примерно 350 Å³. Стабильность комплекса в значительной степени зависит от гидрофобности и стерической природы «гостя». Это делает ЦД, и особенно легкодоступный β -ЦД, весьма удобными для использования в хиральной ЖХ.

Вначале циклодекстрины применяли в качестве добавок в элюент в ТСХ [30—32]. Этот прием дал хорошие результаты и в колоночном варианте, и мы позднее (разд. 7.3) на нем остановимся. Попытки применить сшитые циклодекстриновые гели в хроматографических целях [36—37] предпринимались уже давно, а относительно недавно авторы работ [37, 38] попытались иммобилизовать ЦД на твердом носителе. После того как метод связывания был усовершенствован, хроматографисты получили возможность работать с высокоэффективными колонками с β -ЦД, ковалентно-связанным с силикагелем [39, 40].

Поскольку образование комплексов включения с ЦД в водных системах связано в основном с гидрофобными взаимодействиями, вполне логично, что разделение на колонках с ЦД осуществляется главным образом в режиме обращенно-фазовой хроматографии. Соответственно и элюентами в данном методе являются те же растворители, что и в обычной обращенно-фазовой хроматографии. Чаще всего это — метанол/вода или ацетонитрил/вода. Следова-

тельно, для контроля pH и его влияния на удерживание заряженных соединений можно пользоваться буферными растворами.

Довольно специфический механизм взаимодействия сорбата с ХНФ в случае связанных ЦД заслуживает особого внимания. Образующиеся комплексы включения представляют не только теоретический интерес. Это область химии соединений типа «хозяин — гость», и она важна для лучшего понимания роли образующихся молекулярных комплексов в биологических системах.

В водных растворах циклодекстрины обычно имеют конформацию своего рода усеченного конуса (рис. 7.3) с гидрофобной внутренней поверхностью. Гидрофобные молекулы, подобные бензолу или гексану, способные входить и выходить из полости, обратимо сорбируются на такой поверхности. Удерживание гидрофобных сорбатов в большой степени зависит от эффективности контакта с внутренней поверхностью полости. Подобным же образом энантиоселективность связывают с хиральной структурой при входе в полость, образованной расположенными здесь гидроксильными группами в положениях 2 и 3 глюкозидных остатков. Если сорбат имеет подходящий размер, обеспечивающий хороший контакт с внутренней поверхностью и, следовательно, ограничивающий подвижность молекулы, различие во взаимодействии заместителей у двух энантиомеров с хиральной структурой при входе в хиральную полость может вызвать появление различия как в константах комплексообразования, так и в величинах хроматографического фактора удерживания k' .

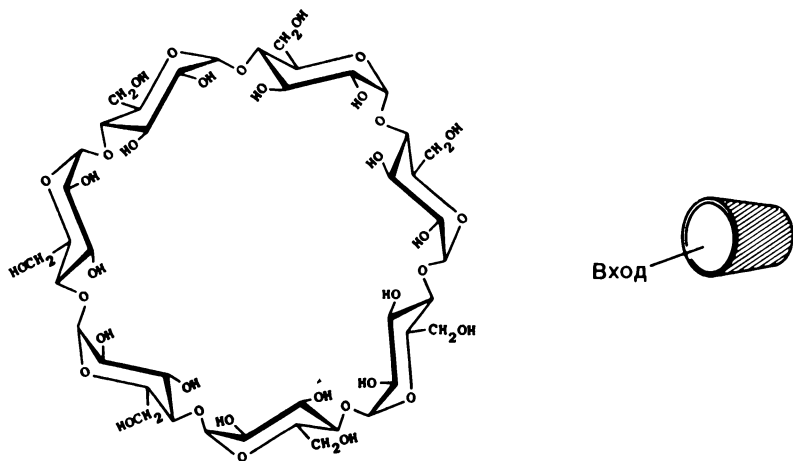


Рис. 7.3. Химическая структура β -циклодекстрина и его предполагаемая конформация в водном растворе.

Большое влияние на энантиоселективность оказывает состав подвижной фазы. В общем случае и k' и α уменьшаются с увеличением содержания органического модификатора в элюенте. В большинстве случаев метанол как модификатор приводит к меньшему снижению значения α , чем ацетонитрил. Удерживание на колонках с ЦД заметно зависит и от температуры, быстро снижаясь до нуля в пределах от 60 до 80°C.

7.1.1.2. ПРОИЗВОДНЫЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

А. Триацетилцеллюлоза

В 1966 г. Люттрингхаус и сотр. [41, 42] обнаружили, что частично ацетилированная целлюлоза (описанная как 2,5-ацетат) в сочетании с этанолом в качестве элюента может использоваться при разделении оптических изомеров методом колоночной хроматографии. Несколько лет спустя другая группа немецких исследователей тщательно изучила гетерогенное ацетилирование природной (микрористаллической) целлюлозы и нашла, что триацетат можно получить, почти полностью сохранив микрористаллическую структуру и прекрасные разделяющие свойства исходной целлюлозы [43]. Они отметили, что микрористаллическость очень важна для проявления энантиоселективных свойств, поскольку они практически полностью утрачивались после растворения и осаждения. Эти эксперименты достаточно убедительно показали метастабильность кристаллической нативной целлюлозы, поскольку изменения, вызываемые переосаждением, являются необратимыми. В результате был сделан вывод, что удерживание на микрористаллической триацетилцеллюлозе (МТАЦ) вызывается включением сорбата в молекулярные пустоты в хиральной матрице. Соответственно данный вид хроматографии получил название *хроматографии комплексов включения* [44, 45].

Вследствие низкой стоимости и доступности микрористаллической целлюлозы (авицел), наличия хорошо разработанного метода ее ацетилирования и ряда важных особенностей МТАЦ в последние десятилетия проводилось ее интенсивное исследование. Этим дешевым материалом можно заполнять большие колонки и разделять на них в препаративном режиме значительные количества вещества. Типичный пример разделения на МТАЦ показан на рис. 7.4.

Перед упаковкой колонки МТАЦ необходимо дать набухнуть в кипящем этаноле. Этанол (95%) является хорошей средой для набухания и не растворяет МТАЦ.

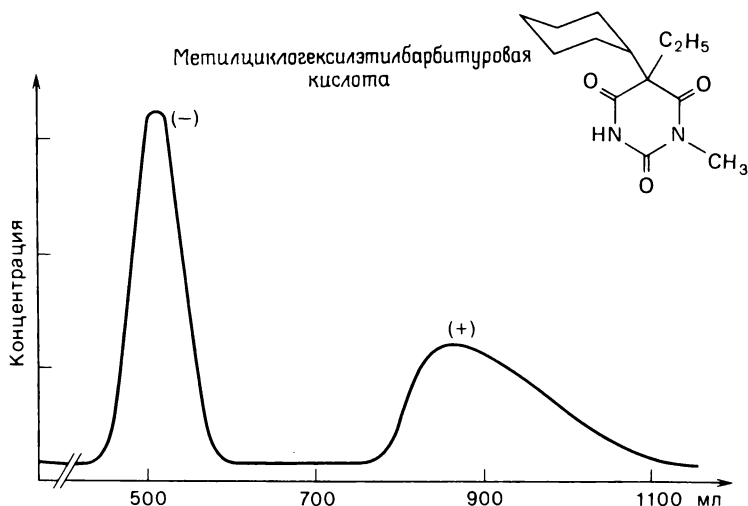


Рис. 7.4. Разделение на энантиомеры 205 мг (\pm)-метилциклогексилэтилбарбитуровой кислоты на колонке с 210 г МТАЦ (колонка $85 \times 2,5$ см, 96%-ный этанол, скорость потока 50 мл/ч) [63] (с разрешения Marcel Dekker, Inc.).

Подтверждением тому, что сорбат удерживается на МТАЦ по механизму образования комплексов включения, служит различное хроматографическое поведение бензола и мезитилена (1,3,5-триметилбензол) на данном сорбенте. Первое из этих соединений удерживается намного дольше благодаря лучшему прониканию в поры. 1,3,5-Три-*трет*-бутилбензол полностью исключается из пор и поэтому используется для определения свободного объема колонки [46].

Еще одним доказательством механизма образования комплексов включения является возможность разделения практически совершенно неполярных лишенных функциональных групп сорбатов. Так, рацемический *транс*-1,2-дифенилциклопропан можно легко разделить на антиподы на МТАЦ [47]. На сегодняшний день описано разделение на МТАЦ большого числа рацематов структурно совершенно различных соединений; многие из разделений выполнены в препаративном или полупрепаративном масштабе. Этот вопрос будет рассмотрен в гл. 9.

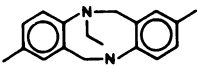

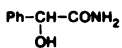

Основной недостаток МТАЦ — ее сжимаемость и относительно большой, нерегулярный и негомогенный размер частиц. Это означает, что в препаративных колонках допускается только очень низкая линейная скорость потока (см. условия, приведенные на

рис. 7.4). Последнюю проблему можно отчасти решить, размалывая и тщательно просеивая материал. Однако, поскольку МТАЦ «работает» в набухшем состоянии, повышение устойчивости к сжатию представляет более сложную проблему.

Подробнейшее исследование влияния надмолекулярной структуры триацетилцеллюлозы на хроматографическое разделение рацематов нескольких соединений, выполненное Франкоттом и др. [48], подтвердило первоначальную идею Хессе и Хагеля [43—45], что включение низкомолекулярных хиральных молекул в специфические пространственные образования глюкозидных остатков полисахаридной цепи является принципиально важным для процесса хиральной дискриминации.

В ходе экспериментов по нанесению МТАЦ на частицы силикагеля японские исследователи обнаружили [49, 50], что, хотя растворенный и осажденный полимер практически полностью теряет свою кристалличность, полученный новый материал еще сохраняет некоторую разделяющую способность. Это иллюстрирует результаты, представленные в табл. 7.3. Как и ожидалось, все найденные значения k' существенно ниже, чем для МТАЦ, особенно для бензола. Величины α также уменьшаются, и наблюдается обратный порядок выхода энантиомеров. Однако эффективность колонки значительно выше, что часто более чем компенсирует снижение α .

Таблица 7.3. Сравнение микрокристаллической (I) и пересаженной (II) триацетилцеллюлозы в оптическом разделении в одинаковых условиях [227] (с разрешения изд-ва)

Соединение	Сорбент	k'_1	k'_2	α
	I	2,61(—)	5,36(+)	2,05
	II	0,59(+)	0,91(—)	1,53
	I	7,82(+)	11,3(—)	1,45
	II	0,94(—)	1,23(+)	1,31
	I	2,08	3,08	1,48
	II		0,80	1,00
	I		10,3	
	II		0,46	

^a Колонка 250 × 4,6 мм, элюент—этанол. Знак отвечает оптическому вращению элюируемого энантиомера.

Этот новый материал позволяет использовать кроме этанола и другие растворители и допускает более высокую скорость подачи элюента, а следовательно, и проведение быстрых хроматографических разделений.

Механизм удерживания сорбата этой ХНФ очень сложен и до конца не выяснен. На разделение, как было показано, сильное влияние оказывают очень многие факторы, например средняя молекулярная масса полимера, молекулярно-массовое распределение, природа растворителя, использованного для нанесения полимера на подложку, и природа самой подложки [51]. Тем не менее вполне очевидно значительное улучшение разделения вследствие применения жесткой матрицы и широкого выбора подвижных фаз. Это, в частности, демонстрирует рис. 7.5, на котором приведены хроматограммы разделения рацемического оксида *транс*-стильбена, полученные в четырех различных условиях. Влияние силикагелевой подложки на эффективность колонки, а также влияние подвижной фазы на α достаточно очевидно. Степень кристалличности МТАЦ,

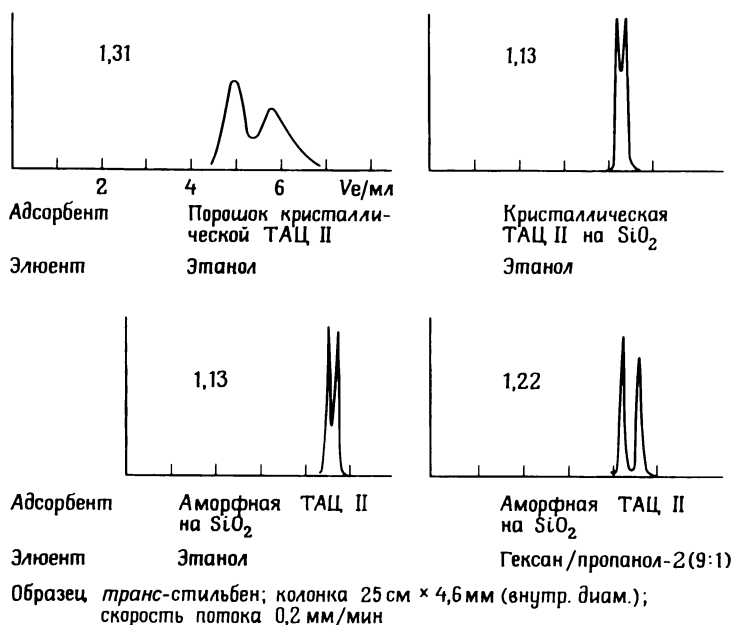


Рис. 7.5. Разделение энантимеров рацемического *транс*-стильбена на двух различных типах переосажденной МТАЦ в различных условиях [51] (с разрешения Marcel Dekker, Inc.).

полученной осаждением, устанавливалась методом порошковой рентгенографии.

Результаты этих исследований показали, что микрокристалличность МТАЦ не является абсолютным требованием для эффективного хирального распознавания, что способствовало возрождению интереса к использованию полимеров на основе полисахаридов для разделения оптических изомеров; особенно интенсивно этот вопрос начал изучаться в Японии. В настоящее время активно исследуются различные производные целлюлозы и других полисахаридов.

Б. Другие производные целлюлозы

Имеются четыре основные группы производных целлюлозы, которые легко можно получить путем модификации ее свободных гидроксильных групп, а именно: органические сложные эфиры, нитраты, карбаматы (получаемые реакцией с изоцианатами) и простые эфиры. Наиболее полезными оказались карбаматы и простые эфиры. В табл. 7.4 показаны изученные производные вместе с величинами α для некоторых разделенных соединений. Отметим, что порядок элюирования энантиомеров на ТАЦ является обратным в сравнении с порядком их элюирования на трибензоате целлюлозы (ТБЦ).

Совершенно понятно, что лучшие разделяющие свойства сложных эфиров и карбаматов связаны с наличием полярной карбонильной группы, которая вызывает увеличение удерживания полярных сорбатов. Исследования величин k' для серии соединений с возрастающей полярностью на колонке с ТБЦ и колонке с трибензилцеллюлозой дали подтверждающие результаты. Если рассчитать отношение величин k' (k' для колонки с ТБЦ в знаменателе) для такой серии соединений, то это отношение < 2 для насыщенных и хлорированных углеводородов, ~ 2 для ароматических углеводородов с неполярными заместителями и > 3 для амидов, спиртов, лактонов, сульфоксидов и алифатических нитросоединений [52].

Ценным свойством ХНФ на основе производных целлюлозы является их способность разделять энантиомеры хиральных алифатических соединений. Ароматический заместитель очень часто улучшает разделение, но его присутствие нельзя рассматривать как необходимое. В табл. 7.5 приведены неароматические соединения, разделенные на колонках, содержащих производные целлюлозы, и соответствующие значения α .

И в заключение рассмотрим кратко разделительные свойства пяти наиболее употребляемых ХНФ на основе целлюлозы [53].

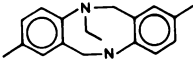

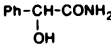
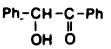
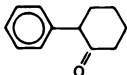
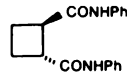
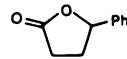
Триацетат пригоден для разделения различных рацемических соединений, особенно полезен для субстратов с атомом фосфора в качестве хирального центра. В большинстве случаев селективность довольно низкая.

Трибензоат используется для разделения соединений, содержащих карбонильную группу по соседству с асимметрическим центром.

Трифенилкарбамат используется для полярных рацемических соединений. Чувствителен к молекулярной геометрии субстратов.

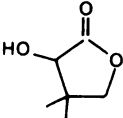
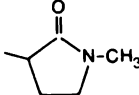

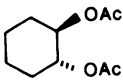
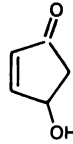
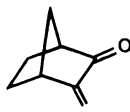
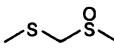
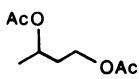
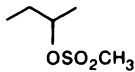
Трибензиловый эфир эффективен для разделения в протонных растворителях в качестве подвижной фазы.

Таблица 7.4. Величины селективности (α), наблюдаемые при разделении энантиомеров на различных производных целлюлозы^a [227] (с разрешения изд-ва)

Соединение	Заместитель в углеводном фрагменте					
	COCH ₃	NO ₂	COPh	CH ₂ Ph	CONHPh	COCH=CHPh
	1,31(+)	1,33(+)	1,0	1,34(+)	1,32(+)	2,82(+)
	1,22(—)	1,61(—)	1,47(+)	1,0	1,32(+)	1,15(+)
	1,08	1,10	1,0	1,0	1,0	1,0
	1,05(—)	1,0 (—)	1,12(+)	1,0	1,0(+)	1,08(—)
	1,07(+)	1,14(+)	1,47(—)	1,0	1,14(—)	1,26(—)
	1,13(—)	1,22(—)	2,06(+)	1,0	1,25(+)	1,52(—)
	1,39(+)		1,1			1,07(—)

^a Колонка 250×4,6 мм. Производные целлюлозы нанесены (20—22%) на лихросорб Si-1000. Не все величины α получены в идентичных условиях. Знак отвечает оптическому вращению энантиомера, элюируемого первым.

Таблица 7.5. Различные неароматические соединения, разделенные на колонках с производными целлюлозы^a [227] (с разрешения изд-ва)

Соединение	α (на ТБЦ)	Соединение	α (на ТБЦ)
	1,22		1,21
	1,31		1,44
	1,23		1,41
	1,61		1,80
	1,21		

^a Условия разделения те же, что и указанные в табл. 1. Порядок элюирования не установлен.

Трициннамат применяется для разделения различных ароматических соединений и барбитуратов. Требуется длительного разделения.

Все эти фазы, нанесенные на силикагелевую матрицу, производятся и продаются фирмой Daicel Chem. Co. (см. Приложение).

В. Производные других полисахаридов

Синтезированы также производные ряда других полисахаридов (кроме целлюлозы), многие из которых, как выяснилось, обладают интересными разделительными свойствами. Из числа полисахаридов, приведенных на схеме 7.1, наименее обнадеживающим оказал-

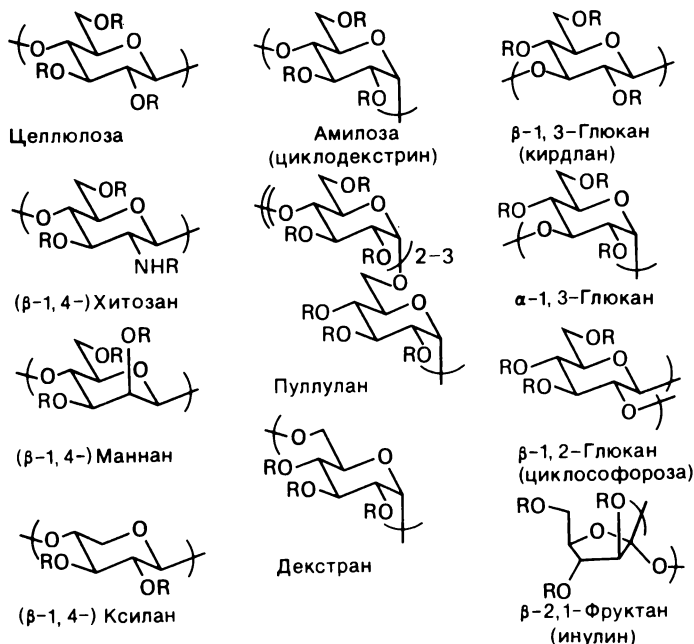
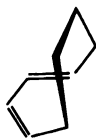


Схема 7.1. Полисахариды, используемые в виде эфиров или фенолкарбаматов для получения новых ХНФ.

ся пуллулан, поскольку на его бензоате не удалось разделить ни одно из соединений. Этот факт был воспринят как указание на важность определенной структурной регулярности полисахарида. Пуллулан имеет связь 1–6, случайным образом распределенную среди трех-четырех связей α-1→4. Сейчас показано, что многие легкодоступные производные полисахаридов могут быть использованы в хиральной ЖХ. Недавно была исследована серия фенолкарбаматных производных различных углеводных полимеров. [54]. На многих из этих новых ХНФ было достигнуто лучшее разделение некоторых рацематов, чем на соответствующих производных целлюлозы. Данные, собранные в табл. 7.6, дают некоторое общее представление о разделительной способности исследованных сорбентов.

Как уже упоминалось, механизм разделения на производных полисахаридов изучен очень слабо. Недавно обнаруженное разделение энантиомеров таких алифатических углеводородов, как *цис*, *транс*-1,3-циклооктадиен (1), на триацетилцеллюлозе [55] трудно поддается интерпретации, если не принимать во внимание влияние образования комплексов включения, т. е. стерической дискриминации, вызванной различием в способности энантиомеров проникать в хи-



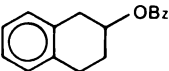
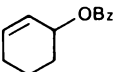
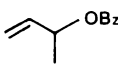
1

ральные пустоты, что и приводит к неодинаковому их удерживанию. Однако при разделении соединений с полярными заместителями проявляется влияние водородных связей и диполь-дипольных взаимодействий. Вопреки ожиданиям конформационно-жесткие сорбаты разделяются не лучше, чем конформационно-подвижные [56]. Это (табл. 7.7) указывает на сложность механизма хирального распознавания на рассматриваемых фазах. Резонно предположить, что для хорошего стерического соответствия, приводящего к энантиоселективному разделению, необходима только определенная конформация молекулы субстрата. Если такая конформация не может быть достигнута, разделение не происходит. Можно также полагать, что применительно к различным производным полисахарида эти стерические требования существенно различаются [51].

Таблица 7.6. Примеры соединений, энантиомеры которых разделены на фенолкарбаматных сорбентах, полученных на основе различных полисахаридов [54] (с разрешения изд-ва)

Соединение	Сорбент получен из
	целлюлозы, амилозы
	R = OH целлюлозы, амилозы R = NO ₂ целлюлозы,
	хитозана, ксилана
	ксилана
M(CH ₂ COCH(COCH ₃) ₃) ₃	M = Co, Cr инулина

Таблица 7.7. Селективность, наблюдаемая при разделении серии бензоатов и дибензоатов на силикагеле, модифицированном трибензоатом целлюлозы [227] (с разрешения изд-ва)

Соединение	α	Соединение	n	α
	1,16	$\text{—C} \begin{matrix} \text{OBz} \\ \text{(CH)—OBz} \end{matrix}$	1	1,14
	1,00		2	1,74
			3	1,44
	1,21		4	1,83
$(\text{Bz} = \text{—C}(=\text{O})\text{—C}_6\text{H}_5)$				

7.1.2. ПРОИЗВОДНЫЕ ПОЛИАКРИЛАМИДА И РОДСТВЕННЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ

Как уже упоминалось в разд. 7.1.1, углеводные биополимеры представляют собой полезный и довольно доступный исходный хиральный материал, который после превращения в очень простые производные может использоваться для получения селективных сорбентов для энантиоразделений. Синтетические хиральные полимеры, однако, нельзя получать без хирального реагента или катализатора. В первом случае проводится хиральная модификация подходящего мономера, и продукт далее полимеризуется с образованием полимерной сетки, имеющей хиральные заместители (рис. 7.6, *а*). Во втором случае мономер полимеризуется под влиянием хирального катализатора, в результате чего образуется оптически активный полимер, поскольку стереорегулярное влияние катализатора вызывает образование изотактической полимерной структуры определенной предпочтительной спиральности (рис. 7.6, *б*). Здесь хиральность присуща всей молекуле полимера, т. е. она обусловлена только спиральной структурой.

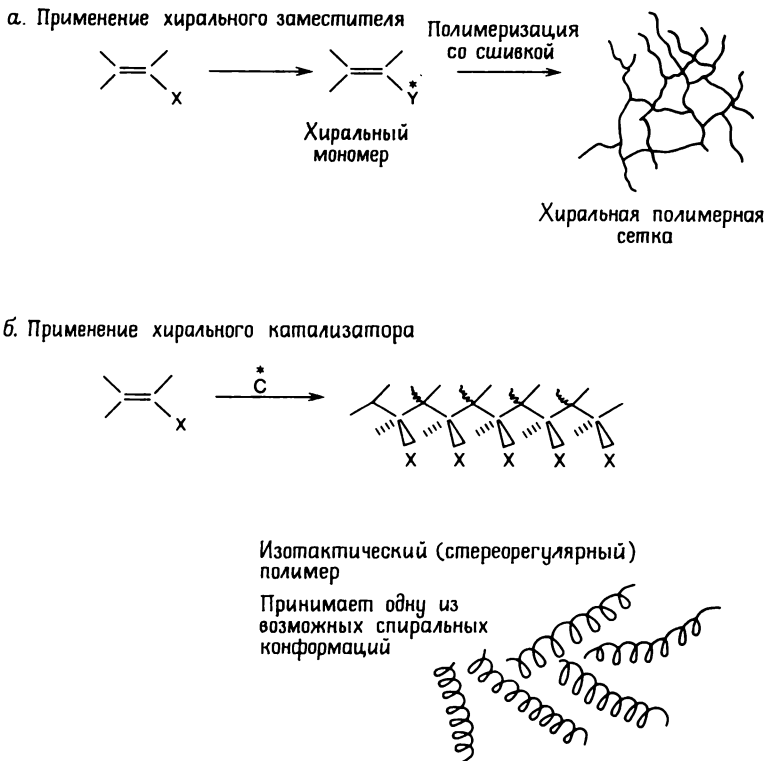


Рис. 7.6. Два различных подхода к синтезу хиральных сорбентов на основе синтетических полимеров. Синтез из хирального (а) и ахирального (б) мономеров.

7.1.2.1. СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ С ХИРАЛЬНЫМИ ГРУППАМИ

Этот тип сорбентов разработан Блашке и сотр. [56—62]. Работа была сосредоточена главным образом на производных полиакриламида и полиметакриламида, хиральными заместителями в которых являлись фрагменты оптически активных аминов или аминокислот. Суспензионной полимеризацией можно получать гранулы полимера с необходимым средним диаметром и приемлемой степенью гомогенности. Полимеризация вызывается радикальным инициатором, и пористость частиц геля регулируется относительным количеством добавленного сшивающего реагента. В органических растворителях частицы набухают, и сорбент можно использовать только в ЖХ-системах низкого давления.

Разделительная способность таких сорбентов зависит от целого ряда факторов. Наиболее существенными являются зависимость от типа заместителей в цепи полимера, от степени сшивки, от природы сшивающего реагента и состава подвижной фазы. Систематическое исследование этих факторов началось в 1974 г., когда было изучено частичное разделение двукратно-меченной (^3H и ^{14}C) миндальной кислоты и ее амида; энантиомерный состав элюируемых фракций был представлен с помощью сцинтиляционного счетчика [56]. Поскольку отношение активностей $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ пропорционально энантиомерному составу, этот метод обнаружения позволяет довольно точно определять α даже при очень плохом разделении пиков, но он, естественно, применим лишь в тех случаях, когда возможно введение соответствующих радиоизотопов в оба энантиомера. Соответственно профиль элюирования обоих энантиомеров был получен из единственного хроматографического эксперимента.

Предпочтительный путь синтеза таких полимеров представлен на схеме 7.2.

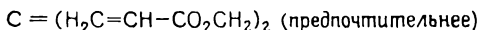
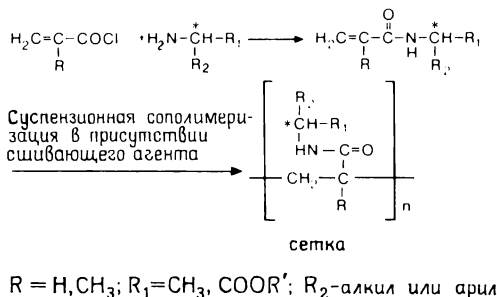


Схема 7.2. Синтетический метод получения хиральных полиакриламидов и полиметакриламидов.

Сильную зависимость разделительной способности от типа заместителя в полимере наглядно демонстрируют данные, приведенные в табл. 7.8, из которых следует, что два наиболее удачных полимера имеют следующий состав: 1) $\text{R} = \text{H}$, $\text{R}_1 = \text{COOR}'$, $\text{R}_2 = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$, $\text{R}' = \text{C}_2\text{H}_5$ и 2) $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R}_1 = \text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{цикло-}\text{C}_6\text{H}_{11}$. Такие замещенные полиакриламиды оказались особенно пригодными для разделения соединений с функциональными группами, способными к образованию водородных связей. Поэтому наиболее употребительны с этими сорбентами относительно неполярные подвижные фазы. Типично использование смесей углеводо-

Таблица 7.8. Разделительная способность серии замещенных акриламидных сорбентов [273] (с разрешения Verlag Chemie GmbH)

R	R ₁	R ₂	R'	Оптический выход, %	
				миндальная кислота	амид миндальной кислоты
H	CH ₃	C ₆ H ₅	—	28	35
CH ₃	CH ₃	C ₆ H ₅	—	8	81
H	CH ₃	цикло-C ₆ H ₁₁	—	12	35
CH ₃	CH ₃	цикло-C ₆ H ₁₁	—	58	92
CH ₃	CH ₃	1-Нафтил	—	0	97
H	CH ₃	<i>n</i> -I-C ₆ H ₄	—	0	0
H	COOR'	CH ₃	C ₂ H ₅	14	18
H	COOR'	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	46	34
H	COOR'	C ₆ H ₅ CH ₂	C ₂ H ₅	51	96
H	COOR'	<i>n</i> -OH-C ₆ H ₄ CH ₂	C ₂ H ₅	0	0
H	COOR'	C ₆ H ₅ CH ₂	<i>trans</i> -C ₄ H ₉	89	80

родов, простых эфиров и иногда небольшого количества спирта, например: толуол—диоксан, гексан—диоксан или толуол—диоксан—метанол. Протонные растворители, подобные метанолу, сильно снижают удерживание и поэтому используются в количествах, не превышающих 10% состава подвижной фазы.

Хотя вклад в удерживание сорбата, по-видимому, обусловлен образованием водородных связей, механизм дискриминации энантиомеров является довольно сложным. Как и при разделении на сорбентах на основе производных полисахаридов, энантиоселективность предположительно вызывается образованием комплексов включения, т. е. связывающие группы в асимметричных пустотах, в которые, по-видимому, диффундируют энантиомеры сорбата, более благоприятно расположены для одного из антиподов, который и будет предпочтительнее удерживаться.

На колонках с подобными сорбентами осуществляется преимущественно энантиоселективное полупрепаративное (количество образца примерно между 1 и 250 мг) разделение лекарственных средств (см. гл. 9). Интересная недавняя модификация таких сорбентов заключается в получении несшитого этилового эфира полиакрилоил-(S)-фенилаланина, связанного с силикагелем. Применение этого сорбента в аналитической ВЭЖХ заметно улучшило эффективность колонок [63].

7.1.2.2. СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ ИЗОТАКТИЧЕСКИХ ЛИНЕЙНЫХ ПОЛИМЕТАКРИЛАТОВ СО СПИРАЛЬНОЙ КОНФОРМАЦИЕЙ

Винильные полимеры, хиральность которых обусловлена только спиральной конформацией, были впервые получены Окамото и сотр. [64, 65]. Оптически активный поли(трифенилметилметакрилат) был впоследствии синтезирован асимметрической анионной полимеризацией трифенилметилметакрилата в толуоле в присутствии хирального инициатора при низкой температуре (схема 7.3).

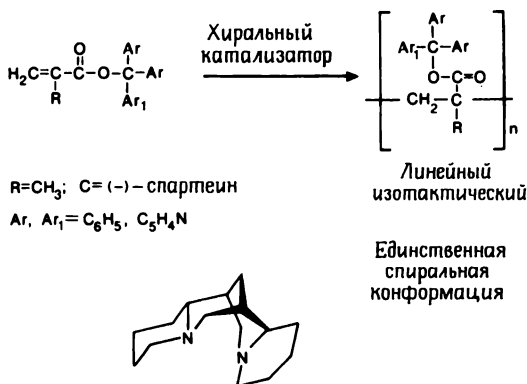


Схема 7.3. Асимметрическая полимеризация, применяемая для получения поли(триарилметакрилата), имеющего правостороннюю спиральность.

Успех полимеризации в большой степени зависит от выбора инициатора, который получают на основе комплекса оптически активного диамина с бутиллитием или амидом лития. Как было показано, и $(-)$ -спартеин—бутиллитий, и $(+)$ -(2S, 3S)-диметокси-1,4-бис(диметиламино)бутан—амид лития позволяют получить $(+)$ -полимер с хорошим выходом [66]. При степени полимеризации больше примерно 70 полимер не растворяется в большинстве обычных растворителей.

Этот полимер можно использовать непосредственно, если его раздробить и выделить фракцию с частицами размером примерно 30 мкм [67]. Однако более эффективный и прочный хроматографический сорбент получается адсорбцией низкомолекулярной растворимой фракции полимера на силанизированном силикагеле (10 нм, 1000 или 4 000 Å) [68].

Неудивительно, что этот тип ХНФ оказался вполне пригодным для разделения рацемических ароматических углеводов с линейной и планарной хиральностью [69]. Соединения, приведенные на рис. 7.7, дают представление о том, какие углеводороды уда-

лось разделить на таких ХНФ с высокими значениями α . Они характеризуются высокой гидрофобностью и жесткой молекулярной структурой. Различие во взаимодействии энантиомеров со спиральной ХНФ (в которой, как полагают, трифенилметильные группы имеют пропеллероподобную конформацию) легко объяснить на основе интуитивных представлений. Это особенно справедливо для гексагелиценов, для которых получены наивысшие для этих фаз значения α (> 13). На (+)-ХНФ наиболее прочно удерживается (+)-форма гелицена, которая имеет правостороннюю спиральность (Р-спиральность). Поскольку выяснилось, что (+)-ХНФ сильно взаимодействует с (+)-полимером, но слабо удерживает (–)-полимер, то весьма вероятно, что (+)-ХНФ также имеет Р-хиральность [70, 71]. Та же самая Р-хиральность обнаружена у всех более прочно удерживаемых энантиомеров соединений, обладающих планарной хиральностью. Эта ситуация показана на рис. 7.7. Из приведенных результатов следует, что данные по хроматографическому удерживанию могут быть использованы и для определения абсолютной конфигурации соединений этого класса.

Поскольку описанные ХНФ содержат несшитый полимер, который удерживается на силикагеле только вследствие физической адсорбции, то по причине растворимости на подвижную фазу накладываются некоторые ограничения. Так, например, следует избегать применения ароматических углеводородов, хлороформа и тетрагидрофурана, которые растворяют полимер. В настоящее время предпочтительной подвижной фазой является метанол [51] и наблюдается общая тенденция к увеличению α с возрастанием полярности растворителя, но время удерживания во многих случаях при этом становится неприемлемо большим.

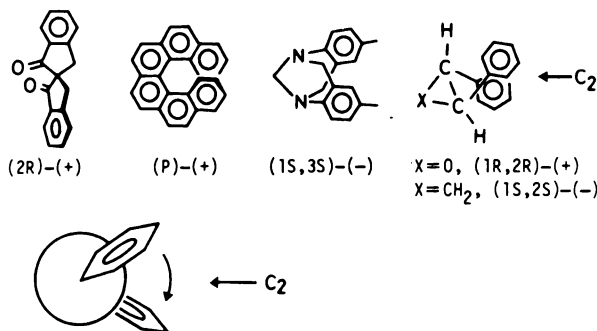


Рис. 7.7. Схематическое представление спиральной ХНФ и абсолютная конфигурация более прочно удерживаемых анантиомеров, показывающая их сходство с (P)-(+)-гексагелиценом [71] (с разрешения изд-ва).

Колонки, содержащие этот тип оптически активных синтетических полимеров, нанесенных на силикагель с частицами размером 10 мкм, фирма Daicel (см. Приложение) выпускает в продажу под названием хиралпак (Chiralpak).

7.1.3. СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМЕРЫ СО ВСТРОЕННЫМИ ХИРАЛЬНЫМИ ПУСТОТАМИ

Еще в 1949 г. Полинг говорил о целесообразности получения синтетическим путем полимерной сетки, пустоты которой подходили бы только одному из двух энантиомеров [75]. В принципе это своего рода имитация активного центра фермента, который может рассматриваться как хиральная пустота в молекуле белка — часто высокоспецифичная по отношению к энантиомерам субстрата вследствие жестких стерических требований для многоточечного связывания. Поскольку этот прием можно сравнить с созданием гипсового слепка с оригинала, он получил название метод «молекулярного отпечатка». Таким образом, молекула данного соединения представляет собой клише, с которого с помощью жесткой полимерной сетки делается слепок. Эту теоретически совершенно ясную процедуру реализовать на практике весьма трудно, и ее осуществление включает три следующих этапа.

1. Образование комплекса хиральное соединение, служащее прототипом, — полимеризуемый мономер.

2. Полимеризация с использованием сшивки для получения жесткой матрицы.

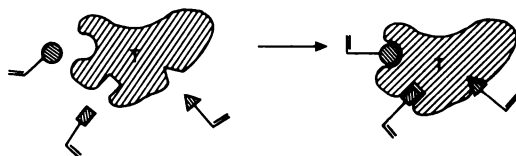
3. Удаление хирального соединения простой промывкой или гидролизом (или подобной реакцией), который необходим при ковалентном связывании прототипа.

Все эти этапы указаны на схеме 7.5.

Интенсивное изучение данного метода началось с 1977 г., после того как выяснилось, что полистирольный сорбент, полученный с применением оптически активного прототипа, позволяет осуществить частичное разделение соответствующих рацематов [76—80]. Один из наиболее удачных методов предусматривает быстрое и обратимое образование эфиров борной кислоты в результате реакции между углеводом и винилзамещенной фенилборной кислотой (рис. 7.8). Этим путем молекулы мономера ковалентно связываются с прототипом (ср. схему 7.5, этап 1). Полимеризация и сшивка дивинильным компонентом, последующий гидролиз и промывка приводят к хиральному сорбенту.

Хроматографические свойства такого рода сорбентов демонст-

Комплексообразование с мономером:



Полимеризация:



Удаление хирального прототипа:

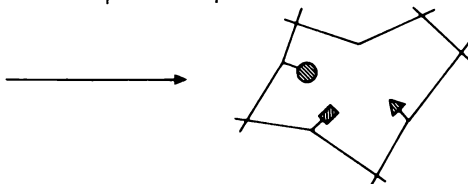


Схема 7.5. Принцип «молекулярного отпечатка», приводящий к определенному расположению связывающих групп внутри микропустот.

рирует рис. 7.9. Эта хроматограмма иллюстрирует одну из трудностей метода, а именно необходимость быстрого массопереноса с целью уменьшения уширения хроматографической зоны. И хотя образование эфиров борной кислоты происходит достаточно быстро, применительно к хроматографическому процессу скорость его явно недостаточна. Следует иметь в виду, что хроматографические рав-

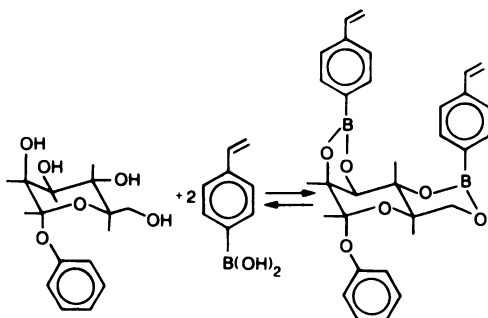


Рис. 7.8. Введение способных к полимеризации винильных групп в структуру фенол- β -D-маннопиранозида путем его этерификации 4-винилфенилборной кислотой.

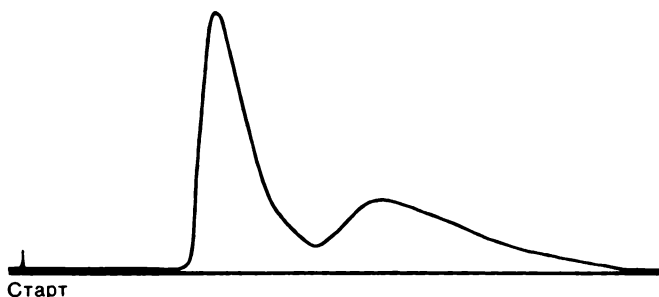


Рис. 7.9. Элюационный профиль, полученный при хроматографировании фенил- β -D,L-маннопиранозид на макропористом полимере с отпечатками (хиральными пустотами) D-энантиомера. Подвижная фаза ацетонитрил с 4% конц. раствора аммиака и 5% воды, скорость потока 0,1 мл/мин, масса пробы 200 мкг [80] (с разрешения Marcell Dekker Inc.).

новесия, связанные с сорбцией—десорбцией, всегда основаны на нековалентных взаимодействиях, исключение составляют лишь некоторые методы разделения белков аффинной хроматографией, где возможен обмен тиол—дисульфид.

В соответствии с этим положением было обнаружено, что эффективность колонки можно улучшить повышением температуры, а также вследствие кислотно-основного катализа, вызываемого добавлением аммиака в подвижную фазу [81].

Выбор подвижной фазы для таких сорбентов довольно сложен, поскольку полимер не должен набухать в этой среде, так как деформация пустот приводит к снижению селективности. Очень полезным элюентом оказалась смесь ацетонитрила с 4—6% воды и 2—8% концентрированного аммиака. Сильное влияние на результаты разделения оказывает скорость подачи элюента, и обычно скорости потока должны быть очень низки.

Интересно отметить, что k' возрастает с ростом температуры, причем тем больше, чем прочнее удерживается энантиомер, что вызывает в свою очередь увеличение α .

7.1.4. БЕЛКИ

Сложная молекулярная структура белков делает их очень интересным объектом для изучения процессов связывания с сорбатом. Метод аффинной хроматографии был развит на основе представлений о способности пар белок—лиганд образовывать весьма прочные комплексы. Подобные пары можно обнаружить во многих природных системах, это, например, такие пары, как фермент—субстрат, фермент—кофактор, гормон—рецептор и т. д., но, как

вскоре выяснилось, многие «неприродные» синтетические соединения также могут сильно связываться с белками (имеют высокое сродство к белкам).

Вследствие доступности и важности белков сыворотки крови, особенно сывороточного альбумина, их чаще всего выбирают в качестве модели при изучении процессов связывания. Из анализа Скэтчарда известно, что связывание с белками является многоступенчатым равновесием, т. е. включает ряд центров связывания, у которых сродство к лиганду может быть различным. Вполне возможно, что суммарный результат и общая константа связывания могут оказаться различными для двух энантиомеров. Более того, исходя из часто демонстрируемой ферментами субстратной энантиоселективности можно предположить, что у других белков также возможно наличие центров сорбции, обладающих высоким сродством и энантиомерно-дифференцирующей способностью.

Исследование равновесия в растворах между сывороточными белками и различными лигандами, особенно фармакологически активными соединениями, показало значительное различие в константах связывания соответствующих энантиомеров [82, 83]. Этот эффект, однако, более надежно был зафиксирован с помощью хроматографической техники. Так, в 1973 г. ранее известное высокое сродство L-триптофана к бычьему сывороточному альбумину (БСА) было использовано для разделения энантиомеров на колонке, заполненной гелем БСА—сефарозы [84]. Элюирование D-формы проводилось боратным буфером (pH9), а элюирование L-формы — разбавленной уксусной кислотой. Этот метод был в дальнейшем использован для определения сродства ряда лекарственных препаратов к сывороточным альбуминам [85, 86]. В последние несколько лет аналитические методы хиральной ЖХ, основанные на использовании иммобилизованных белков в качестве неподвижных фаз, развивались очень быстро и нашли применение для решения широкого круга задач.

7.1.4.1. ИММОБИЛИЗОВАННЫЙ АЛЬБУМИН

В первых работах по применению систем ЖХ низкого давления с изократическим элюированием фосфатными и боратными буферами на колонках с БСА, связанным с сефарозой, показали, что хиральное разделение заряженных сорбатов, подобных немодифицированным аминокислотам триптофану, кинуренину [3-(2-аминобензоил)аланин], и их 5- и 3-оксипроизводным соответственно чрезвычайно сильно зависит от pH подвижной фазы [87]. В дальнейшем

выяснилось, что на этой фазе можно также проводить разделение соединений с хиральным атомом серы, например метил-*о*-карбоксифенилсульфоксида, и что кроме рН сильное влияние на удерживание и разделение оказывает ионная сила [88].

Значительное улучшение разделяющей способности колонок и упрощение методики разделения было достигнуто при иммобилизации альбумина на силикагелевой подложке (сферические частицы размером 7 и 10 мкм, средний размер пор 300 Å) [89]. На аналитических колонках с таким альбумин-силикагелевым сорбентом (Resolvosil) можно осуществлять хроматографирование оптических изомеров широкого круга соединений при элюировании водными забуференными элюентами.

Как и при разделении на ранее описанных полимерных ХНФ, механизм хирального распознавания в данной системе является сложным и до конца не выяснен. Однако основные причины удерживания сорбата были выявлены в ходе систематических исследований влияния его структуры и состава подвижной фазы на коэффициент емкости. Во многих отношениях альбумин-силикагелевый сорбент ведет себя подобно обращенно-фазовым материалам на основе алкилированного силикагеля. Спирты, преимущественно пропанол-1, помогают регулировать время удерживания, поскольку вызывают его быстрое уменьшение вследствие ослабления гидрофобных взаимодействий с сорбентом. Оптимизировать состав подвижной фазы можно, варьируя тремя основными параметрами, а именно: рН, ионной силой и органическим растворителем-модификатором [90]. Вероятно, в любой хроматографической системе одновременно наблюдается влияние диполь-ионных и гидрофобных взаимодействий. Кроме того, возможно образование водородных связей и комплексов с переносом заряда. Большое влияние свойств подвижной фазы на значения k' разделяемых энантиомеров можно объяснить зависимостью свойств белков от распределения заряда и его конформации. БСА состоит как минимум из 581 остатка аминокислот, связанных в единую цепь (мол. масса $6,6 \cdot 10^4$), и его надмолекулярная структура в значительной мере определяется присутствием в молекуле 17 дисульфидных мостиков. При рН 7,0 полный заряд молекулы равен -18 , а изоэлектрическая точка равна 4,7. Как это хорошо известно из химии ферментов, смена растворителя способна вызывать изменения в структуре связывающего центра белка в результате изменения его заряда и конформации.

В зависимости от заряда сорбата изменение рН подвижной фазы сопровождается увеличением или уменьшением величины k' .

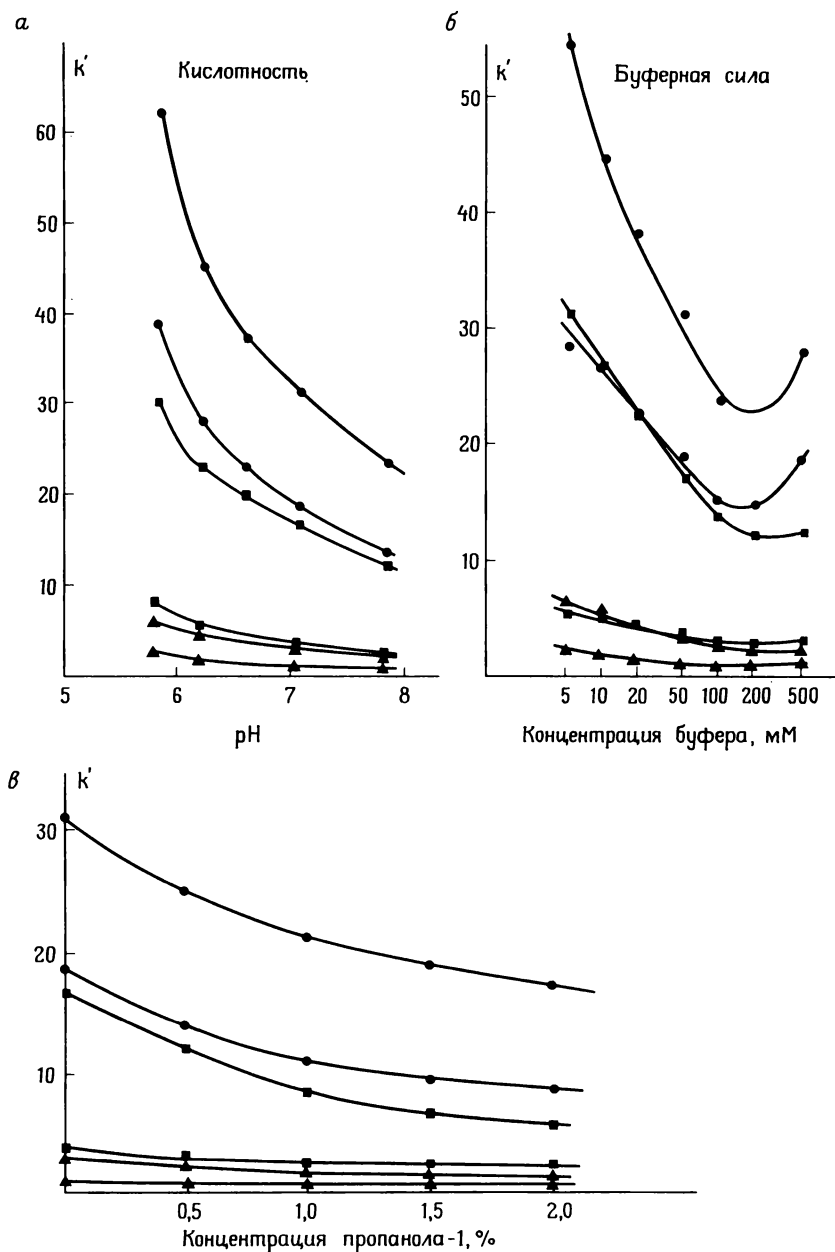


Рис. 7.10. Удерживание (k') энантиомеров N-бензоил-D,L-серина (1), N-бензоил-D,L-аланина (2) и N-бензоил-D,L-фенилаланина (3) в зависимости от pH (а), ионной силы буферного раствора (б) и концентрации органического модификатора (пропанол-1) (в) [90] (с разрешения Elsevier Science Publishers B.V.).

В то время как амины и аминокислоты, несущие положительный заряд, более прочно удерживаются при более высоких значениях рН, для отрицательно заряженных сорбатов справедливо обратное. Систематические исследования, проведенные на серии N-бензоил-L-, L-аминокислот, позволили глубже понять механизм взаимодействия сорбата с белком. Влияние изменения свойств подвижной фазы на величины k' и α демонстрирует рис. 7.10. Во-первых, удерживание в значительной степени возрастает с усилением гидрофобного характера аминокислоты (Ser > Ala > Phe). Во-вторых, увеличение суммарного отрицательного заряда белка с увеличением рН вызывает уменьшение k' для всех шести соединений (вследствие ионного взаимодействия). Далее, влияние концентрации буфера можно объяснить усилением адсорбции вследствие ионных взаимодействий при низкой ионной силе. Небольшое, но вполне заметное возрастание k' для наиболее сильно удерживаемых сорбатов при высоких концентрациях буфера вероятнее всего является результатом усиления гидрофобных взаимодействий. Поскольку ионные (кулоновские) и гидрофобные взаимодействия по-разному подвержены влиянию ионной силы, то оба эффекта приводят к возникновению минимума в адсорбции сорбата (k') в определенной точке. И наконец, совершенно очевидно влияние органического растворителя-модификатора: он всегда приводит к понижению удерживания сорбата и тем сильнее, чем более гидрофобен сорбат. Влияние рН и ионной силы на удерживание незаряженных соединений невелико, но выражено вполне отчетливо. Оно связано исключительно с изменениями в связывающем центре ХНФ. Добавление пропанола-1 вызывает уменьшение удерживания по сравнению с наблюдаемым у заряженных сорбатов, что свидетельствует о преимущественном вкладе в удерживание гидрофобных взаимодействий. Это подтверждает также наблюдаемое очень большое влияние на удерживание длины цепи алканола-1. Высшие спирты являются значительно более эффективными конкурентами за связывающий центр, а потому вызывают более быстрое элюирование сорбата. Возможность регулирования удерживания путем изменения подвижной фазы, которую демонстрирует схема 7.6, говорит о том, что эту особенность данных хроматографических систем можно использовать в целях оптимизации разделения.

На этих колонках могут быть достигнуты очень большие значения α , которые, впрочем, не слишком нужны в практической работе [91, 92]. Однако провести оптимизацию разделения и получить приемлемое время анализа несложно (рис. 7.11).

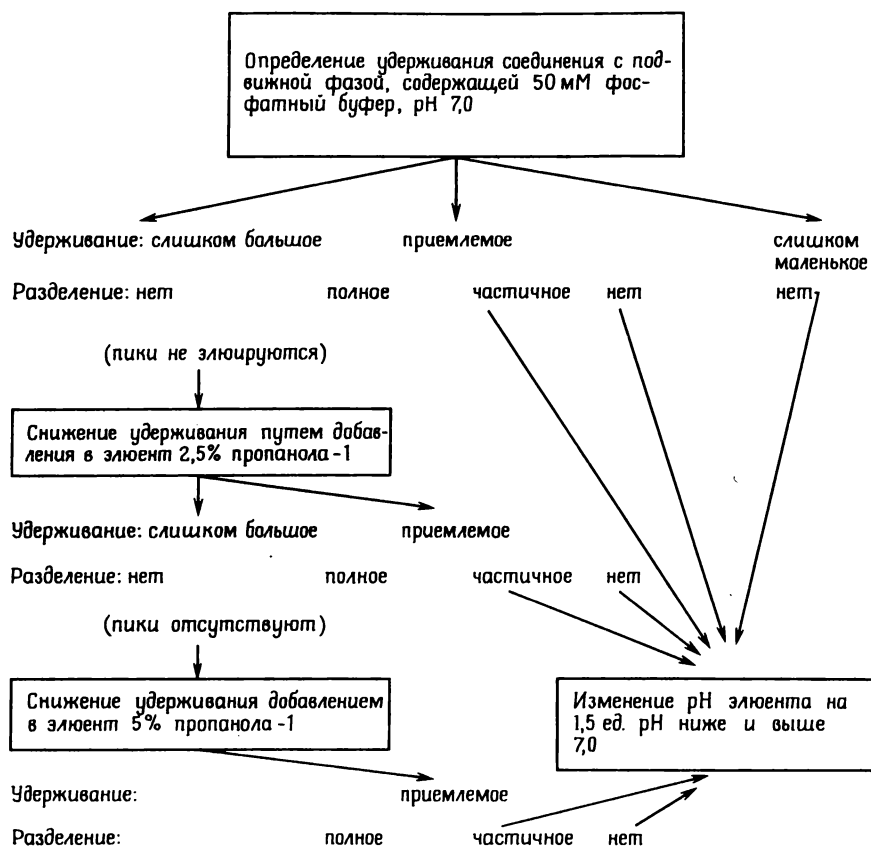


Схема 7.6. Оптимизация разделения оптических изомеров путем систематического изменения состава подвижной фазы [227] (с разрешения изд-ва).

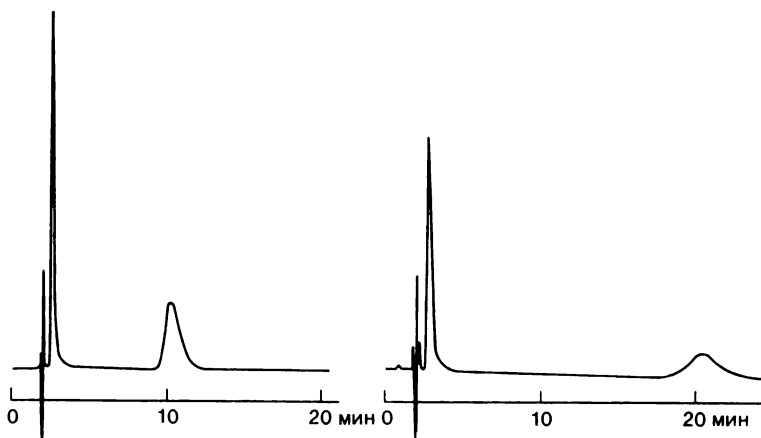


Рис. 7.11. Влияние подвижной фазы на разделение; хроматограмма D,L-кинурина при pH подвижной фазы 7,1 (а) и 7,6 (б) [54].

7.1.4.2. ИММОБИЛИЗОВАННЫЙ КИСЛЫЙ α_1 -ГЛИКОПРОТЕИН (ОРОЗОМУКОИД)

Несмотря на то что белки вызывают большой интерес как потенциальные ХНФ, помимо альбумина в настоящее время исследован еще только один белок — протеин плазмы крови человека, так называемый кислый α_1 -гликопротеин (АГП) или орозомукоид, присутствующий в плазме в концентрации 55—140 мг на 100 мл. Установлено, что АГП — основной белок в организме человека, способный связывать катионы [93].

Хроматографический сорбент с АГП был получен на основе силикагеля с размером пор 300 Å, на котором белок был иммобилизован путем изменения его функциональных групп и последующего сшивания, осуществляемого таким образом, чтобы образовавшиеся агрегаты были достаточно большими и могли удерживаться в порах. АГП содержит пять углеводных фрагментов, на долю которых приходится ~ 45% его молекулярной массы. Окислением периодатом натрия первичные спиртовые группы этих углеводных фрагментов превращаются в альдегидные. Закрепление модифицированного белка на силикагеле проводится путем повышения pH буферного раствора, что вызывает его сшивание через образование оснований Шиффа. Для получения гидролитически устойчивых связей последние восстанавливаются до иминогрупп с помощью цианоборогидрида натрия [94]. Процесс иммобилизации показан на схе-

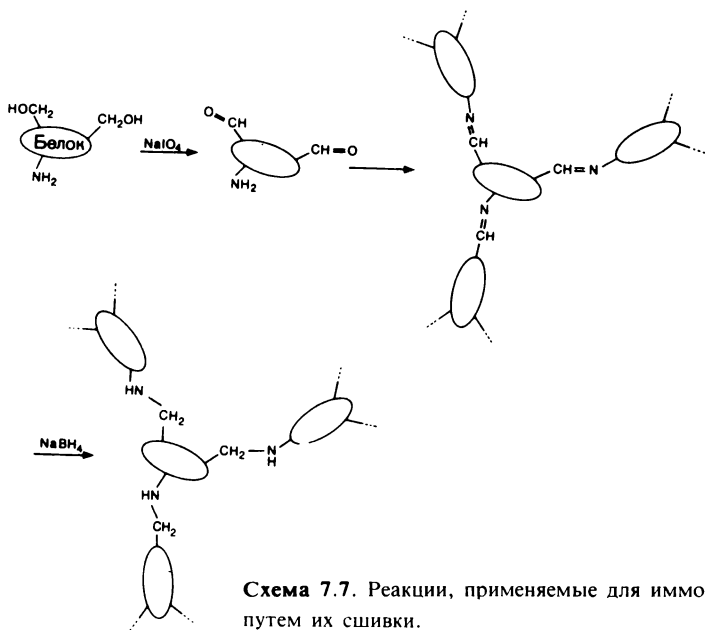


Схема 7.7. Реакции, применяемые для иммобилизации белков путем их сшивки.

ме 7.7. Колонки с такими сорбентом выпускаются под названием EnantioPac.

Изoeлектрическая точка нативного АГП соответствует 2,7, т. е. примерно на 2 ед. pI выше, чем у альбумина. Его молекулярная масса составляет $4,1 \cdot 10^4$. Предполагают, что сиаловая кислота (14 остатков на всю молекулу белка), присутствующая в углеводных остатках, ответственна за связывание соединений аммонийного типа в нейтральной области pH [95] и этот процесс протекает с некоторой энантиоселективностью.

В целом же удерживание в данном случае определяется тем же типом взаимодействий, что и на альбумин-силикагелевой ХНФ, и здесь применимы в основном те же приемы регулирования удерживания и селективности, но в качестве спиртового модификатора более предпочтителен пропанол-2 [96]. В качестве модификаторов были также испытаны как катионные, так и анионные соединения. Анализ их влияния на удерживание ионных соединений показал, что оно хорошо описывается моделью ион-парных равновесий для взаимодействия сорбат-сорбент [97]. Таким образом, при разделении оптических изомеров на колонках EnantioPac можно пользоваться теми же приемами, которые широко используются в обращенно-фазовой хроматографии [98]. Это еще раз подчеркивает важность гидрофобных связывающих центров для ХНФ на основе белков.

Поскольку ион-парные модификаторы удерживания играют исключительно важную роль при осуществлении практически важных разделений, например при проведении анализа лекарственных средств, к которому мы еще вернемся в гл. 8, то мы кратко рассмотрим теоретические основы ион-парной хроматографии [99].

Предположим, что сорбат S — основное соединение, которое существует в протонированной форме HS^+ в используемой при разделении области pH . В подвижную фазу добавлен заряженный ион-парный реагент Q^+X^- . Распределение сорбата между подвижной и неподвижной фазами зависит от концентрации добавленного соединения.

Нам известно из гл. 4 [уравнение (4.3)], что коэффициент емкости k' можно представить как $k' = Kq$, где K — константа распределения (C_s/C_m) сорбата, а q — отношение фаз (V_s/V_m).

С учетом происходящих равновесий коэффициент емкости рассматриваемого сорбата k'_{HS^+} можно представить следующим выражением:

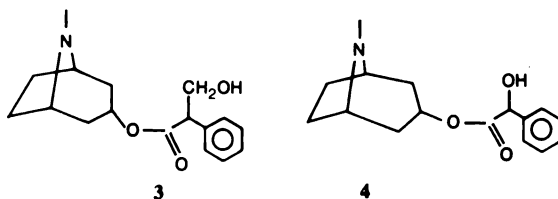
$$k'_{HS^+} = \frac{qK^0K_{HSX}[X^-]}{1 + (K_{QX}[Q^+][X^-]} \quad (7.1)$$

где K^0 — емкость монослоя.

Правильность этого выражения можно проверить экспериментально. Для этого преобразуем его к виду

$$\frac{[X^-]}{k'_{HS^-}} = \frac{1 + K_{OX}[Q^+][X^-]}{gK^0K_{HSX}} \quad (7.2)$$

Построив теперь зависимость $[X^-]/k'_{HS^-}$ как функцию $[Q^+][X^-]$,



мы должны получить прямую, если предложенная модель правильна. В качестве примера на рис. 7.12 показано влияние октаноата натрия ($X^- = C_8H_{17}CO_2^-$) на разделение оптических изомеров атропина (**3**) и гомоатропина (**4**) на колонке EnantioPac. Отметим, что наблюдаемая линейная зависимость означает, что величина α сохраняется неизменной, что отвечает предположению о существовании только одного типа связывающих центров.

Шил и сотр. [97, 100], а также Германсон и Эриксон [101] по-

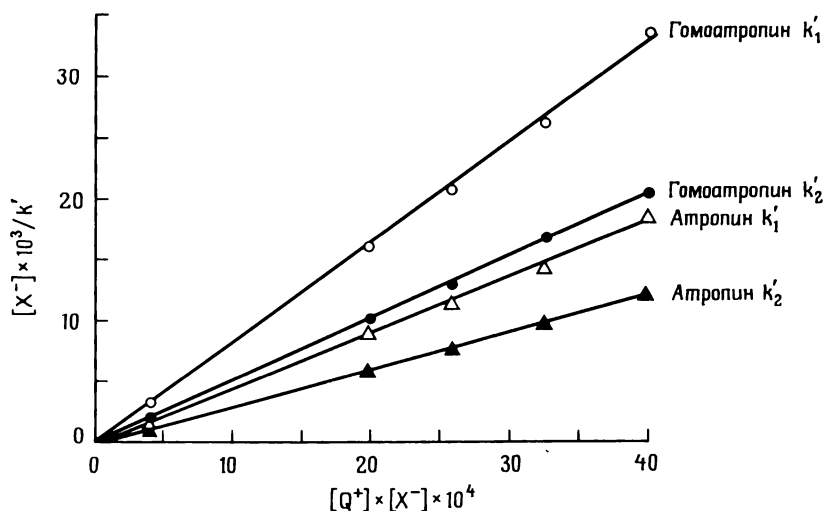


Рис. 7.12. Применение модели ион-парного распределения к удерживанию энантиомеров атропина и гомоатропина. Подвижная фаза октановая кислота в 0,02 М фосфатном буфере, pH 7,0 [97] (с разрешения Marcell Dekker Inc.).

дробно, на большом числе ионных сорбатов, изучили влияние гидрофобных ионных модификаторов, а также влияние pH и различных спиртов.

В заключение, хотя делать какие-либо обобщения, касающиеся хроматографии на ХНФ на основе белков достаточно сложно, приведем свойства, общие для обоих типов колонок.

1. Спирты обычно понижают удерживание обоих энантиомеров. Наиболее вероятно, что это обусловлено способностью спиртов уменьшать гидрофобное взаимодействие сорбата с поверхностью белковой молекулы. Поскольку гидрофобные взаимодействия дают значительный вклад в сорбционные равновесия, любое уменьшение этого вклада приводит к ускорению элюирования сорбата с колонки. Влияние же на величину селективности разделения энантиомеров определяется относительным уменьшением удерживания каждого из энантиомеров. Часто, хотя и не всегда, α или уменьшается, или остается без изменения.

2. Влияние pH значительно сильнее выражено для заряженных субстратов, чем для нейтральных. В общем случае понижение pH вызывает уменьшение удерживания катионных сорбатов и увеличение удерживания анионных. Влияние на α обычно очень значительное, но трудно поддается предсказанию или систематизации.

7.2. КОВАЛЕНТНО-СВЯЗАННЫЕ ХИРАЛЬНЫЕ ЛИГАНДЫ

У хроматографических неподвижных фаз этого типа хорошо известна молекулярная структура низкомолекулярного фрагмента, закрепленного на некотором твердом носителе, обычно силикагеле. Эти низкомолекулярные хиральные соединения, называемые в данном тексте селекторами, часто выбираются на вполне рациональной основе, поскольку их энантиоселективные свойства во многих случаях могут быть установлены при изучении ЯМР-спектров их растворов. Это также означает, что порядок элюирования из колонки, заполненной сорбентом с таким селектором, часто можно предсказать, основываясь на механизме хирального распознавания.

7.2.1. КРАУН-ЭФИРЫ (КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ «ГОСТЬ—ХОЗЯИН»)

Макроциклические полиэфиры, известные под названием краун-эфиры, образуют прочные комплексы с катионами металлов и замещенными ионами аммония, и это их свойство изучено было подробно [102]. Краун-эфиры представляют, в частности, большой ин-

интерес в связи с тем, что они могут выполнять роль реагентов межфазного переноса в тех случаях, когда образование липофильного комплекса включения с ионом щелочного металла используется для переноса солей щелочных металлов в органические растворители [103]. Этот раздел химии сейчас известен как одно из направлений химии комплексов типа «хозяин—гость», копирующее природный принцип структурного распознавания, который очень распространен в биологических регулируемых системах.

После первых успешных синтезов оптически активных краун-эфиров [104, 105] Крам и сотр. [106] приступили к изучению их способности разделять оптические изомеры. Разработанные ими принципы разделения были применены ими в ЖХ, хиральные краун-эфиры при этом или вводились в подвижную фазу, или ковалентно связывались с силикагелевой подложкой [107]. Хиральный «хозяин» подобного типа способен различать энантиомеры производных аммония, таких как эфиры D, L-аминокислот, поскольку образование водородных связей между аммонийной группой и кислородными атомами эфира по стерическим причинам приводит к тому, что у одного из таких комплексов стабильность меньше.

Эта ситуация показана на рис. 7.13. Закрепленный оптически активный краун-эфир (R, R)-конфигурации выступает в роли «хозяина», принимающего «гостя» — (S)-метилловый эфир фенилаланина (в виде гидрохлорида). Все три протона аммонийной группы образуют водородные связи с кислородными атомами краун-эфира. Конформационная подвижность в таком комплексе существенно ограничена, и (S)-энантиомер может принять в комплексе конформационно более предпочтительную форму. Отметим, что краун-эфир, несмотря на его кажущуюся симметрию, может существовать в четырех оптически активных формах, поскольку он получен из атропоизомеров бинафтола, который удалось разделить на энантиомеры вследствие затрудненности вращения. Приведенная структура получена из (R)-энантиомера.

7.2.2. КОМПЛЕКСЫ МЕТАЛЛОВ (ОБМЕН ХИРАЛЬНЫХ ЛИГАНДОВ)

Способность металлов образовывать комплексы используется в целях разделения энантиомеров уже давно. Основополагающие работы в этой области выполнены Даванковым, который еще в 1970 г. опубликовал первые исследования о новом методе — хиральной лигандообменной хроматографии (ХЛОХ) [108—110]. Предложенный им метод предусматривает закрепление L-пролина на хлорметилированном сополимере стирола с дивинилбензолом и

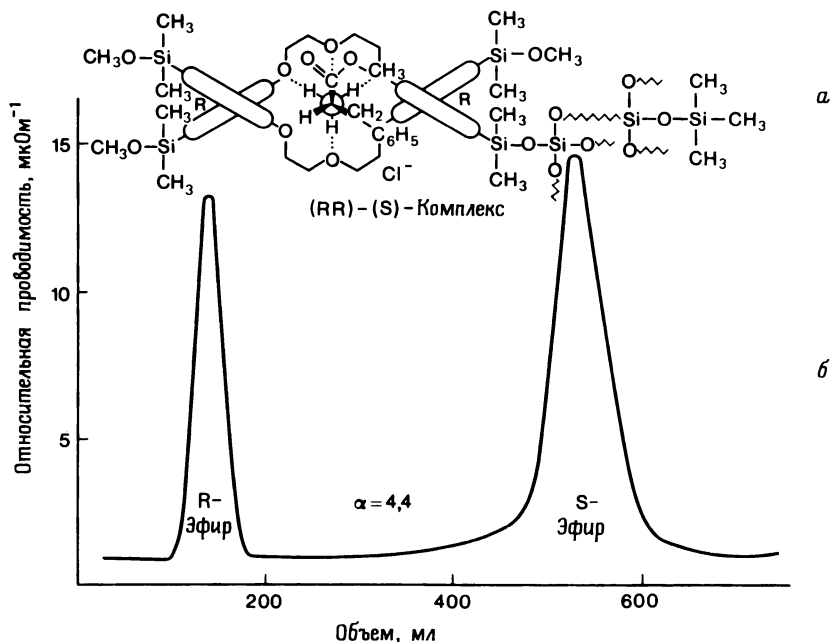


Рис. 7.13. Структура оптически активного краун-эфира, использованного для разделения энантиомеров, (а) и хроматограмма хлоргидрата метилового эфира фенилаланина (б) [107] (с разрешения изд-ва).

использование для разделения тройных комплексов, образующихся в присутствии ионов меди(II) и анионов аминокислот (схема 7.8).

Поскольку аминокислотные лиганды противоположной оптической

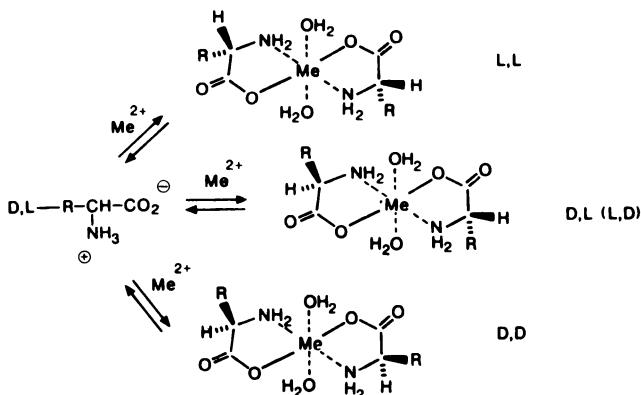


Схема 7.8. Образование тройных комплексов переходных металлов с аминокислотами.

кой конфигурации образуют диастереомерные комплексы, любое различие в стабильности этих комплексов обязательно приводит к различию в хроматографической подвижности энантиомеров аминокислот. После опубликования результатов первых успешных экспериментов данный метод начал интенсивно изучаться, и на сегодня это, пожалуй, самый изученный метод хиральной ЖХ. Ниже обобщены некоторые наиболее важные результаты исследований.

1. Среди всех изученных ионов металлов, способных к образованию хелатов [Cu(II), Ni(II), Zn(II), Hg(II), Co(III), Fe(III) и т. д.], наиболее прочные комплексы образует Cu(II), и, вероятно, она наиболее всего приемлема для целей жидкостной хроматографии.

2. Циклические аминокислоты, подобные L-пролину или L-оксипролину, вместе с ионами меди(II), образуют хиральные селекторы обладающие наибольшей энантиоселективностью.

3. Большое значение имеют метод закрепления селектора и природа матрицы.

4. Для серий бидентатных аминокислот на данной колонке наблюдается обычно неизменный порядок выхода энантиомеров.

Тройные комплексы должны обладать достаточной стабильностью, а этому условию отвечает только ограниченный круг рацемических соединений. Поскольку предпочтительными являются пятичленные хелатные кольца, наиболее прочные комплексы образуют такие соединения, как α -амино- и α -оксикислоты. Не удивительно, что β -аминокислоты (образующие шестичленные хелатные кольца) трудно поддаются разделению методом ХЛОХ [111]. Прочность комплекса зависит и от числа функциональных групп в молекуле лиганда, связанных с атомом металла. Вследствие этого бидентатные лиганды, например нейтральные аминокислоты, лишенные других полярных заместителей, показывают при хроматографировании на полистирольных сорбентах, содержащих L-Prо или L-НО-Prо-хиральные лиганды, порядок выхода энантиомеров обратный тому, который наблюдается, например, для кислых аминокислот (Asp, Glu) (у этих аминокислот с ионом металла могут координироваться три группы).

Чтобы понять это обращение порядка выхода энантиомеров, рассмотрим различные возможности стабилизации сорбционного комплекса (т. е. комплекса, образованного хиральным лигандом, ионом металла и разделяемыми энантиомерами в неподвижной фазе) за счет координации молекул растворителя или других лигандов в его аксиальных положениях. Считается, например, что координация молекул воды в аксиальном положении стабилизирует комплекс. Следовательно, стабильность комплекса в очень большой

степени зависит от заместителей в молекуле лигандов, которые экранируют аксиальные позиции в комплексе и приводят к различной координации растворителя в диастереомерном сорбционном комплексе. Такое влияние вполне правдоподобно, учитывая жесткую геометрию и пониженную конформационную подвижность в сорбционном комплексе. Этим также объясняется значительное влияние используемой матрицы. Наглядно эта картина представлена на рис. 7.14.

Если мы начнем рассмотрение с полистирольного сорбента, содержащего фрагменты L-Pro (а), то увидим, что из двух возможных диастереомерных комплексов, образуемых бидентатным лигандом, комплекс L—L менее стабилен ввиду стерической затрудненности сольватации. Следовательно, в этом случае сначала элюируется L-, а затем D-энантиомер. В случае тридентатных лигандов соседняя группа, в рассматриваемом примере карбоксильная, оказывает большее стабилизирующее влияние, чем координация молекулы воды. Но такое замещение возможно только в L—L-комплексе, который теперь более устойчив, и D-энантиомер элюируется соответственно раньше L-энантиомера. Теперь рассмотрим сорбент на основе полиакриламида с хиральными фрагментами L-Pro (б); здесь следует учитывать влияние полярных групп в структуре матрицы. В этом случае в комплексообразовании участвуют электронодонорные карбонильные группы полиакриламида [112]. Предполагают, что стабилизация комплекса, обусловленная участием в комплексообразовании карбонильного кислорода амидной группы, меньше для L—D-комплексов вследствие стерических взаимодействий с заме-

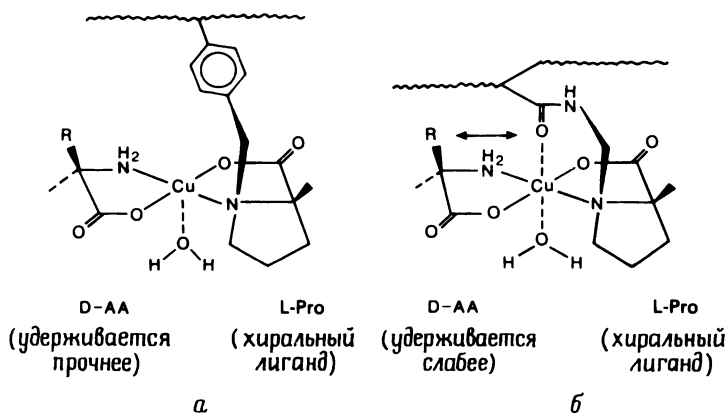


Рис. 7.14. Стерический эффект участия растворителя в образовании тройного комплекса с иммобилизованным лигандом.

стителами R в боковой цепи аминокислот. Это предположение подтверждают проведенные позднее измерения стабильности комплексов с низкомолекулярными модельными соединениями [113]. Для всех исследованных бидентатных α -аминокислот, за исключением пролина, наблюдался следующий порядок элюирования: сначала D-, затем L-энантиомер. С увеличением размера и разветвленности заместителя R наблюдался значительный рост селективности [114].

Интенсивные исследования в области ХЛОХ, проводимые с 1970 г., привели к синтезу большого числа сорбентов на базе различных матриц (полистирол, полиакриламид, полиметилметакрилат, силикагель) и различных хиральных селекторов (из которых наибольшее распространение нашли закрепленные через атом азота L-Pro, L-алло-НО-Pro и L-НО-Pro). Перечень этих сорбентов дан в табл. 7.9.

Использование силикагеля в качестве носителя позволило значительно повысить обычно очень низкую эффективность колонок, что облегчило сочетание данного метода с современной ЖХ. Несмотря на это, эффективная высота, эквивалентная теоретической тарелке, остается еще сравнительно большой. Это, несомненно, вызвано ма-

Таблица 7.9. Различные типы сорбентов, используемые в ХЛОХ

Иммобилизованный лиганд	Матрица	Ион металла	Разделяемые рацематы
Различные L-(и D-)AA	Полистирол	Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}	Различные D,L-AA, 2-аминоспирты, миндальная кислота
L-Pro	Полистирол	Cu^{2+}	D,L-Pro
N-Карбоксиметил-L-Val	Полистирол	Cu^{2+}	D,L-AA
(R)-N, N'-Дибензилпропилендиамин-1,2	Полистирол	Cu^{2+}	D,L-AA
L-Pro, L-AA	Полиакриламид	Cu^{2+}	D,L-AA
L-Pro	Силикагель	Cu^{2+}	D,L-AA
L-(и D-)Pro, L-НО-Pro, L-Val, L-His	Силикагель	Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{3+} , Zn^{2+}	D,L-AA
L-Pro-NH ₂	Силикагель	Cu^{2+}	D,L-Trp, D,L-Tyr, D,L-Phe
L-Pro-NH ₂	Силикагель	Cd^{2+}	Dns-D, L-AA, барбитураты, гидантоины
мрет-БОК-L-Pro-NH ₂ или L-Val-NH ₂	Силикагель	Cu^{2+}	D,L-AA, Dns-D,L-AA
Линейный полиакриламид-L-Pro-NH ₂	Силикагель (адсорбция)	Cu^{2+}	D,L-AA
N-Ацил-L-Val-NH ₂	Силикагель		Эфиры N-ацил-D,L-AA

лой в хроматографической шкале времени скоростью обменных процессов в сорбционном комплексе. Как следствие этого повышение температуры колонки до примерно 50°C улучшает разделение [115].

Подвижная фаза всегда водная, обычно забуференная, содержит некоторое, очень малое ($\approx 0,1$ — $1,0$ мМ), количество металла-комплексобразователя. Известную пользу иногда приносит применение смесей воды с такими органическими растворителями, как метанол или ацетонитрил, в качестве модификаторов. На линейном полиакриламиде, содержащем аминокислотные фрагменты и Cu(II) и сорбированном на силикагеле, лигандный обмен также проходит медленно [114].

Рядом авторов [116—129] разработана методика ковалентного связывания аминокислот с силикагелем. Серия подобных силикагелевых сорбентов, содержащих аминокислоты в качестве фиксированных лигандов, изучена Гюбитцем и соавт. [121—123], которые обнаружили, что при образовании комплексов Cu(II) и циклических аминокислот наблюдается более высокая энантиоселективность, чем при образовании аналогичных комплексов с алифатическими аминокислотами, и что с фенилаланином в качестве фиксированного лиганда порядок элюирования энантиомеров всех изученных аминокислот (т. е. L-энантиомер перед D-энантиомером) противоположен наблюдаемому с другими исследованными лигандами.

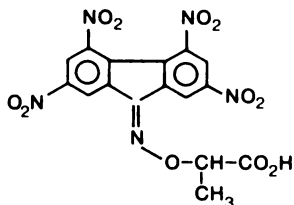
Разработаны и подробно исследованы методы нековалентной иммобилизации комплексов аминокислот с металлами, обусловленной гидрофобными взаимодействиями с обращенно-фазовым силикагелевым сорбентом (алкилсиликагелем). И хотя некоторые из этих методов не требуют добавления хирального селектора в подвижную фазу [130], их следует рассматривать как пограничные по причине их сходства с другими методами, основанными на сочетании обращенно-фазовых нехиральных колонок и подвижных фаз, содержащих хиральные добавки, и мы их рассмотрим в разд. 7.3.

7.2.3. СЕЛЕКТОРЫ, РАБОТАЮЩИЕ ПО ПРИНЦИПУ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ С ПЕРЕНОСОМ ЗАРЯДА

Для хиральных селекторов, описанных в этом разделе, характерен существенный вклад ароматического π — π -связывания в процесс удерживания сорбата. Взаимодействия такого типа хорошо изучены, они происходят между так называемыми π -донорными и π -акцепторными молекулами. π -Доноры имеют тенденцию к отдаче электрона, поскольку образующийся положительный заряд хоро-

шо распределяется по π -системе. Напротив, π -акцептор стабилизируется вследствие принятия отрицательного заряда и поэтому стремится принять дополнительный электрон в свою π -систему. Таким образом, если заряд может быть перенесен с молекулы донора на молекулу акцептора, пара π -донор/ π -акцептор образует комплекс, прочность которого в ряде случаев довольно высока. Часто донорную молекулу называют π -основанием, а акцепторную — π -кислотой.

В 1960 г. Клемм и сотр. [131, 132] одними из первых применили комплексообразование с переносом заряда (КПЗ) при разделении оптических изомеров. Как известно, многоядерные ароматические соединения, включая гелицены, образуют КПЗ с акцепторами, подобными нитроароматическим соединениям. Интересный разделяющий реагент, действие которого основано на наличии у него π -кислотности, разработан и синтезирован Ньюменом и сотр. [133,—135]. Это соединение, оптически активная α -(2,4,5,7-тетранитрофлуоренилиденаминоокси)пропионовая кислота (5), способно разделять различные ароматические π -основания благодаря образованию КПЗ [131—133].

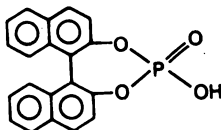


5

Используя хроматографический носитель, модифицированный (5), Клемм смог частично разделить некоторые ароматические эфиры и углеводороды. Способность (5) разделять хиральные ароматические углеводороды, не содержащие каких-либо других функциональных групп, представляет большой интерес. Гил-Авом и сотр. [136, 137], а также Винбергом и сотр. [138, 139], а также рядом других исследователей опубликованы сообщения о разделении гелиценов методом ЖХ на силикагеле с ковалентно-связанным (5) или на силикагеле или оксиде алюминия с физически адсорбированным (5). Опубликованы также сообщения о проведенных разделениях ряда энантиомеров, в основу которых положен этот же принцип [140—142].

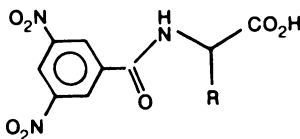
В качестве других хиральных лигандов, образующих КПЗ, предложены N-динитрофенил-L-аланин [143] и динафтилфосфорная кис-

лота (6) [144, 145], которые оказались полезными при разделении энантиомеров гелиценов.

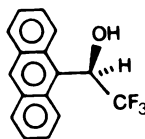


6

Но переворот в использовании КПЗ для разделений энантиомеров методом ЖХ вызвало введение в качестве хиральных иммобилизованных π -акцепторов N-(3,5-динитробензоил)аминокислот (7). Этот метод, предложенный Пирклом и сотр. [146—148], был развит на опыте применения оптически активного антранилкарбинола (R)-(-)-2,2,2-трифтор-1-(9-антранил)этанола («спирт Пиркла») (8) для разделения рацемического 2,4-динитрофенилметилсульфоксида методом рециклической хроматографии на колонке с силикагелем, насыщенным этим спиртом [149]*. В результате ковалентного связывания этого оптически активного π -основания и силикагелевой матрицы был получен хиральный сорбент, на котором было проведено разделение различных π -акцепторных сорбатов, включая сульфоксиды, амины, аминокислоты, гидроксикислоты, лактоны, спирты, аминокислоты и тиолы [150].



7



8

Исходя из представлений теории трехточечного взаимодействия Далглиша, Пиркл [151] объяснил столь успешные результаты разделений, проведенных на этом сорбенте, одновременным действием π — π -взаимодействий и образованием водородных связей в неполярном растворителе, выполняющем роль подвижной фазы [151]. Предложенная модель распознавания при взаимодействии сорбат—сорбент показана на рис. 7.15.

*Эти эксперименты были выполнены на стеклянной колонке, что позволяло непосредственно наблюдать разделение окрашенного в красный цвет комплекса с переносом заряда, образуемого спиртом и сульфоксидом. Более того, интенсивность окраски обратимо менялась с изменением температуры, что доказывает обратимость комплексообразования.

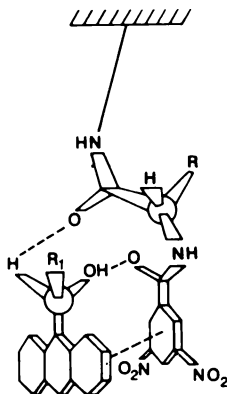


Рис. 7.15. Модель хирального распознавания, предложенная Пирклом. Образование комплекса с переносом заряда одновременно вызывает дополнительные взаимодействия, зависящие от конфигурации партнеров.

Поскольку такой хиральный сорбент продемонстрировал прекрасные разделяющие свойства по отношению к 3,5-динитробензоильным производным рацемических соединений, подобных аминокислотам, применение принципа «обратимости» (означающего, что если оптически активное соединение А разделяет энантиомеры В, то оптически активное соединение В должно разделять энантиомеры А) привело к синтезу (R)-N-(3,5-динитробензоил)фенилглицина в качестве хирального селектора π -кислотного типа. Обычно его удобно использовать в сочетании с 3-аминопропилсиликагелем, элюентом при этом служит смесь пропанол-2(0—20%)—гексан. Исследование разделения различных замещенных антраниловых спиртов на этих ХНФ в очень большой степени способствовало пониманию механизма хирального распознавания при энантиоселективной адсорбции, что позволило во многих случаях достигнуть высоких значений α [146].

В дальнейшем выяснилось, что заместители R_1 в антранилкарбинолах, влияющие на их π -основность, аналогичным образом влияют и на величину α . Кроме того, α возрастает с увеличением размера R_1 . Другие же функциональные группы присутствующие в R_1 , оказывают на α незначительное влияние, кроме тех случаев, если только они не конкурируют с основными группами за сорбционные центры на ХНФ или существенно не меняют конформационное поведение молекулы.

Для того чтобы получить стабильную, ковалентно-связанную с аминопропилсиликагелем фазу, допускающую широкий выбор элю-

ентов, ДНБ-производное аминокислоты вводилось в реакцию конденсации с аминогруппой аминопропилсиликагеля в присутствии ЭЭДХ в качестве конденсирующего агента. Интересно, что полученная фаза с амидной связью по селективности значительно отличается от своего аналога с ионной связью, даже если разделение производится в идентичных условиях.

Две наиболее распространенные ХНФ типа (7), имеющиеся в настоящее время в продаже, созданы на основе фенилглицина и лейцина [$R-CH_2C_6H_5$ и $CH_2CH(CH_3)_2$] [152].

Правило обратимости хирального распознавания было использовано в дальнейшем для создания еще одного ряда ХНФ. Так, после того, как было обнаружено [153], что длинноцепочечный эфир N-(2-нафтил)-D,L-валина и высшего спирта разделяется на энантиомеры на колонке с (S)-N-(3,5-динитробензоил)лейцином с очень высоким значением α (10,5), были синтезированы фазы, представлявшие собой нафтиламинокислоты, связанные с силикагелем через сложноэфирную связь и длинную алкильную цепь [154, 155]. Вероятно, было бы полезно обсудить синтез таких сорбентов, представленный на примере валина [$R-CH(CH_3)_2$] на схеме 7.9.

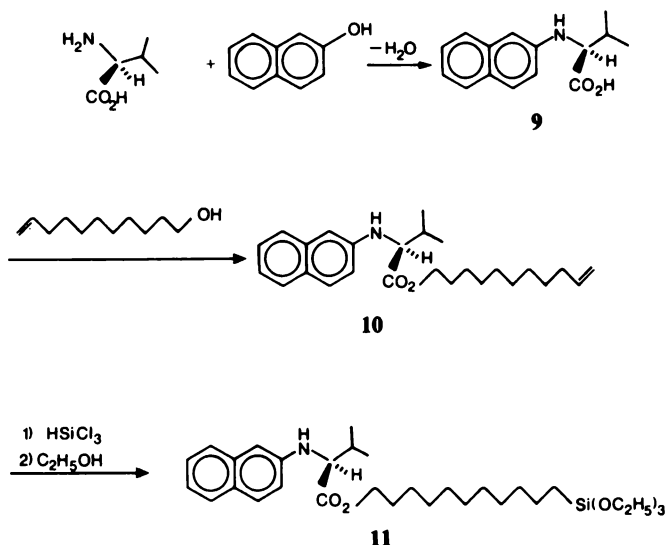


Схема 7.9. Синтетический метод закрепления π -донорного хирального селектора.

Сначала L-валин реагирует с нафтолом-2 по модифицированной реакции Бухерера с образованием (S)-(-)-N-(2-нафтил)валина (9). Этот продукт этерифицируется ундецен-10-олом-1 в условиях кислотного катализа и дает (10). Следующий этап — гидросилили-

рование: в присутствии хлорплатиновой кислоты как катализатора трихлорсилан присоединяется по концевой двойной связи. Полученный таким образом хиральный трихлорсилан далее (без предварительной очистки) переводится в соответствующий триэтоксисилан (11), который и связывается с силикагелем.

Энантиоселективные свойства таких сорбентов приведены в табл. 7.10 для серии производных аминов и спиртов. С целью полного использования π -донорной емкости нафтиламинной группы в ХНФ «селектанд» (сорбат) должен иметь хорошую π -акцепторную группу, например 3,5-динитрофенильную. Такую группу довольно легко ввести ацилированием (с образованием амидов или эфиров) или карбоамилированием через изоцианаты (с образованием производных мочевины или карбаматов). Основные реакции такого типа показаны на схеме 7.10.

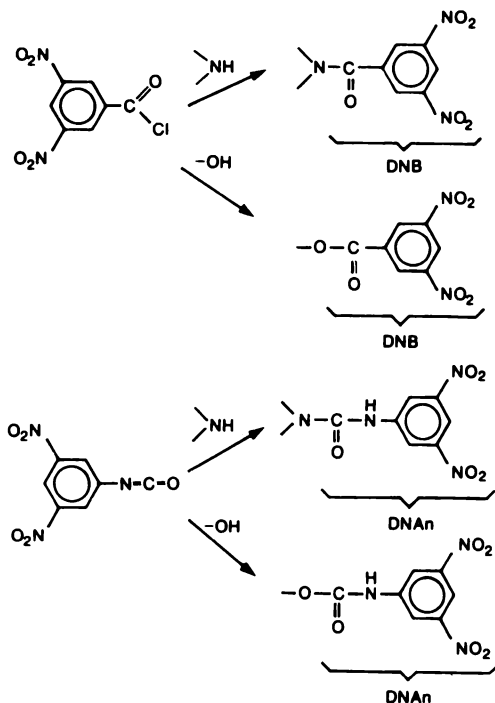
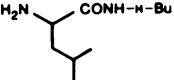
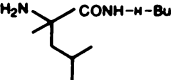
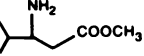


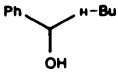

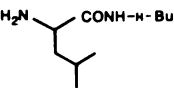


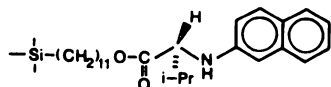
Схема 7.10. Реакции модификации, используемые для введения π -акцепторных групп в анализируемые соединения.

Приведенные в табл. 7.10 данные, показывают, что производные α -аминокислот разделяются лучше, чем соответствующие β -изомеры, и что наличие α -метильного заместителя в молекуле

Таблица 7.10. Хроматографические данные по разделению энантимеров 3,5-динитробензоильных производных некоторых аминокислот, аминов и спиртов [154] (с разрешения Am. Chem. Soc.)

Соединение	Производное ^a	<i>k'</i> (энантимера)	α	Пропанол-2 в гексане
	ДНБ	0,38(R)	17,66	10
	ДНБ	7,97	1,45	5
	ДНБ	0,93(S)	1,97	5
	ДНА	5,87(S)	1,19	5
	ДНА	3,27(R)	1,33	20
	ДНА	3,19(R)	1,24	5
	ДНА	5,35(R)	1,22	5
	ДНБ	9,0 (R)	2,61	Обращенно-фазовые условия: метанол (50%)-вода

ДНБ: 3,5-динитробензоил-, ДНА: 3,5-динитроанилидо-, ХНФ:



α -аминокислоты весьма неблагоприятно сказывается на хиральном распознавании энантиомеров. Следует отметить, что очень простые по строению алифатические амины и аминокспирты были успешно разделены этим методом в виде их ДНА-производных. В более полярных растворителях наблюдается заметное падение разделяющей способности сорбентов. И хотя на хроматографический процесс в этих системах влияют многие факторы, вполне обоснованно предположить, что в обращенно-фазовых системах заметный вклад в общее удерживание сорбата вносят гидрофобные взаимодействия. Чаще всего этот вклад не является селективным. И вероятнее всего именно им обусловлено сильное увеличение значения k' производных α -аминокислот с возрастанием полярности подвижной фазы, сопровождающееся одновременно резким снижением значения α , но при сохранении порядка элюирования.

Последующее использование правила обратимости привело к созданию ряда новых хиральных селекторов, связанных с носителем и работающих по принципу π -доноров, таких, как ХНФ на основе гидантоинов [156], арилалкиламинов [157—162] и фталимидов [163]. В обзоре [164] рассмотрены принципы обратимости и значение конкурентности (в противоположном смысле) в процессах хирального распознавания.

7.2.4. ХИРАЛЬНЫЕ СЕЛЕКТОРЫ, РАБОТАЮЩИЕ ПО ПРИНЦИПУ ОБРАЗОВАНИЯ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ

Перенеся используемый в газовой хроматографии принцип разделения энантиомеров на хиральных амидных неподвижных фазах, а именно принцип многоточечного образования водородных связей, на жидкостную хроматографию Хара и соавт. [165—167] синтезировали серию хиральных селекторов для разделения энантиомеров. Они предположили, что образование водородных связей с жидкой неподвижной фазой в хиральной ГХ по методу Чарла и др. [168] (см. разд. 6.1.1) можно реализовать и в ЖХ, если применить неполярную подвижную фазу. Предложенный принцип разделения через образование диастереомерных комплексов сорбат—лиганд, включающих две водородные связи, показан на рис. 7.16.

Селекторы были синтезированы из L-валина и D-винной кислоты как исходных оптически активных реагентов. Различные N-ацильные производные L-валина были ковалентно связаны с 3-аминопропилсиликагелем. Из винной кислоты были получены как связанные аналогичным образом через амидную связь изопропиламиды, так и несвязанный селектор—диизопропиламид винной кислоты

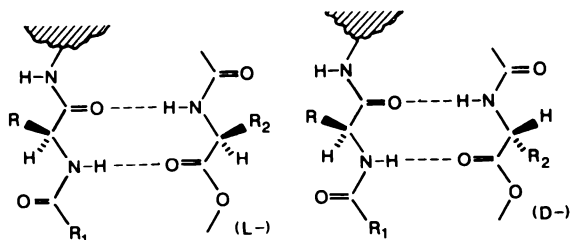


Рис. 7.16. Диастереомерный сорбционный комплекс, образующийся в результате двухточечного водородного связывания.

[(R, R)-ДИПАВК], который использовался в виде добавок в подвижную фазу. Различные типы селекторов приведены на схеме 7.11.

Как и ожидалось, на ХНФ с N-ацил-L-валином можно осуществлять разделение энантиомеров N-аминаминокислот в неводных подвижных фазах (обычно смесь гексана и пропанола-2) [169]. Оптимальные результаты при разделении ряда метиловых эфиров N-ацетиламинокислот были получены на (N-формил-L-валиламино)пропил-силикагеле. В дальнейшем повышение значения α было достигнуто

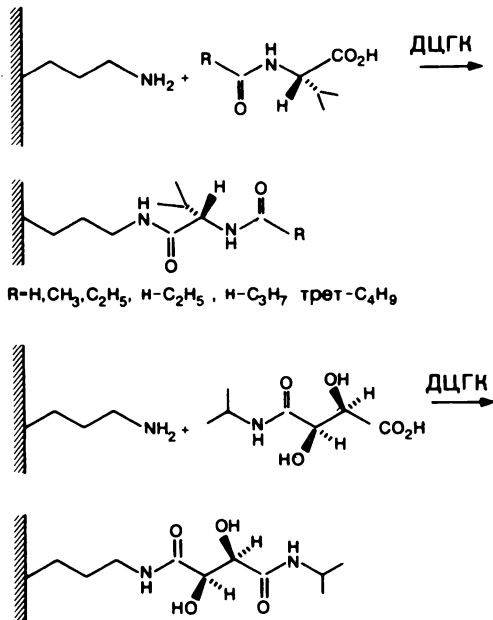


Схема 7.11. Метод закрепления хирального селектора, способного образовывать водородные связи.

заменой метиловых эфиров на *трет*-бутиловые. D-Энантиомер всегда элюируется перед L-энантиомером. Это означает, что ассоциация сорбента с сорбатом для наиболее прочно удерживаемого энантиомера может быть представлена так, как она показана на рис. 7.16. Интересно, что та же самая стереохимия наблюдается и в том случае, когда N-ацетил-L-валин-*трет*-бутиламид добавляют в элюент в качестве хирального селектора. В этой стереохимической модели ассоциации предполагается, что в комплексе, соответствующем более прочно удерживаемому энантиомеру, оба α -аминокислотных заместителя располагаются по одну сторону и направлены от поверхности силикагелевой матрицы.

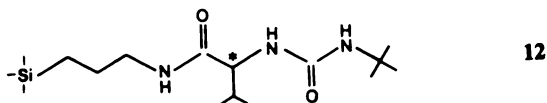
Наблюдаемое влияние состава подвижной фазы является довольно сложным и согласуется с моделью ассоциации, основанной на образовании водородных связей. Коэффициент емкости, как это и следовало ожидать, возрастает с уменьшением содержания в элюенте пропанола-2, поскольку уменьшается конкуренция со стороны растворителя за связывающие центры ХНФ. Тот же самый эффект можно получить, сменив пропанол-2 на менее конкурентоспособный апротонный растворитель типа хлороформа, метиленхлорида или диэтилового эфира.

Число возможных водородных связей заметно возрастает при переходе к селектору на основе винной кислоты. В этом случае, кроме того, наблюдается еще и большая конформационная подвижность, которая придает структуре большую изменчивость, что допускает ассоциацию с широким кругом соединений и, следовательно, более широкую энантиоселективность. Поскольку (R, R)-ДИПАВК был с успехом использован в качестве хиральной добавки в подвижную фазу (см. разд. 7.3), был синтезирован иммобилизованный селектор такого же типа, структурно совершенно аналогичный (R, R)-ДИПАВК.

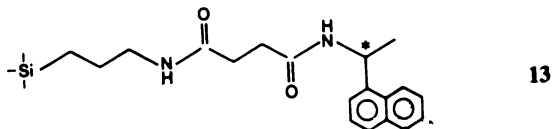
7.2.5. ДРУГИЕ ТИПЫ СЕЛЕКТОРОВ

Механизм хирального распознавания энантиомеров на связанных с матрицей хиральных селекторах, описанных в разд. 7.2.1.—7.2.4, изучен довольно хорошо. Однако в настоящее время синтезирован целый ряд других селекторов [170—179], механизм действия которых более сложен и менее изучен.

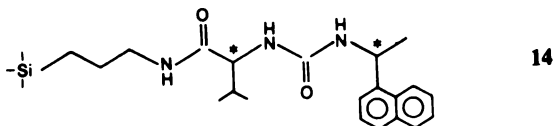
Весьма многообещающие ХНФ на основе амидов [175—177] или мочевины [178, 179] получены Ои и сотр. Все фазы последнего типа содержат асимметрический атом углерода, связанный непосредственно с атомом азота мочевины (12), (15), схема 7.12. Так, соедине-



12



13



14

Схема 7.12. Амидные и мочевиные хиральные селекторы, разработанные Ои.

ние (12) содержит L-валин в качестве хирального компонента [связанного с 3-аминопропилсиликагелем в виде N-(*трет*-бутиламинокарбонил)производного], (13) содержит хиральный 1- α -нафтил)этиламинный заместитель, а (14) имеет оба хиральных фрагмента.

Наиболее вероятно, что фаза (12), которая по своей структуре аналогична диамидным фазам, используемым в ГХ, и фазам Хары, получившим распространение в ЖХ, действует главным образом благодаря образованию водородных связей и стерических эффектов. Однако данные по применению фазы (13) указывают, что в этом случае имеет место также влияние образования комплексов с переносом заряда, поскольку наблюдается разделение соединений с π -акцепторными заместителями. Интересно, что, как показал Ои, фаза (14), которая содержит оба хиральных центра, применима к более широкому кругу соединений. Она дает особенно хорошее разделение N-3,5-динитробензоилпроизводных аминокислот, 3,5-динитроанилидов карбоновых кислот и 3,5-динитрофенилкарбаматов спиртов. Некоторые эфиры и спирты хорошо разделяются непосредственно, без предварительной дериватизации.

7.3. МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ВВЕДЕНИИ ХИРАЛЬНОГО ЛИГАНДА В ПОДВИЖНУЮ ФАЗУ

Современные сорбенты, применяемые в обращенно-фазовой ВЭЖХ (силикагели с привитыми углеводородами C_2-C_{18}), являются прекрасным материалом для получения высокоэффективных ко-

лонок. Метод введения добавок в подвижную фазу с целью регулирования удерживания сорбата широко распространен в настоящее время в обращенно-фазовой ЖХ. Фактически он основан на хорошо известном явлении образования ионных пар в органических средах, когда распределение положительно заряженного сорбата, подобного протонированному амину, определяется главным образом природой противоиона (см. разд. 5.2). В присутствии оптически активного противоиона образуются диастереомерные ионные пары, которые можно успешно разделять на обычной обращенно-фазовой колонке. Как указывалось выше, метод введения добавок амфифильных соединений можно рассматривать как своего рода динамическое нанесение этого соединения на ахиральный сорбент, т. е. физическую иммобилизацию амфифильного компонента. Если эта добавка является оптически активной, ахиральный сорбент превращается в хиральный.

В соответствии с этим принципиального различия между описанными выше методами и теми методами, которые рассматриваются в этом разделе, не существует. Так, фаза Пиркла, связанная ионной связью с носителем (см. разд. 7.2.3), является превосходной ХНФ, если она используется в сочетании с неполярными растворителями, так как в этом случае подвижная фаза проявляет очень небольшую тенденцию к вытеснению хирального селектора с сорбционных центров. В этих условиях добавки хирального селектора к подвижной фазе не являются обязательными. Если же селектор закреплен на алкилсиликагеле или другой гидрофобной матрице, вследствие наличия сильных гидрофобных взаимодействий ситуация может быть вполне аналогичной, но все же необходимость сохранения постоянной степени покрытия матрицы обычно требует присутствия селектора в подвижной фазе.

Многие из уже описанных принципов образования ковалентно-связанных хиральных фаз можно реализовать путем добавления хирального селектора в подвижную фазу. Все системы такого типа можно разделить на три группы: системы, в которых происходит образование комплексов металлов (ХЛОХ), системы с добавками различных незаряженных соединений и, наконец, ион-парные системы, предназначенные для разделения заряженных соединений.

7.3.1. КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С МЕТАЛЛАМИ

Каргер [180, 181] первым ввел в ХЛОХ комплексообразование с ионами металлов. При помощи хиральных триаминов (L-2-этил и L-2-изопропил-4-октилдиэтилентриамин, каждый из которых содер-

жит гидрофобный заместитель C_8) в качестве добавок к подвижной фазе в присутствии $Zn(II)$ и других ионов переходных металлов была успешно разделена серия дансильных производных аминокислот на колонке с обращенной фазой C_8 . Аналогичная система с L -пропил- N -октиламидом и $Ni(II)$ позволила успешно осуществить аналогичные separations на обращенной фазе C_{18} [182].

Этот метод был детально изучен Даванковым и соавт. [130], поставившими перед собой задачу разработать способ аналитического и препаративного разделения немодифицированных аминокислот. Хроматографирование велось на колонках с силикагелем C_{18} , на который предварительно были нанесены N -алкил- L -оксипролины (C_7 , C_{10} и C_{16}); подвижной фазой служил раствор ацетата меди(II) (0,1 мМ) в смеси метанол/вода (15/85 по объему). Все добавки удерживались на сорбенте C_{18} благодаря сильным гидрофобным взаимодействиям и не вымывались из колонки. Таким образом, в данном случае, если содержание воды в элюенте было достаточно высоким, хиральные добавки в подвижной фазе могли отсутствовать. Предполагаемая структура образующегося при этом гетеролигандного комплекса показана на рис. 7.17.

Как выяснилось, уменьшение длины алкильной цепи обычно приводит к увеличению селективности. Причина этого не вполне ясна, поскольку количество хиральной добавки, сорбированной на носителе, определено не было. Влияние состава подвижной фазы на разделение в целом выглядит следующим образом: а) возрастание

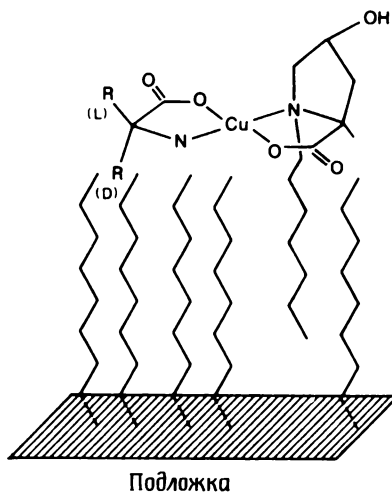


Рис. 7.17. Предполагаемая структура гетеролигандного сорбционного комплекса.

pH (выше 5,5) приводит к увеличению удерживания и селективности; б) уменьшение концентрации Cu(II) вызывает возрастание удерживания, но мало влияет на селективность; в) увеличение концентрации ацетата аммония сильно уменьшает удерживание и оказывает довольно сложное влияние на разделение.

Как указывалось ранее (см. разд. 7.2.2), относительная стабильность гетеролигандных сорбционных комплексов, образующихся в ХЛОХ, в значительной степени зависит от метода их иммобилизации. В данном случае, когда хиральный лиганд физически сорбирован вследствие гидрофобных взаимодействий, для всех аминокислот $k'(\text{L}) < k'(\text{D})$. Если исходить из результатов экспериментов, то с учетом влияния подвижной фазы механизм энантиоселективного распознавания должен соответствовать представленному на рис. 7.17. N-Алкильные цепи хирального лиганда, по-видимому, должны ориентироваться параллельно цепям C_{18} неподвижной фазы. При координации с Cu(II) фиксированный лиганд принимает такую конформацию, что оксипирролидиновое кольцо и его N-алкильный заместитель располагаются по разные стороны от основной координационной плоскости хелатного комплекса. Таким образом, в гетеролигандном сорбционном комплексе, образованном D-энантиомером разделяемого соединения, α -заместитель в молекуле энантиомера должен быть направлен в сторону гидрофобной (C_{18}) поверхности сорбента. Это приведет к стабилизации такой структуры вследствие гидрофобных взаимодействий. В то же время L-энантиомер лишен подобной возможности, так как его α -алкильный радикал направлен в сторону подвижной фазы и он элюируется быстрее, чем D-энантиомер.

Те же принципы использованы и в методе, основанном на модификации алкилсиликагеля N-децил-L-гистидином [183]. Коэффициент разделения в этой системе обычно ниже, чем в системе с N-алкил-L-оксипролином, но все же достаточно высок, чтобы таким способом можно было осуществлять разделение энантиомеров. Как и в предыдущем случае, самая высокая энантиоселективность обнаружена у аминокислот с наибольшими по размеру α -заместителями (алкильные или арильные группы).

Если у хирального лиганда отсутствует заместитель с длинной алкильной цепью, отсутствуют и сильное гидрофобное взаимодействие с алкилсиликагелем, и закрепление лиганда вследствие физической сорбции. Соответственно хроматографический процесс в этом случае лучше рассматривать как образование и разделение диастереомерных комплексов в режиме обращенно-фазовой хроматографии. В последние годы разработаны самые разнообразные

Таблица 7.11. Хиральные комплексы металлов, используемые как добавки в подвижную фазу при разделении оптических изомеров методом ХЛОХ

Селектор	Ион ме-талла	Неподвижная фаза	Анализируемые соединения	Литература
L-Пролин	Cu^{2+}	Октилсиликагель	Аминокислоты	184—186
L-Пролин	Cu^{2+}	Октилсиликагель	Дансиламинокислоты	187
L-Пролин	Cu^{2+}	Силикагель	Гормоны щитовидной железы	188
L-Пролин	Cu^{2+}	Катионообменник	Аминокислоты	189
L-Гистидин	Cu^{2+}	Октилсиликагель	Аминокислоты	186, 189
L-Гистидина метиловый эфир	Cu^{2+}	Октадецилсиликагель	Аминокислоты	191, 192
L-Аргинин	Cu^{2+}	Октилсиликагель	Аминокислоты	186
L-Фенилаланин	Cu^{2+}	Октадецилсиликагель	Ароматические аминокислоты	188
L-Фенилаланин	Cu^{2+}	Октадецилсиликагель	Миндальная кислота	193
L-Аспарагиновая кислота	Cu^{2+}	Октадецилсиликагель	Аминокислоты	194—196
Моноалкиламиды				
L-аспарагил-L-фенилаланина метилового эфира (аспартам)	Cu^{2+} , Zn^{2+}	Октадецилсиликагель	Аминокислоты	197, 198
N, N-Дипропил-L-аланин	Cu^{2+}	Октадецилсиликагель	Дансиламинокислоты	199—202
N, N-Диалкил-L-аминокислоты	Cu^{2+}	Октадецилсиликагель	Метиламинокислоты	203
N-(<i>n</i> -Тозил)-L-(и D-) фенилаланин	Cu^{2+}	Октадецилсиликагель	Аминокислоты	204, 205
L-Аминокислоты	Cu^{2+}	Октадецилсиликагель	Оксикислоты	206
Монооктиламид (R, R)-винной кислоты	Cu^{2+} , Zn^{2+}	Октадецилсиликагель	Аминокислоты	207

методы, основанные на принципе образования хиральных комплексов металлов в подвижной фазе (табл. 7.11).

7.3.2. ДОБАВЛЕНИЕ НЕЙТРАЛЬНЫХ ХИРАЛЬНЫХ ЛИГАНДОВ В ПОДВИЖНУЮ ФАЗУ

Как указывалось в разд. 7.2.4, многие диамидные ХНФ способны к энантиоселективному образованию водородных связей и, следовательно, могут быть полезны как добавки к элюенту в режиме нормально-фазовой хроматографии с неполярной подвижной фа-

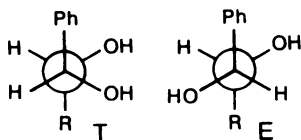
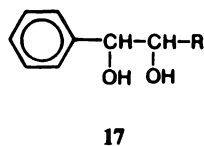
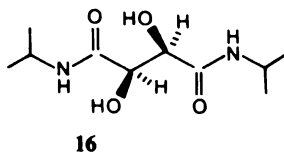
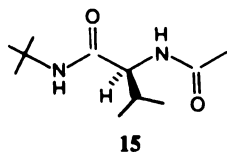


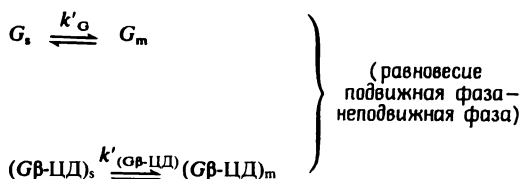
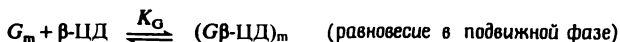
Схема 7.13. Значение конформационной стабильности для проявления влияния заместителя в *эритро*- и *трео*-изомерах на величину α .

зой. В этих условиях такие добавки сильно адсорбируются на поверхности силикагеля, который в данном случае можно рассматривать как покрытый ХНФ. В частности, N-ацетил-L-валин-*трет*-бутиламид (15) и (R, R)-ДИПАВК (16, см. разд. 7.2.4) оказались весьма полезными при разделении различных полярных соединений в описанных условиях [208—211]. В свете современных представлений о хиральном распознавании поведение *трео*- и *эритро*-форм сорбата, имеющего 1,2-диольную структуру (представленную соединением (17)), вполне обоснованно. В то время как *трео*-соединение (Т) показывает увеличение селективности разделения с увеличением размеров заместителя R, для *эритро*-формы (Е) наблюдается прямо противоположная картина. Это вполне понятно, если рассмотреть предпочтительную конформацию этих двух форм (схема 7.13), которые становятся тем более значимыми, чем выше стерические требования R. Ведь поскольку между сорбатом и ХНФ образуется двухточечная водородная связь, необходима *гош*-конформация обеих гидроксильных групп в (17), что хорошо согласуется с экспериментальными данными.



В качестве нейтральных хиральных добавок к элюенту также опробованы циклодекстрины (ЦД), преимущественно в виде β -формы. Обычно ЦД используют в обращенно-фазовом режиме с силикагелем C_{18} и водными буферными элюентами [212—214]. Первые исследования, проведенные с замещенными миндальными кислотами, показали, что заместитель оказывает очень сильное влияние на разделение и что удерживание падает с ростом pH или концентрации β -ЦД. Полное разделение энантиомеров $\alpha = 1,8$ для *о*-хлорминдальной кислоты наблюдалось в буфере при pH 2,1 и концентрации β -ЦД 14,4 мМ, в других условиях селективность была низкой и падала с ростом pH.

Дальнейшее изучение механизма энантиоселективности при разделении этим методом выполнено на ряде барбитуратов и родственных соединений [215]. Авторы этого исследования исходили из предположения, что сорбат (Г) присутствует в незаряженной форме ($pH < pK_a$), что он образует с молекулой ЦД комплекс включения состава 1:1 и что при добавлении β -ЦД свойства сорбента не меняются. Исходя из этих предположений можно записать следующие равновесия:



Такая система должна иметь наблюдаемый коэффициент емкости k' , который можно представить следующим выражением:

$$k' = \frac{k'_G + k'_{(G\beta\text{-ЦД})} K_G [\beta\text{-ЦД}]}{1 + K_G [\beta\text{-ЦД}]} \quad (7.3)$$

в результате перегруппировки которого получаем

$$k' = \frac{k'_G - k'}{K_G [G\beta\text{-ЦД}]} + k'_{(G\beta\text{-ЦД})} \quad (7.4)$$

Зависимость k' от $(k'_G - k')/[\beta\text{-ЦД}]$ имеет линейный характер, что и следовало ожидать исходя из уравнения (7.4) при наличии стехиометрии комплекса 1:1. Величину k'_G легко определить экспериментально как k' в отсутствие β -ЦД. Значения K_G и $k'_{(G\beta\text{-ЦД})}$ для обоих энантиомеров легко определить из угла наклона этой прямой и точки пересечения ее с осью абсцисс. Интересно, что в рассмотренном в работе [215] примере такие расчеты приводят к выводу, что барбитураты разделяются на оптические изомеры благодаря различию констант стабильности (K_G) диастереомерных комплексов включения с β -ЦД, так как рассчитанные значения $k'_{(G\beta\text{-ЦД})}$ близки к нулю (фактически они имеют даже небольшие отрицательные значения). Следовательно, прочнее удерживается тот энантиомер, который образует менее прочный комплекс.

В то же время разделение замещенных гидантоинов (мефенитои-

нов) происходит в основном благодаря различию в удерживании диастереомерных комплексов включения с β -ЦД, так как рассчитанные значения $k'_{(G\beta\text{-ЦД})}$ различаются примерно в 3 раза. Однако обнаруженное небольшое различие в K_G приводит к уменьшению α . Такое отличие в поведении было объяснено неполным вхождением гидантоина в полость β -ЦД, причем разным для двух энантиомеров. Удерживание же обусловлено главным образом той частью молекулы, которая выступает из полости.

Даже если для полной проверки предложенного механизма необходимы дальнейшие эксперименты, проведенный анализ отчетливо демонстрирует важное значение устойчивости комплекса. В соответствии с этим наблюдением разделение энантиомеров может быть обусловлено одним или сразу двумя следующими факторами:

- 1) различием в константах стабильности комплексов $K_{(-)-G}$ и $K_{(+)-G}$ и
- 2) различием в удерживании комплексов, т. е. их адсорбцией на сорбенте, $k'_{(-)\text{-комплекс}}$ и $k'_{(+)\text{-комплекс}}$.

Следует также иметь в виду, что оба этих эффекта могут действовать в противоположных направлениях и в предельном случае это приведет к $\alpha = 1$.

7.3.3. ИОН-ПАРНЫЕ ДОБАВКИ

Логическим развитием метода ион-парной хроматографии [216, 217] явилось использование хирального противоиона (+)-10-камфорсульфокислоты в качестве хиральной добавки к подвижной фазе для разделения энантиомеров некоторых аминоспиртов [218]. Аминоспирты в протонированной форме образуют с анионом камфорсульфокислоты вследствие электростатических взаимодействий диастереомерные комплексы. Предполагается, что в комплексе между партнерами возможны и другие типы взаимодействий, и в первую очередь образование водородной связи между кетогруппой и гидроксильной группой, что также влияет на наблюдаемое различие в хроматографическом удерживании (рис. 7.18). Разделение бы-

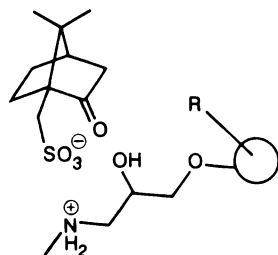


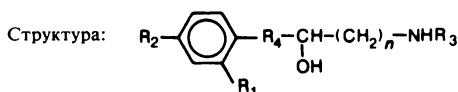
Рис. 7.18. Предполагаемая модель взаимодействия камфорсульфонат-иона и аминоспирта, позволяющая объяснить наблюдаемую в хроматографических системах энантиоселективность.

ло проведено в режиме нормально-фазовой хроматографии на силикагеле или диольной фазе [219] с использованием метиленхлорида с небольшими добавками полярного модификатора.

Метиленхлорид является прекрасным растворителем для ион-парной хроматографии, и разделение энантиомеров по этому методу следует рассматривать как разделение лабильных диастереомерных ион-парных комплексов, т. е. хиральная дискриминация происходит в подвижной фазе. Как и следовало ожидать, коэффициент емкости заметно снижается с увеличением концентрации полярного компонента в подвижной фазе.

Наличие двухточечного взаимодействия, необходимого для проявления энантиоселективности, подтверждают данные о влиянии структурных особенностей сорбата на селективность разделения (табл. 7.12). Разделения оптических изомеров не происходит, если между гидроксильной и аминогруппой находится более двух углеродных атомов или если гидроксильная группа отсутствует. Далее, оксипренолол (18а) разделить этим методом вообще не удалось, вероятно из-за наличия внутримолекулярной водородной связи

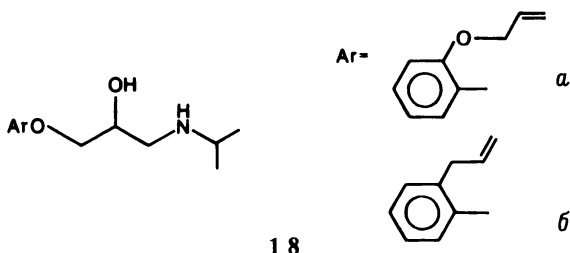
Таблица 7.12. Селективность разделения некоторых аминспиртов хиральной ион-парной хроматографией с камфорсульфонатом в качестве противоиона [219] (с разрешения изд-ва)



n	R_1	R_2	R_3	R_4	α
1	H	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	OCH_2	1,09
2	H	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	OCH_2	1,00
3	H	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	OCH_2	1,00
1	H	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	—	1,09
1	H	$\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	OCH_2	1,08
1	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	H	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	OCH_2	1,08
1	$\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	H	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	OCH_2	1,00
1	H	OCH_3	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	OCH_2	1,08
1	H	CH_2CH_3	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	OCH_2	1,09
1	H	$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	OCH_2	1,09
1	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	H	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_4\text{CONH}_2$	OCH_2	1,11
1	Cl	H	$\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_4\text{CONH}_2$	OCH_2	1,11
1	Br	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	$\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_4\text{CONH}_2$	OCH_2	1,11
1	CH_3	H	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	OCH_2	1,00
1	H	H	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$	OCH_2	1,00

Неподвижная фаза лихросорб диол, подвижная фаза (+)-10-камфорсульфоуксусная кислота (2,2 мМ) в смеси метиленхлорид/пентанол-1, (199:1) $\alpha = k'(-)/k'(+)$.

между гидроксильной группой и кислородным атомом аллилокси-группы.



18

Более хорошие результаты были достигнуты при использовании в качестве хирального противоиона N-защищенного дипептида (N-карбобензоксикарбонилглицил-L-пролина). В этом случае для некоторых аминокспиртов величина α достигала значения 1,4) [220].

Этот результат побудил в соответствии с правилом обратимости использовать оптически активные аминокспирты в качестве хиральных противоионов для разделения энантиомеров сульфо- и карбоновых кислот. Как выяснилось, алпренолол (186), у которого связывающая группа соединена с подвижной алкильной цепью, показывает низкую степень энантиоселективности [221], но она значительно возрастает, если роль хиральных противоионов выполняют соединения жесткого циклического строения, такие как хинин, хинидин или цинхонидин [222].

Этот и родственные ему методы разделения рассматриваются в обзоре Петтерсона и Шилла [223].

Хотя применение хиральных противоионов для разделения энантиомеров описанным методом оказалось в ряде случаев вполне успешным, эта хроматографическая система является довольно сложной, поскольку на разделение и удерживание влияет очень много факторов, которые не всегда легко интерпретировать [222]. Приведем некоторые наиболее существенные факторы.

1. Хроматографический сорбент. Поверхностные свойства высокополярного силикагелевого сорбента являются исключительно важными, и, как выяснилось, предпочтительнее проводить разделение на диольной фазе (которая представляет собой модифицированный силикагель с гидрофильными свойствами).

2. Содержание воды в подвижной фазе. Этот параметр также является исключительно важным вследствие сильного влияния на удерживание и разделение. Рекомендуемое содержание воды в подвижной фазе $(80-90) \cdot 10^{-7}\%$ [222]. При более высоком содержании воды разделение не происходит. В то же время небольшие коли-

чества воды необходимы для дезактивации поверхности силикагеля, которая в противном случае может слишком сильно сорбировать полярные компоненты.

3. Отношение коэффициентов емкости энантиомеров. Его величина обычно уменьшается с увеличением концентрации противоионов, что объясняется конкуренцией противоиона и ионной пары за одни и те же сорбционные центры на поверхности сорбента.

4. Полярные компоненты подвижной фазы. Эти соединения, например пентанол-1, вызывают резкое уменьшение удерживания сорбата, обычно сопровождающееся и ухудшением разделения. Последнее, как полагают, обусловлено конкуренцией за группы в ион-парных компонентах, способных к образованию водородных связей, что в свою очередь приводит к понижению селективности.

5. Оптическая частота компонента, добавляемого в подвижную фазу. Этот параметр безусловно влияет на разделение. Легко показать, что

$$\alpha_{\text{набл}} = \frac{\alpha P + (100 - P)}{\alpha(100 - P) + P} \quad (7.5)$$

где P — доля (%) одного из энантиомеров в компоненте, добавляемом в подвижную фазу, и $\alpha_{\text{набл}}$ — наблюдаемый коэффициент разделения [224]. Отметим, что P не равна оптической частоте, которая при $P = 50$ равна нулю.

В статье [225] описан другой метод ион-парной хроматографии с (+)-дибутилтарtratом (ДБТ) в качестве хиральной добавки. В основу метода положены исследования Прелога и др. [226], изучавших распределение энантиомерных аминокислот в виде ионных пар в присутствии эфиров винной кислоты и обнаруживших не одинаковое распределение энантиомеров между фазами.

В хроматографическом методе ДБТ физически сорбитуется из водной подвижной фазы. Механизм разделения в этом случае еще не вполне ясен.

Рекомендуемая литература

- Audebert R.* Direct Resolution of Enantiomers in Column Liquid Chromatography, *J. Liquid Chromatog.*, **2**, 1063 (1979).
Blaschke G. Chromatographische Racemattrennung, *Angew. Chem.*, **92**, 14 (1980), (Int. Ed., 19, 13 (1980)).
Davankov V. A. Resolution of Racemates by Ligand—Exchange Chromatography, *Adv. Chromatog.*, **18**, 139 (1980).
Lindner W. Resolution of Optical Isomers by Gas and Liquid Chromatography, in *Chemical Derivatization in Analytical Chemistry*, Vol. 2, *R. W. Frei and J. F. Lawrence* (eds.), Plenum, New York, 1982, p. 145.

- Davankov W. A., Kurganov A. A., Bochkov A. S.* Resolution of Racemates by High Performance Liquid Chromatography, *Adv. Chromatog.*, **22**, 71 (1983).
- Pirkle W. H., Finn J.* Separation of Enantiomers by Liquid Chromatographic Methods, in *Assymmetric Synthesis*, Vol. 1, J. D. Morrison (ed.), Academic Press, New York, 1983.
- Allenmark S.* Recent Advances in Methods of Direct Optical Resolution, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **9**, 1 (1984).
- Armstrong D.* Chiral Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers: A Mini-Review, *J. Liquid Chromatog.*, **7** (Suppl. 2), 353 (1984).
- Souter R. W.* Chromatographic Separation of Stereoisomers, CRC Press, Boca Raton, 1985.
- Armstrong D. W.* Optical Isomer Separation by Liquid Chromatography *Anal. Chem.*, **59**, 84A (1987).
- Hinze W. L., Armstrong D. W.* (eds.) *Ordered Media in Chemical Separations*, ACS, Washington DC, 1987.
- Lindner W.* Recent Developments in HPLC Enantioseparation — A selected Review, *Chromatographia*, **24**, 97 (1987).
- Okamoto Y.* Separate Optical Isomers by Chiral HPLC, *Chemtech.*, 1987, 176.

Цитируемая литература

1. *Henderson G. M., Rule H. G.* *Nature*, **141**, 917 (1938).
2. *Prelog V., Wieland P.* *Helv. Chim. Acta*, **27**, 1127 (1944).
3. *Dent C. E.* *Biochem. J.*, **43**, 169 (1948).
4. *Kotake M., Sakan T., Nakamura N., Senoh S.* *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2973 (1951).
5. *Dalglisch C. E.* *Biochem. J.*, **52**, 3 (1952).
6. *Dalglisch C. E.* *J. Chem. Soc.*, 1952, 3940.
7. *Weichert R.* *Arkiv. Kemi*, **31**, 517 (1970).
8. *Contractor S. F., Wragg W.* *Nature*, **208**, 71 (1965).
9. *Alebic-Kolbah T., Rendic S., Fuks Z., Sunijc V., Kajfez F.* *Acta Pharm. Jugoslav.*, **29**, 53 (1979).
10. *Allenmark S.* *Chem. Ser.*, **20**, 5 (1982).
11. *Battista O. A.* *Microcrystal Polym. Sci.*, Mc Grow-Hill, New York, 1975.
12. *Рогожин С. В., Даванков В. А.* *Усп. хим.*, **37**, 565 (1968).
13. *Bach K., Haas J. J.* *Chromatog.*, **136**, 186 (1977).
14. *Yuasa S., Shimada A.* *Sci. Rep. Coll. Gen. Educ. Osaka Univ.*, **13**, Nos. 1–2, 13 (1982).
15. *Gubitz G., Jellenz W., Schonleber D.* *J. High Resol. Chromatog., Chromatog. Commun.*, **3**, 31 (1980).
16. *Yuasa C., Shimada A., Kameyama K., Yasui M., Adzuma K.* *J. Chromatog. Sci.*, **18**, 311 (1980).
17. *Yuasa C., Itoh M., Shimada S.* *J. Chromatog. Sci.*, **22**, 288 (1984).
18. *Chimiak A., Polonski J.* *J. Chromatog.*, **115**, 635 (1975).
19. *Frank B., Schlingloff G.* *Liebigs Ann. Chem.*, **659**, 123 (1962).
20. *Frank B., Blaschke G.* *Liebigs Ann. Chem.*, **695**, 144 (1966).
21. *Mayer W., Merger F.* *Liebigs Ann. Chem.*, **644**, 651 (1961).
22. *Philipp B., Kunze J., Fink H.-P.* in *The Structure of Cellulose*, R. H. Attala (ed.), ACS, Washington DC 1987, p. 178.
23. *Steckelberg W., Bloch M., Musso H.* *Chem. Ber.*, **101**, 1519 (1968).
24. *Haynes R. K., Hess H., Musso H.* *Chem. Ber.*, **107**, 3733 (1974).
25. *Hess H., Burger G., Musso H.* *Angew Chem.*, **90**, 645 (1978).
26. *Krebs H., Wagner J. A., Diewald J.* *Chem. Ber.*, **89**, 1875 (1956).
27. *Krebs H., Schumacher W.* *Chem. Ber.*, **99**, 1341 (1966).

28. *Schardinger F.* Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk., Abt. II, **22**, 98 (1908) (Chem. Zentralbl. 1909, 68).
29. *Bender M. L., Komiyama M.* Cyclodextrin in Chemistry, Springer-Verlag, Berlin, 1978.
30. *Hinze W. L.* Sep. Purif. Methods, **10**, 159 (1981).
31. *Armstrong D. W.* Liquid Chromatog., **3**, 895 (1980).
32. *Hinze W. L., Armstrong D. W.* Anal. Lett., **13**, 1093 (1980).
33. *Wiedenhof N.* Staerke, **21**, 119, 164 (1969).
34. *Hoffman J. L.* Anal. Biochem., **33**, 209 (1970).
35. *Harada A., Furue M., Nozakura S.* J. Polym. Sci., **16**, 187 (1978).
36. *Zsador B., Decsei L., Scilasi M., Tudos F.* J. Chromatog., **270**, 127 (1983).
37. *Fujimura K., Ueda T., Ando T.* Anal. Chem., **55**, 446 (1983).
38. *Kawaguchi Y., Tanaka M., Funazo K., Shono T.* Anal. Chem., **55**, 1852 (1983).
39. *Armstrong D. W., Demond W.* J. Chromatog. Sci., **22**, 441 (1984).
40. *Hinze W. L., Riehl T. E., Armstrong D. W., Demond W., Alak A., Ward T.* Anal. Chem., **57**, 237 (1985).
41. *Luttringhaus A., Peters K. S.* Angew. Chem., **78**, 603 (1966).
42. *Luttginhaus A., Hess U., Rossenbaum H. J.* Z. Naturforsch., **22b**, 1296 (1967).
43. *Hesse G., Hagel R.* Chromatographia, **6**, 277 (1973).
44. *Hesse G., Hagel R.* Chromatographia, **9**, 62 (1976).
45. *Hesse G., Hagel R.* Liebigs Ann. Chem., 1976, 996.
46. *Koller H., Rimbock K. H., Mannschreck A.* J. Chromatog., **282**, 89 (1983).
47. *Mintas M., Mannschreck A.* Chem. Commun., 1979, 602.
48. *Frankotte E., Wolf R. M., Lohmann D., Mueller R. J.* Chromatog., **347**, 25 (1985).
49. *Shibata T., Nakamura H., Yuki Y., Okamoto I.* Chem. Abstr., **102**, 97219p (1985).
50. *Yuki Y., Okamoto I., Shibata T., Nakamura H.* Chem. Abstr., **102**, 26690z (1985).
51. *Shibata T., Okamoto I., Ishii K. J.* Liquid Chromatog., **9**, 313 (1986).
52. *Nakamura H., Namikoshi H., Shibata T., Okamoto I., Shimizu K.* 50 National Meeting Chemical Society of Japan, Tokyo, April 1985, Abstr. 4208.
53. *Ichida A., Shibata T., Okamoto I., Yuki Y., Namikoshi H., Toda Y.* Chromatographia, **19**, 280 (1984).
54. *Okamoto I., Kawashima M., Hatada K.* Polymer Preprints, Japan, **33**, 597 (1984).
55. *Isaksson R., Roschester J., Sandstrom J., Wistrand L.—G.* J. Am. Chem. Soc., **107**, 4047 (1985).
56. *Blashke G.* Chem. Ber., **107**, 237, 2792 (1974).
57. *Blashke G., Donow F.* Chem. Ber., **108**, 2792 (1975).
58. *Blashke G., Schwanghart A. D.* Chem. Ber., **109**, 1967 (1976).
59. *Schwanghart A.—D., Backmann W., Blaschke G.* Chem., Ber., **110**, 778 (1977).
60. *Blaschke G., Kraft H.—P.* Makromol. Chem., Rapid Commun., **1**, 85 (1980).
61. *Blaschke G., Markgraf H.* Chem. Ber., **113**, 2031 (1980).
62. *Blaschke G., Kraft H. P., Markgraf H.* Chem. Ber., **113**, 2318 (1980).
63. *Blaschke G. J.* Liquid Chromatog., **9**, 341 (1986).
64. *Okamoto Y., Suzuki K., Ohta K., Hatada K., Yuki H.* J. Am. Chem. Soc. **101**, 4763 (1979).
65. *Okamoto Y., Suzuki K., Yuki H.* J. Polym. Sci., Chem. Ed., **18**, 3043 (1980).
66. *Okamoto Y., Shohi K., Yuki H.* J. Polym. Sci. Chem. Ed., **21**, 601 (1983).
67. *Okamoto Y., Okamoto I., Yuki H.* Chem. Lett., 1981, 835.
68. *Okamoto Y., Honda S., Okamoto I., Yuki H., Murata S., Noyori R., Takaya H.* J. Am. Chem. Soc., **103**, 6971 (1981).
69. *Yuki H., Okamoto Y., Okamoto I.* J. Am. Chem. Soc., **102**, 6356 (1980).
70. *Okamoto Y., Okamoto I., Yuki H.* J. Polym. Sci. Chem. Ed., **19**, 451 (1981).

71. Okamoto Y., Hatada K. J. Liquid Chromatog., **9**, 369 (1986).
72. Okamoto Y., Ishikura M., Hatada K., Yuki H., Polym. J., **15**, 851 (1983).
73. Okamoto Y., Honda S., Yashima E., Yuki H. Chem. Lett., 1981, 1221.
74. Okamoto Y., Yashima E., Hatada K. Chem. Commun., 1984, 1051.
75. Pauling L. Chem. Eng. News, **27**, 313 (1949).
76. Wulf G., Wesper W., Grobe-Einsler R., Sarhan A. Makromol. Chem., **178**, 2799 (1977).
77. Wulf G., Grobe-Einsler R., Wesper W., Sarhan A. Macromol. Chem., **178**, 2817 (1977).
78. Wulf G., Wesper W. J. Chromatog., **167**, 171 (1968).
79. Wulf G., Kemmerer R., Vietmeier J., Poll H.—G. Nouv. J. Chim., **6**, 681 (1981).
80. Wulf G., Poll H. G., Minarik M. J. Liquid Chromatog., **9**, 385 (1986).
81. Wulf G., Dederichs W., Grotstollen R., Juppe C. in Affinity Chromatography and Related Techniques, T. C. Gribnau, J. Vesser and R. J. Nivard (eds.), Elsevier, Amsterdam, 1982, p. 207.
82. Brown N. A., Janchen E., Mueller W. E., Wollert U., Mol. Pharmacol., **13**, 70 (1977).
83. Muller W. E., Wollert U. Mol. Pharmacol., **11**, 52 (1975).
84. Stewart K. K., Doherty R. F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 2850 (1973).
85. Lagencrantz C., Larsson T., Karlsson H. Anal. Biochem., **99**, 352 (1979).
86. Lagencrantz C., Larsson T., Denfors I. Comp. Biochem. Physiol., **69C**, 375 (1981).
87. Allenmark S., Bomgren B., Boren H. J. Chromatog., **237**, 473 (1982).
88. Allenmark S., Bomgren B. J. Chromatog., **252**, 297 (1982).
89. Allenmark S., Bomgren B., Boren H. J. Chromatog., **264**, 63 (1983).
90. Allenmark S., Bomgren B., Boren H. J. Chromatog., **316**, 617 (1984).
91. Allenmark S., GC, Liquid Chromatog., HPLC Mag., **3**, 348 (1985).
92. Allenmark S. J. Liquid Chromatog., **9**, 425 (1986).
93. Schmid K. in The Plasma Proteins, F. W. Putnam (ed.), Academic Press, New York, 1975, p. 184.
94. Hermansson J. Eur. Pat. Appl. No. 84850169, 8, Publ. No. EP0128886A2
95. Pike E., Skuterud E., Kierulf D., Abdel Sayed S. M., Lunde P. K. M. Clin. Pharmacokin., **6**, 367 (1981).
96. Hermansson J. J. Chromatog., **298**, 67 (1984).
97. Schill G., Wainer S. W., Barkan S. A. J. Liquid Chromatog., **9**, 641, (1986).
98. Schill G., Modin R., Borg K.—O., Persson B.—A. in Handbook of Derivatives for Chromatography, K. Blau and G. S. King (eds.), Heyden, London 1978, p. 550.
99. Tilly-Melin A., Askermark Y., Wahlund K. G., Schill G. Anal. Chem. **51**, 976 (1979).
100. Schill G., Wainer I. W., Barkan S. A. J. Chromatog., **365**, 73 (1986).
101. Hermansson J., Eriksson M. J. Liquid Chromatog., **9**, 621 (1986).
102. Vogtle F., Weber E. (eds.) Top. Curr. Chem., **121**, 1 (1984) и более ранние издания этой серии.
103. Gokel G. W., Durst H. D. Aldrichim. Acta, **9**, 3 (1976).
104. Curtis W. D., Laidler D. A., Stoddart J. F., Jones G. H. Chem. Commun., 1975, 833, 835.
105. Kyba E. P., Gokel G. W., de Jong F., Koga F., Sousa L. R., Siegel M., Kaplan L., Sogah G. D. Y., Cram D. J. Org. Chem., **42**, 4173 (1977).
106. Kyba E. P., Timko J. M., Kaplan L., de Jong F., Gokel G. W., Cram D. J. Am. Chem. Soc., **100**, 4555 (1978).
107. Sousa L. R., Sogah G. D. H., Hoffman D. H., Cram D. J. J. Am. Chem. Soc., **100**, 4569 (1978).
108. Рогожин С. В., Даванков В. А. — Докл. Акад. Наук СССР, **192**, 1288 (1970).
109. Rogozhin S. V., Davankov V. A. Chem. Commun., 1971, 490.
110. Davankov V. A., Kurganov A. A., Bochkov A. S. Adv. Chromatog., **22**, 71 (1983).

111. Davankov V. A., Zolotarev Y. A., J. Chromatog., **155**, 285 (1978).
112. Lefebvre B., Audebert R., Quivoron C. J. Liquid Chromatog., **1**, 761 (1978).
113. Muller D., Jozefonvicz J., Petit M. A. J. Inorg. Nucl. Chem., **42**, 1083 (1980).
114. Boue J., Audebert R., Quivoron C. J. Chromatog., **204**, 185 (1981).
115. Zolotarev Y., Myasoedov N., Penkina V., Petrenik O., Davankov V. J. Chromatog., **207**, 63 (1981).
116. Foucault A., Caude M., Oliveros L. J. Chromatog., **185**, 345 (1979).
117. Gubitz G., Jellenz W., Löffler G., Santi W. J. High Resol. Chromatog. Chromatog. Commun., **2**, 145 (1979).
118. Engelhardt H., Kromidas S. Naturwiss., **67**, 353 (1980).
119. Lindner W. Naturwiss., **67**, 354 (1980).
120. Sugden K., Hunter C., Lloid-Jones G. J. Chromatog., **192**, 228 (1980).
121. Gubitz G., Jellenz W., Santi W. J. Liquid Chromatog., **4**, 701 (1980).
122. Gubitz G., Jellenz W., Santi W. J. Chromatog., **203**, 377 (1981).
123. Gubitz G., Juffman F., Jellenz W. Chromatographia, **16**, 203 (1986).
124. Roumeliotis P., Unger K., Kurganov A. A., Davankov V. A. J. Chromatog., **255**, 51 (1983).
125. Roumeliotis P., Kurganov A. A., Davankov V. A. J. Chromatog., **266**, 439 (1983).
126. Feibush B., Cohen M. J., Karger B. L. J. Chromatog. **282**, 3 (1983).
127. Kurganov A. A., Tevlin A. B., Davankov V. A. J. Chromatog., **261**, 233 (1983).
128. Kicinski H. G., Kettrup A. Z. Anal. Chem., **316**, 39 (1983).
129. Gubitz G. J. Liquid Chromatog., **9**, 519 (1986).
130. Davankov V. A., Bochkov A. S., Kurganov A. A., Roumeliotis P., Unger K. Chromatographia, **13**, 677 (1980).
131. Klemm L. H., Reed D. J. Chromatog., **3**, 364 (1960).
132. Klemm L. H., Desai K. B., Spooner J. R. J. Chromatog., **14**, 300 (1964).
133. Newman M. S., Lutz W. B., Lednicer D. J. Am. Chem. Soc., **77**, 3420 (1955).
134. Newman M. S., Lutz W. B. J. Am. Chem. Soc., **78**, 2469 (1956).
135. Block P., Jr., Newman M. S. Org. Synth., **48**, 120 (1968).
136. Mikes F., Boshart G., Gil-Av E. Chem. Commun., 1976, 99.
137. Mikes F., Boshart G., Gil-Av E. J. Chromatog., **122**, 205 (1976).
138. H. Numan, R. Helder, Wynberg H. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, **95**, 211 (1976).
139. Ferigna B., Wynberg H. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, **97**, 249 (1978).
140. Kim Y. A., Tishbee A., Gil-Av E. Chem. Commun., 1981, 75.
141. Nakagawa H., Ogashiwa S., Tanaka H., Yamada K., Kawazura H. Bull. Chem. Soc. Japan, **54**, 1903 (1981).
142. Prinsen W. J., Laarhoven W. H. J. Chromatog., **393**, 377 (1987).
143. Lochmuller C. H., Rayll R. J. Chromatog., **150**, 511 (1978).
144. Mikes F., Boshart G. J. Chromatog., **149**, 455 (1978).
145. Mikes F., Boshart G. Chem. Commun., 1978, 173.
146. Pirkle W. H., Finn J. J. Org. Chem., **46**, 2935 (1981).
147. Pirkle W. H., Finn J., Schreiner J., Hamper B. J. Am. Chem. Soc., **103**, 3964 (1981).
148. Pirkle W. H., Finn J., Hamper B. C., Schreiner J., Pribish J. R. in Asymmetric Reactions and Processes in Chemistry E. L. Eliel and S. Otsuka (eds.), ACS, Washington DC, 1982, p. 245.
149. Pirkle W. H., Sikkenga D. L. J. Chromatog., **123**, 400 (1976).
150. Pirkle W. H., House D. W. J. Org. Chem., **44**, 1957 (1979).
151. Pirkle W. H., House D. W., Finn J. M. J. Chromatog., **192**, 143 (1980).
152. Pirkle W. H., Welch C. J. J. Org. Chem., **49**, 148 (1984).
153. Pirkle W. H., Pochapsky T. C., Mahler G. S., Field R. E. J. Chromatog., **348**, 89 (1985).
154. Pirkle W. H., Pocharsky T. C. J. Am. Chem. Soc., **108**, 352 (1986).

155. *Pirkle W. H., Pochapsky T. C., Mahler G. S., Corey D. E., Reno D. S., Alessi D. M.* J. Org. Chem., **51**, 4991 (1986).
156. *Pirkle W. H., Hyun M. H.* J. Chromatog., **322**, 309 (1985).
157. *Pirkle W. H., Hyun M. H.* J. Org. Chem., **49**, 3043 (1984).
158. *Pirkle W. H., Hyun M. H., Bank B. J.* Chromatog., **316**, 585 (1984).
159. *Pirkle W. H., Hyun M. H.* J. Chromatog., **322**, 287 (1985).
160. *Pirkle W. H., Hyun M. H.* J. Chromatog., **322**, 295 (1985).
161. *Pirkle W. H., Mahler G. S., Pochapsky T. C., Hyun M. H.* J. Chromatog., **388**, 307 (1987).
162. *Pirkle W. H., Alessi D. M., Hyun M. H., Pochapsky T. C.* J. Chromatog., **398**, 203 (1987).
163. *Pirkle W. H., Sowin T. J.* J. Chromatog., **396**, 83 (1987).
164. *Pirkle W. H., Dappen R.* J. Chromatog., **404**, 107 (1987).
165. *Hara S., Dobashi A.* J. High Resol. Chromatog. Chromatog. Commun. **2**, 531 (1979).
166. *Hara S., Dobashi A.* J. Liquid Chromatog., **2**, 883 (1979).
167. *Hara S., Dobashi A.* J. Chromatog., **186**, 543 (1979).
168. *Charles R., Beltler U., Felbush B., Gil-Av E.* J. Chromatog., **112**, 121, (1975).
169. *Dobashi A., Oka K., Hara S.* J. Am. Chem. Soc., **102**, 7122 (1980).
170. *Kim Y. H., Tishbee A., Gil-Av E.* J. Am. Chem. Soc., **102**, 5915 (1980).
171. *Kim Y. H., Tishbee A., Gil-Av E.* Science, **213**, 1379 (1981).
172. *Tambuti A., Begos A., Lienne M., Caude M., Rosset R.* J. Chromatog., **396**, 65 (1987).
173. *Schultze J., Konig W. A.* J. Chromatog., **355**, 165 (1986).
174. *Oi N., Kitahara H.* J. Chromatog., **265**, 117 (1983).
175. *Oi N., Nagase M., Doi T.* J. Chromatog., **257**, 111 (1983).
176. *Oi N., Nagase M., Inda Y., Doi T.* J. Chromatog., **259**, 487 (1983).
177. *Oi N., Nagase M., Inda Y., Doi T.* J. Chromatog., **265**, 111 (1983).
178. *Oi N., Kitahara H.* J. Chromatog., **285**, 198 (1984).
179. *Oi N., Kitahara H.* J. Liquid Chromatog., **9**, 511 (1986).
180. *LePage J., Lindner W., Davies G., Seitz D., Karger B. L.* Anal. Chem., **51**, 433 (1979).
181. *Lindner W., LePage J., Davies G., Seitz D., Karger B. L.* J. Chromatog., **185**, 323 (1979).
182. *Taphui Y., Miller N., Karger B. L.* J. Chromatog., **205**, 325 (1981).
183. *Davankov V. A., Bochkov S. A., Belov Y. P.* J. Chromatog., **218**, 547 (1981).
184. *Gil-Av E., Tishbee A., Hare P. E.* J. Am. Chem. Soc., **102**, 5115 (1980).
185. *Lam S., Chow F.* J. Liquid Chromatog., **3**, 1579 (1980).
186. *Las S., Chow F., Karmen A.* J. Chromatog., **199**, 295 (1980).
187. *Lam S. J.* Chromatog., **234**, 485 (1982).
188. *Oelrich E., Preush H., Wielhelm E.* J. High Resol. Chromatog. Chromatog. Commun., **3**, 269 (1980).
189. *Hare P. E., Gil-Av E.* Science, **204**, 1226 (1979).
190. *Lam S., Karmen A.* J. Chromatog., **239**, 451 (1982).
191. *Lam S., Karmen A.* J. Chromatog., **289**, 339 (1984).
192. *Lam S. J.* Chromatog., Sci., **22**, 416 (1984).
193. *Klemish W., von Hodenberg A., Vollmer K.* J. High Resol. Chromatog. Chromatog. Commun., **4**, 535 (1981).
194. *Gilon C., Leshem R., Grushka E.* J. Chromatog., **203**, 365 (1981).
195. *Gilon C., Leshem R., Grushka E.* Anal. Chem., **52**, 1206 (1980).
196. *Grushka E., Leshem R., Gilon C.* J. Chromatog., **255**, 41 (1983).
197. *Gilon C., Leshem R., Taphui Y., Grushka E.* J. Am. Chem. Soc., **101**, 7612 (1979).
198. *Gundlach G., Sattler E., Wagenbach U. Z.* Anal. Chem., **311**, 684 (1982).
199. *Weinstein S., Engel M., Hare P. E.* Anal. Biochem., **121**, 30 (1982).
200. *Weinstein S., Weiner S.* J. Chromatog., **303**, 244 (1984).

201. Grinberg N., Weinstein S. J. *Chromatog.*, **303**, 251 (1984).
202. Weinstein S. *Trends Anal. Chem.*, **3**, 16 (1984).
203. Weinstein S. *Angew. Chem., Suppl.*, 1982, 425.
204. Nimura N., Toyama A., Kinoshita T. J. *Chromatog.*, **234**, 482 (1982).
205. Nimura N., Toyama A., Kazahara Y., Kinoshita T. J. *Chromatog.*, **239**, 671 (1982).
206. Horikawa T., Sakamoto H., Tanimura T. J. *Liquid Chromatog.*, **9**, 537 (1986).
207. Lindner W. F., Hirschbock I. J. *Liquid Chromatog.*, **9**, 551 (1986).
208. Dobashi A., Dobashi Y., Hara S. J. *Liquid Chromatog.*, **9**, 243 (1986).
209. Dobashi A., Hara S. J. *Chromatog.*, **267**, 11 (1983).
210. Dobashi Y., Dobashi A., Hara S. *Tetrahedron Lett.*, **25**, 329 (1984).
211. Dobashi Y., Hara S. J. *Am. Chem. Soc.*, **107**, 3406 (1985).
212. Debowski J., Sybilska D., Jurczak J. J. *Chromatog.*, **237**, 203 (1982).
213. Debowski J., Sybilska D., Jurczak J. *Chromatographia*, **16**, 198 (1982).
214. Debowski J., Jurczak J., Sybilska D. J. *Chromatog.*, **282**, 83 (1983).
215. Sybilska D., Zukowski I., Bojarski J. J. *Liquid Chromatog.*, **9**, 591 (1986).
216. Knox J. H., Jurand J. J. *Chromatog.*, **218**, 341 (1981).
217. Knox J. H., Jurand J. J. *Chromatog.*, **234**, 222 (1982).
218. Pettersson C., Schill G., J. *Chromatog.*, **204**, 179 (1981).
219. Pettersson C., Schill G. *Chromatographia*, **16**, 192 (1982).
220. Pettersson C., Josefsson M. *Chromatographia*, **21**, 321 (1986).
221. Pettersson C., No K. J. *Chromatog.*, **282**, 671 (1983).
222. Pettersson C. J. *Chromatog.*, **316**, 553 (1984).
223. Pettersson C., Schill G., J. *Liquid. Chromatog.*, **9**, 269 (1986).
224. Pettersson C., Karlsson A., Gioeli C. J. *Chromatog. Sci.*, **407**, 217 (1987).
225. Pettersson C., Stuurman H. W. J. *Chromatog. Sci.*, **22**, 441 (1984).
226. Prelog V., Stojanac Z., Konacevic K. *Helv. Chim. Acta*, **65**, 377 (1982).

8. АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ В ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И В ПРОМЫШЛЕННЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Определение энантиомерного состава, или энантиомерной чистоты, малых количеств веществ возможно только хроматографическими методами. Наиболее достоверные результаты дает непосредственное разделение энантиомеров с помощью хиральной хроматографии без какой-либо хиральной дериватизации, предшествующей разделению (см. разд. 4.3). Поэтому данная глава посвящена главным образом аналитическому применению хроматографических методов, описанных в разд. 6 и 7.

Область их приложения быстро развивается по мере получения и исследования новых типов хиральных сорбентов. Вследствие сложности явления хирального распознавания «универсального» сорбента, который позволил бы решить все проблемы разделения оптических изомеров, не существует, каждый сорбент имеет свои преимущества, свою область применения и свои недостатки.

8.1. АМИНОКИСЛОТЫ

Определение аминокислот всегда представляло исключительно важную задачу биохимии ввиду того, что эти соединения играют роль «кирпичиков» при построении пептидов и белков. Широко применяемый, основанный на ионной хроматографии и теперь уже ставший классическим метод Мура и Штейна [1] не позволяет провести различие между энантиомерами. Между тем в хиральном аминокислотном анализе ощущается явная потребность: так, например, в пептидном синтезе решающее значение может иметь оптическая чистота исходного материала, а результаты стереохимического анализа могут искажаться из-за рацемизации. Другой областью применения *хирального* аминокислотного анализа является определение строения многих микробиологических продуктов, таких как полипептидные антибиотики, в состав которых входят D-аминокислоты, не обнаруженные у млекопитающих [2].

Хиральный аминокислотный анализ может в принципе применяться в двух различных целях. Во-первых, для определения L-

аминокислот с использованием «неприродной» D-формы в качестве внутреннего стандарта (этот метод называют методом «энантиомерной метки») и, во-вторых, для установления количественного отношения D/L-аминокислот в анализируемом образце. В дальнейшем оба варианта будут рассмотрены отдельно.

8.1.1. МЕТОД ЭНАНТИОМЕРНОЙ МЕТКИ

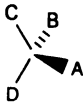


Известную проблему, особенно в биоаналитической химии, составляет определение выхода, т. е. определение процентного количества соединения после его выделения из, скажем, биологической матрицы. Выход часто определяется с помощью метода внутреннего стандарта, основное требование к которому состоит в том, чтобы он по своим свойствам был максимально близок к определяемому соединению. Очень часто эту проблему решить довольно трудно, что, естественно, влияет на достоверность результатов. Почти идеальными внутренними стандартами являются изотопно-меченные аналоги соединения, использование которых привело к исключительно важной роли масс-спектрометрического обнаружения в количественном газохроматографическом анализе. В этом случае для введения метки применяются стабильные изотопы (чаще всего дейтерированные аналоги), и вследствие высокой разрешающей способности такой системы обнаружения отношение меченого внутреннего стандарта и немеченого анализируемого образца можно определить точно. Химическое различие, обусловленное изотопным замещением, обычно пренебрежимо мало и не влияет на результаты выделения и обработки пробы. Хотя в капиллярной ГХ может наблюдаться небольшое различие во временах удерживания изомеров, меченных ^1H и ^2H , влияние изотопного замещения на удерживание обычно не проявляется ввиду очень незначительного различия в способности к образованию водородных связей с неподвижной фазой. Как и при применении стандартов, меченных радиоактивными изотопами, определение меченого и немеченого соединений основывается целиком на специфическом методе одновременного обнаружения обеих форм.

Определенным недостатком этих методов является относительно высокая стоимость многих изотопно-меченных препаратов. Кроме того, во многих случаях не так легко получить необходимые стандарты.

«Метод энантиомерной метки» — другой элегантный метод, основанный на использовании внутреннего стандарта, являющегося оптическим антиподом определяемого соединения. В данном случае осуществляется хроматографическое разделение энантиомеров для отде-

ления стандарта от анализируемого соединения с целью их дальнейшего количественного определения [3]. Таким образом, единственное, но весьма существенное отличие этого метода от описанного выше состоит в том, что разделение должно проводиться на хиральных сорбентах, поскольку химические свойства анализируемого соединения и стандарта в ахиральных условиях идентичны. Различные варианты применения внутренних стандартов представлены на рис. 8.1.

Несмотря на общий характер метода энантиомерной метки, разработан он был главным образом для аминокислотного анализа с помощью ГХ. Все D-аминокислоты, выполняющие роль внутренних стандартов, имеются в продаже, а разделение смеси всех природных белковых L-аминокислот и соответствующих D-энантиомеров можно

Сорбат	Внутренний стандарт	Способ разделения	Способ обнаружения
		Ахиральный	Специфичный (МС, детектор по радиоактивности)
		Хиральный	Неспецифичный

Проявление на хроматограмме:

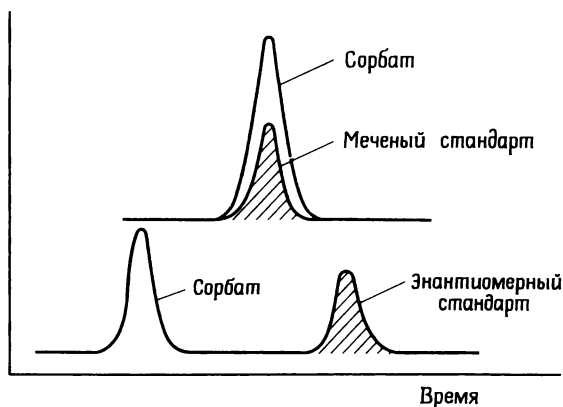


Рис. 8.1. Различные принципы использования изотопно-меченных изомеров и энантиомеров в качестве «идеальных» внутренних стандартов. (Для наглядности в обоих случаях предполагается, что сорбат оптически активен.)

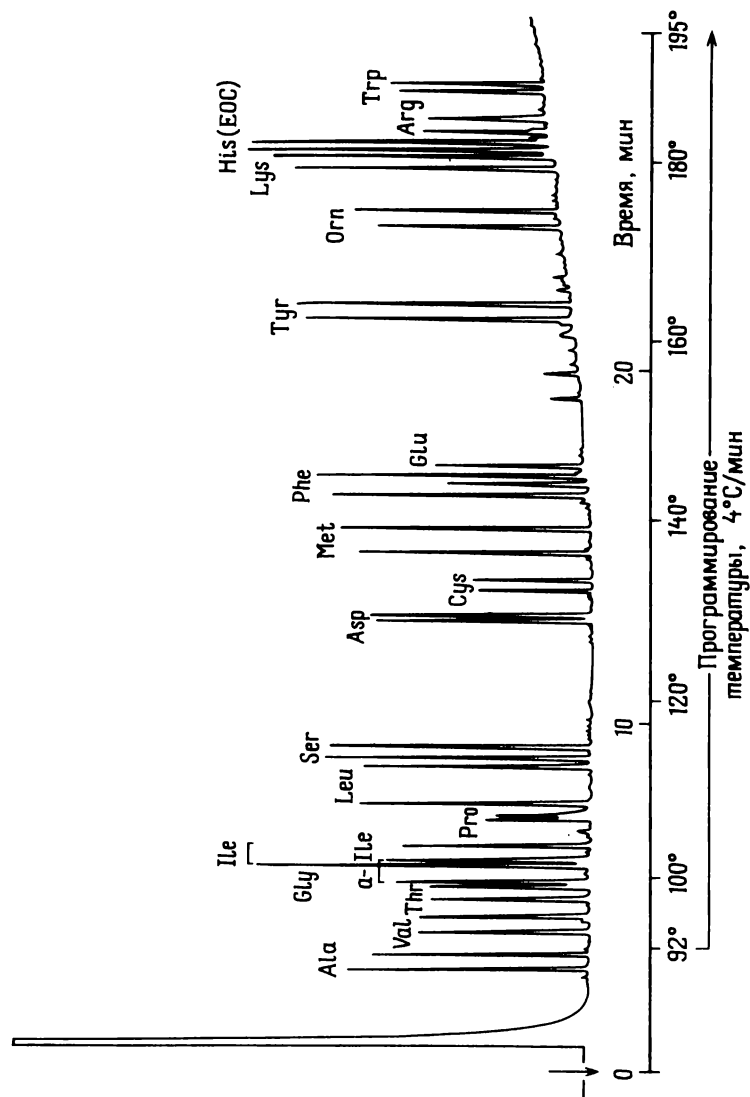


Рис. 8.2. Разделение энантимеров 19 рацемических аминокислот (в виде ПФП-изопропиловых эфиров), содержащихся в одной пробе, методом ГХ на стеклянной капиллярной колонке (0,25 мм × 25 м) Chirasil-Val. Разделение проводилось при программировании температуры (°C/мин) [117] (с разрешения Am. Chem. Soc.).

выполнять, используя их N-O-S-ПФП-изопропиловые эфиры на колонке Chirasil-Val в режиме программирования температуры (рис. 8.2). Метод энантиомерной метки учитывает потери L-аминокислот в процессе обработки и дериватизации, но не учитывает их потери вследствие возможной рацемизации [4]. Степень рацемизации можно определить в отдельном эксперименте со смесью чистых стандартов. Отличительная особенность метода состоит в том, что он позволяет полностью компенсировать потерю некоторых лабильных аминокислот, таких как триптофан, цистеин, треонин и серин, в процессе кислотного гидролиза белков.

8.1.2. ДРУГИЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АМИНОКИСЛОТНОГО АНАЛИЗА

Газовая хроматография как метод анализа аминокислот имеет следующий недостаток: перед разделением необходимо дважды проводить дериватизацию. Как уже говорилось в предыдущих главах, некоторые методы ЖХ разработаны применительно к немодифицированным аминокислотам, тогда как другие предусматривают дериватизацию с целью упрощения обнаружения и увеличения чувствительности.

Однако эффективность современных колонок в ЖХ не позволяет провести разделение всех обычных аминокислот за один прогон, в связи с чем большой интерес вызывает метод переключения колонок.

Разделение энантиомеров аминокислот представляет важную задачу, поскольку это — единственный способ определить их содержание с высокой точностью при низкой концентрации. Необходимость в подобных определениях возникает довольно часто, и некоторые особые примеры такого рода будут рассмотрены в разд. 8.2 и 8.3. В общем же эти методы предназначены для определения энантиомерной чистоты и конфигурации (наиболее обычные проблемы при выяснении структуры природных продуктов).

В пептидном синтезе необходимы аминокислоты или небольшие пептиды с высокой степенью оптической чистоты, а традиционное определение оптического вращения в этом случае не вполне пригодно. В этих случаях прямое наблюдение соотношения энантиомеров на хроматограммах, полученных при разделении энантиомеров, является более надежным. Прекрасный пример определения минорных количеств загрязняющего энантиомера в аминокислоте высокой степени чистоты приведен на рис. 8.3, где менее 0,05% примеси определяется с высокой точностью при анализе на неподвижных фазах противоположной хиральности.

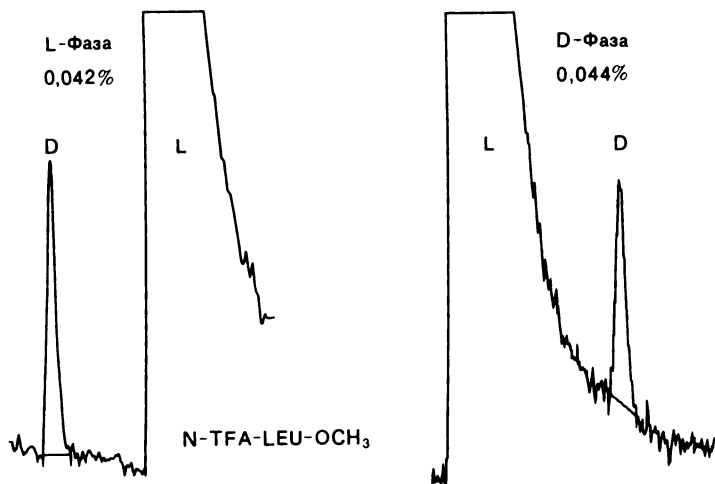


Рис. 8.3. Определение оптической чистоты энантиомеров лейцина (в виде N-ТФА-метиловых эфиров) методом капиллярной ГХ на колонках Chirasil-Val с фазами противоположной хиральности (с разрешения В.Корпенофера, университет г. Тюбинген, ФРГ).

8.2. СТЕРЕОХИМИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В ХИМИИ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Часто конечная характеристика органического соединения, выделенного из природного источника, предусматривает определение его стереохимической принадлежности, т. е. оптической чистоты и абсолютной конфигурации. Во многих случаях количество выделенного образца слишком мало, чтобы его можно было изучить хирооптическими методами или с помощью ЯМР. В таких ситуациях исключительно важное значение приобретает хиральная хроматография. Если необходимое разделение энантиомеров достигнуто, хроматографический метод дает непосредственную информацию о химической и оптической чистоте образца. Более того, если доступны синтетические стандарты, стереохимические корреляции выполнить несложно.

Очень интересная работа этого плана выполнена по ферромонам, энантиомеры которых, как теперь известно, способны различать насекомых [5]. Неправильный энантиомер может не только быть совершенно неактивным, но может даже отпугивать насекомых [6]. Ферромоны обычно являются относительно летучими низкомолекулярными соединениями, т. е. идеально подходят для хиральной ГХ.

Другая очень важная область применения хроматографии оптически активных соединений связана с выяснением структуры пептидных антибиотиков и родственных соединений, где ключевая проблема состоит в определении абсолютной конфигурации аминокислотных компонентов.

8.2.1. СТЕРЕОХИМИЯ ФЕРРОМОНОВ

Многие феромоны имеют в своем составе хиральные кислородсодержащие фрагменты (табл. 8.1).

Широко распространенными компонентами ферромонов являются спирокетали. Эти соединения выделены из различных насекомых, преимущественно ос, пчел и жуков-короедов [15—18], и идентифицированы. Они относительно неполярны, не содержат групп, поглощающих в УФ-области, что делает их удобными для разделения хиральной газовой хроматографией. Первым соединением этого типа, разделенным на оптические изомеры, был халькогран (2-этил-1,6-диоксаспиро[4.4]нонан) — основной компонент объединяющего феромона жуков *Pityogenes chalcographus* (L). Разделение было выполнено с помощью комплексобразующей ГХ на капиллярной колонке, покрытой никель(II)-бис(6-гептафторбутирил)-(R)-пулегонатом (0,12 М раствор в скволане) [19]. Вследствие наличия 2-алкильного заместителя халькогран может существовать в виде четырех оптически активных форм, т. е. в виде двух пар энантиомеров. Их конфигурационные взаимоотношения даны на схеме 8.1.

Для исходного соединения ($R = H$) Z/E-изомерия исчезает и остаются только два энантиомера. На рис. 8.4 дана хроматограмма, показывающая полное разделение всех оптически активных форм смеси халькогранана с двумя его более низкими гомологами (2-метил- и незамещенный 1,6-диоксаспиро[4.4]нонан соответственно). Из хроматограммы следует, что ХНФ последовательно проявляет некоторое небольшое предпочтение к 5(R)-форме в каждой паре энантиомеров. Элюирование происходит в следующем порядке: (2S, 5S), (2R, 5R), (2R, 5S), (2S, 5R).


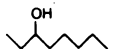
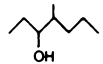




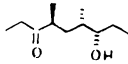

Этот метод позже был использован Шуригом [20, 21] для очень точного определения энантиомерного состава ряда спирокеталей ферромонов различных видов насекомых, а также насекомых одного и того же вида, обитающих в различных регионах. В этом случае особенно полезной оказалась масс-спектрометрия слежения за определенным ионом [22].

Симметрично замещенная спирокеталь 2,8-диметил-1,7-диоксаспиро[5,5]ундекан, выделяемая мандибулярной железой пчел *Adrena*,

была изучена недавно методом ЖХ на микрокристаллической триацетилцеллюлозе [23]. Это соединение существует в виде *транс*, *транс*-(Е, Е)- и *цис*, *транс*-(Z, Е)-изомеров, каждый из которых имеет две энантиомерные формы (схема 8.2).

Все четыре оптически активных компонента можно выделить в миллиграммовых количествах хроматографически. Разделение про-

Таблица 8.1. Примеры хиральных фрагментов, обнаруженных в структуре феромонов насекомых различных типов

Фрагмент	Структура	Абсолютная конфигурация	Вид насекомого	Литература
Гептанол-2		(R)	Различные виды муравьев	7
(—)-Октанол-3		(R)		
(—)-4-Метилгептанол-3		(3S, 4S)	Жук-короед <i>Scolytus</i>	8
4-Метилгексанол-3		(3S, 4S)	Муравьи <i>Myrmicinae</i>	9
4-Метилгептанон-3		(4S)	<i>Atta texana</i> , <i>Atta cephalotes</i>	10
(+)-Фронталин			Жуки <i>Dendroctonus</i> <i>Dendroctonus brevicomis</i> (западный сосновый лубоед; соединяющий феромон)	11
экзо-(+)-Бревикомин				12
(—)-Серрикорнин		(4S, 6S, 7S)	<i>Lasioderma serricorne</i> (женская особь табачного жука; половой гормон)	13
4,6-Диметил-октен-4-он-3 (маникон)	 R=C ₂ H ₅ R=H-C ₄ H ₉		<i>Manica mutica</i> <i>Manica bradley</i> (муравьи)	14

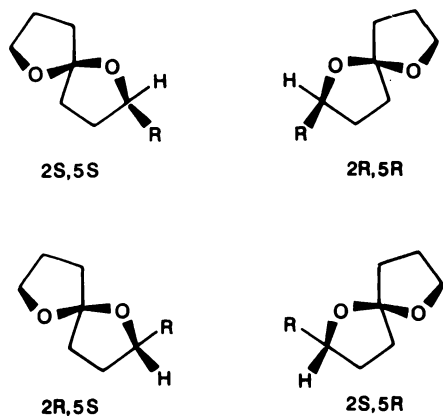


Схема 8.1. Стереизомеры халькограна.

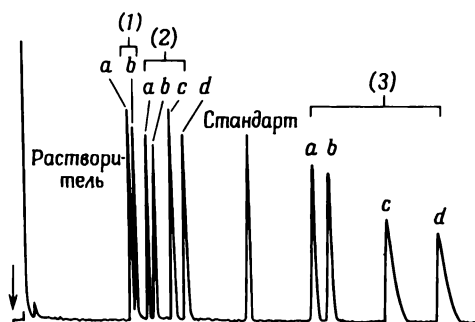


Рис. 8.4. Разделение всех стереоизомеров халькограна (3), его 2-метильного аналога (2) и родоналичного соединения (1) комплексобразующей ГХ 117 (с разрешения Verlag Chemie GmbH.).

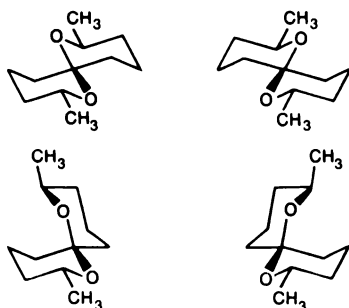


Схема 8.2. Стереизомеры 2,8-диметил-1,7-диокспиро[5,5]ундекана.

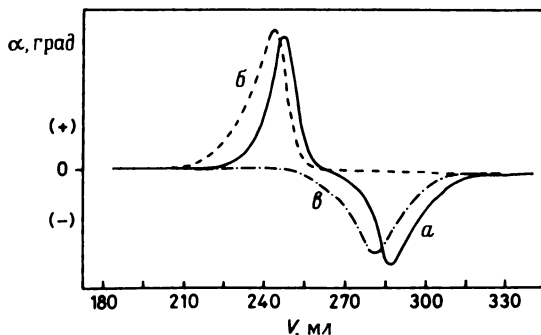


Рис. 8.5. Хроматограмма энантиомеров *цис, транс*-2,8-диметил-1,7-диоксаспиро[5.5]ундекана на колонке с МТАЦ, полученная с использованием поляриметрического детектора [118] (с разрешения Royal Society of Chemistry).

водят на стеклянной колонке (60 x 2,5 см) с 180 г МТАЦ (размер частиц 30—45 мкм) элюированием 96%-ным этанолом (скорость подачи 100 мл/ч, давление 3,6 атм). 140 мг Е,Е-изомера и 80 мг Z,Е-изомера позволили выделить примерно 50 и 30 мг каждого энантиомера соответственно. Соединения были выделены при разбавлении этанольной фракции водой и экстракции пентаном. Рис. 8.5 показывает изменение угла вращения элюата в процессе хроматографирования для соединения (2).

8.2.2. УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПОЛИПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Еще одной важной проблемой в стереохимии природных соединений является установление строения полипептидных антибиотиков, продуцируемых бактериями и грибами. Такие полипептиды часто содержат в своей структуре «неприродные» аминокислоты, т. е. имеющие D-конфигурацию или обладающие структурой, не обнаруженной в белках. Очистка и установление структуры таких сложных соединений, часто выделяемых в очень небольших количествах, требует квалифицированного разделения и точных аналитических методов. В этом отношении исключительно важным является непосредственное определение конфигурации аминокислот методом хиральной хроматографии. Особенно большое значение имеет применение хиральной ГХ для хирального аминокислотного анализа и создания аминокислотных карт гидролизатов. Приведенный ниже пример [24] должен проиллюстрировать сказанное.

Эпидермин — полипептидный антибиотик, недавно выделенный

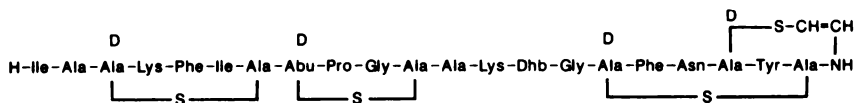
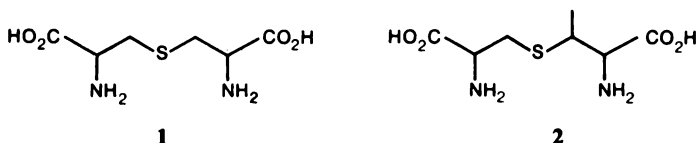


Рис. 8.6. Структура эпидермина, обладающего четырьмя циклическими фрагментами, образованными дисульфидными связями.

из культур вида *Staphylococcus epidermidis*. Полный кислотный гидролиз показал, что он содержит тринадцать белковых аминокислот, два остатка лантионина и один — 3-метиллантионина. Две ненасыщенные аминокислоты, обнаруживаемые методом ЯМР, полностью разрушаются при гидролизе. Используя частичный ферментативный гидролиз, десульфуризацию над никелем Ренея, секвенацию по Эдману, масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми атомами и хиральную ГХ, удалось установить полную структуру эпидермина, приведенную на рис. 8.6. (2R, 6S)- (т. е. мезо-) и (2S, 3S, 6R)-конфигурации лантионина (1) и 3-метиллантионина (2) соответственно были установлены в результате хроматографического анализа их N-ПФП-метиловых эфиров на колонке Chirasil-Val (стеклянный капилляр 0,3 мм × 20 м) [25].



Это довольно необычные аминокислоты, которые присутствуют и в других микробиологических продуктах. При введении в полипептидную цепь они вызывают образование циклических структур, существенно более стабильных, чем образованные дисульфидными мостиками. Хиральная ГХ позволила также определить конфигурации аминокислот в низине [26], субтилине [27] и анковенине [28]. Исключительная полезность метода иллюстрируется рис. 8.7, на котором показано, что в области выхода пиков 3-метиллантионина при хроматографировании полного гидролизата низина присутствует только один (2S, 3S, 6R) из четырех возможных стереоизомеров, которые в этих условиях все прекрасно разделяются.

Надежность современной хиральной капиллярной ГХ побудила использовать ее как метод секвенаторного конфигурационного анализа пептидов [29]. Этот новый метод заслуживает более детального рассмотрения. Его принцип показан на схеме 8.3. Пептид (0,5—1 мг) сначала превращают в *трет*-бутилкарбамоильное производное реак-

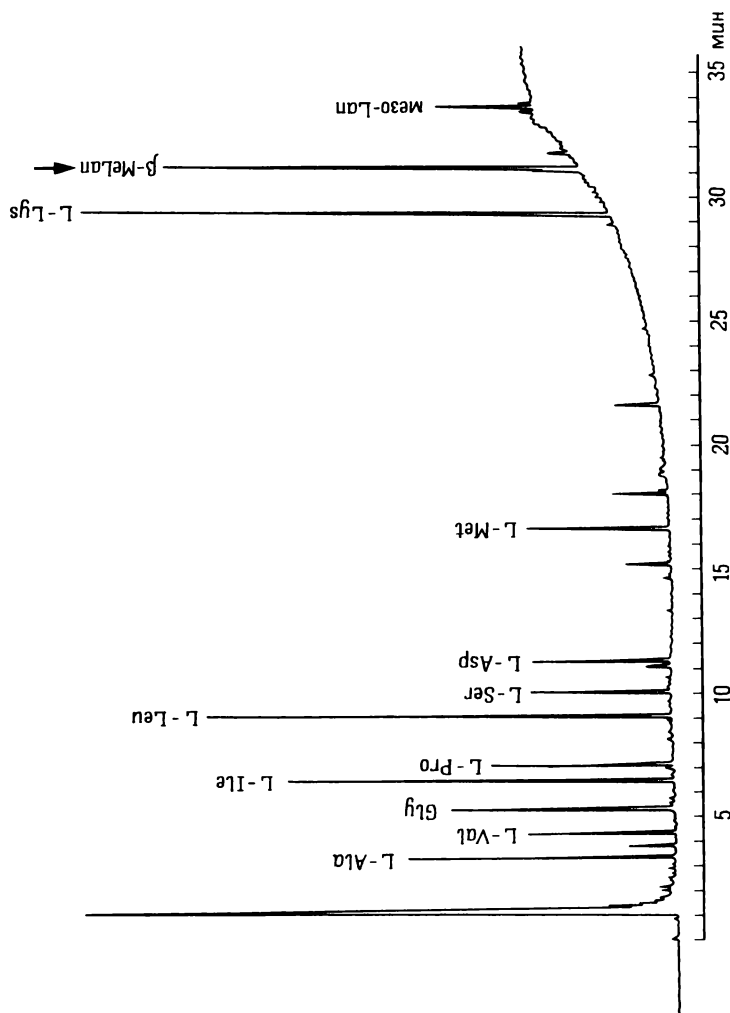


Рис. 8.7. Газовая хроматограмма гидролизата низина, показывающая лишь один пик для энантиомеров 3-метиллантионина [25].
(с разрешения F. Vieweg and Sons Verlagsgesellschaft mbH).

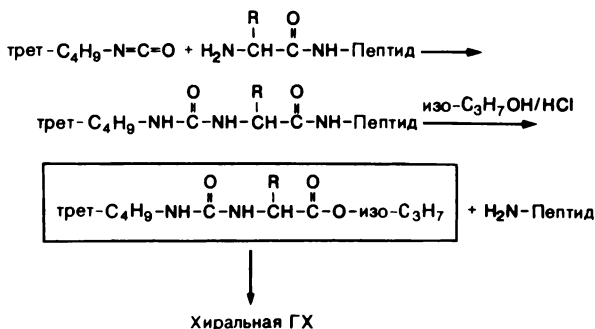


Схема 8.3. Принцип последовательного разрушения пептидов и хирального аминокислотного анализа.

цией [30] с *трет*-бутилизоцианатом и пиридином (3:5, 30°C, 45 мин) и далее нагревают с раствором хлороводорода в пропанол-2 (1,0 М раствор, 100°C, 30 мин). В результате N-концевая аминокислота отщепляется в виде изопропилового эфира *трет*-бутилкарбамоил-аминокислоты. После экстракции хлороформом энантиомерную чистоту выделенного эфира можно определить хиральной ГХ ($\alpha = 1,07\text{—}1,11$ на стеклянной капиллярной колонке длиной 25 м с нанесенной фазой ХЕ-60-*l*-валин-(S)- α -фенилэтиламидом). Рацемизация в этих условиях отсутствует. Однако все же, по-видимому, целесообразно этерифицировать пептид (1М хлороводород в пропанол-2) перед реакцией с изоцианатом.

Этим методом удалось показать, что C-концевой Leu в синтетическом октапептиде содержит > 10% D-энантиомера, в то время как неконцевой Leu содержит только 1,1%. Причина этого — рацемизация C-концевого Leu при использовании твердофазного синтеза. Совершенно ясно, что этот метод секвенаторного хирального аминокислотного анализа является весьма перспективным. В дальнейшем его, вероятно, можно будет использовать для структурного анализа пептидных антибиотиков и родственных природных продуктов.

8.2.3. ДРУГИЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

Терпены — это природные продукты, получаемые из растений. Они широко применяются в промышленности. Исследованию стереоселективных превращений терпенов, в том числе оптически активных, посвящено большое число работ. Энантиомерная чистота почти всех этих углеводов была определена поляризметрически, что обусловлено сложностью разделения этих сильнонеполярных соединений, не

содержащих функциональных групп, способных к дериватизации или взаимодействию с фазой. Следовательно (см. разд. 5.2.3), чтобы для оптического разделения полностью насыщенных рацемических углеводов можно было прибегнуть к хроматографическому методу, он должен базироваться на образовании комплексов включения, так как в этом случае решающую роль играют стерические эффекты.

В свете сказанного заслуживает внимания недавно опубликованный метод разделения с помощью хиральной ГХ, поскольку он описывает очень элегантный и эффективный способ решения трудной проблемы полного разделения энантиомеров терпеновых углеводов.

В этих исследованиях [31, 32] разделение проводилось на стеклянной колонке (4 мм × 2 м), упакованной целитом, покрытым раствором α -циклодекстрина в формамиде (4,5 г формамида/20 г целита; 0—1,2 мол. % α -ЦД в формамиде). Целит был суспендирован в водном растворе α -ЦД и формамида встряхиванием в течение 10 мин, после чего избыток воды был медленно удален при пониженном давлении (20 мм рт. ст.) и температуре 50°C. Для сравнения была использована колонка без α -ЦД. Хиральная и сравнительная колонки были помещены в один и тот же прибор, снабженный двойным пламенно-ионизационным детектором. Перед началом работы колонки кондиционировали 2-часовым прогреванием при 70°C. Ввод пробы на ко-

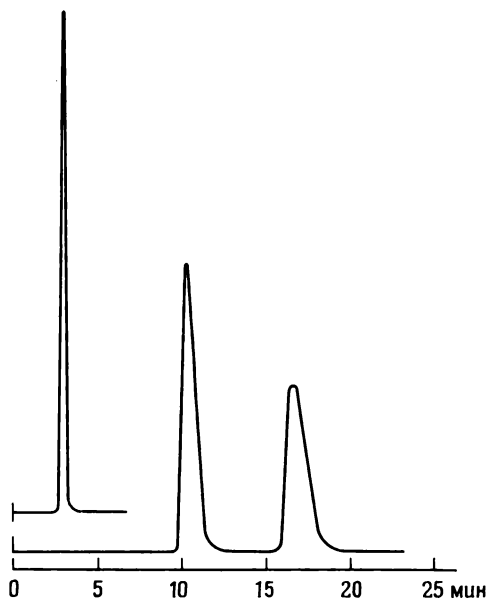


Рис. 8.8. Хроматограмма рацемического *цис*-пинана при 35 °C; *а* — сравнительная колонка, *б* — 0,65% α -ЦД в формамиде [32] (с разрешения Elsevier Science Publishers B.V.).

Таблица 8.2. Данные, полученные при разделении энантиомеров терпенов хиральной ГХ^а [32] (с разрешения изд-ва)

Соединение	Температура, °С	α
α -Пинен	35	2,00
β -Пинен	35	1,40
<i>цис</i> -Пинан	35	1,60
<i>транс</i> -Пинан	35	1,20
2-Карен	50	2,17

^а Условия разделения: колонка 4 мм × 2 м, неподвижная фаза целлит, покрытый 0,65% α -ЦД в формамиде; $\alpha = k'(-)/k'(+).$

лонки был осуществлен практически одновременно. Разделение проводилось при температурах от 35 до 50°C в токе гелия (40 мл/мин).

Этим методом изучены пять следующих рацемических углеводородов: α - и β -пинены, *цис*-пинан, *транс*-пинан и 2-карен. Все эти соединения удерживались на данной колонке с α -ЦД дольше, чем на контрольной, что свидетельствует о наличии взаимодействия между α -ЦД-селектором и обоими энантиомерами углеводорода. Степень этого взаимодействия (вследствие включения) с ХНФ в значительной степени зависит от абсолютной конфигурации углеводорода, вызывая большое различие во временах удерживания энантиомеров.

Во всех случаях более прочно удерживалась (+)-форма. Найденный коэффициент разделения, как правило, очень велик для разделений методом ГХ, даже несмотря на весьма низкую рабочую температуру. Как видно из табл. 8.2, *транс*-изомер пинана труднее поддается разделению, чем соответствующий *цис*-изомер в тех же самых условиях. Оба энантиомера *транс*-изомера удерживаются менее прочно, чем первый элюируемый энантиомер *цис*-изомера. Это свидетельствует о том, что *транс*-конфигурация пинена стерически менее благоприятна для включения в комплекс.

8.3. ПРИМЕНЕНИЕ В ФАРМАЦИИ

Различное поведение энантиомеров в биологических системах [33, 34] вызвало необходимость разработки аналитических методов определения энантиомерного состава и чистоты лекарственных средств или их метаболитов. Разделив лекарственное средство на оптические изомеры, можно изучить различие в фармакокинетическом поведении этих изомеров. Хиральную хроматографию можно также применять

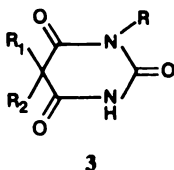
для определения стереохимии метаболитических превращений этих лекарственных средств. Таким образом, основное назначение хиральной хроматографии в фармации — это разделение новых фармацевтических препаратов на различных хиральных фазах на отдельные оптические изомеры. В последующих разделах мы рассмотрим некоторые важные классы лекарственных средств, исследованных таким образом.

8.3.1. НЕЙТРАЛЬНЫЕ, СЛАБОКИСЛОТНЫЕ ИЛИ СЛАБООСНОВНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Многие хиральные соединения, принадлежащие к этой группе, содержат амидные связи, которые играют важную роль в процессе хирального распознавания на соответствующих неподвижных фазах. Полярность этих соединений делает их малоприспособленными для разделения методом ГХ. Но в этих целях можно использовать самые различные методы ЖХ.

8.3.1.1. БАРБИТУРАТЫ

Производные барбитуровой кислоты (3) уже в течение долгого времени применяются в качестве седативных и снотворных средств. Большую группу рацемических лекарственных средств, получивших широкое распространение в медицине, представляют различные углерод- и азотзамещенные производные барбитуровой кислоты. Эти соединения ($R_1 \neq R_2$; $R_1, R_2 \neq H$) имеют pK_a около 8,5 и устойчивы к рацемизации. Потенциальное различие в фармакологическом действии их энантиомеров выяснено еще не полностью.



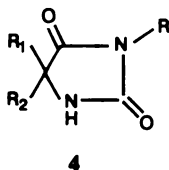
Установлено, однако, что (S)-(+)-энантиомер гексобарбитала ($R_1 = R_2 = CH_3$, $R_2 =$ циклогексен-1-ил) более активен как снотворное, чем (R)-(–)-форма [35]. Такое же различие наблюдается и у энантиомерных пар других барбитуратов [36, 37].

Гексобарбитал впервые был разделен на энантиомеры на МТАЦ [38]. Затем это соединение и его аналог мефобарбитал ($R = R_1 = CH_3$, $R_2 =$ фенил) были разделены на поли(трифенилметилметакрилате)

[39] и циклодекстриновой фазе [40]. О разделении серии барбитуратов на МТАЦ сообщается также в статье Шибаты и др. [41]. Более обстоятельные исследования этих объектов выполнены Янгом и др. [42], которые использовали в этих целях N-(3,5-динитробензоил)аминокислотные хиральные фазы Пиркла. И хотя найденные значения селективности были обычно небольшими ($\alpha \leq 1,12$), они вполне приемлемы в аналитических целях. В двух из изученных соединений содержатся только экзоциклические асимметрические атомы углерода, т. е. $R = H$.

8.3.1.2. ГИДАНТОИНЫ

Эти соединения имеют следующую общую структуру (4):



подобно некоторым барбитуратам, они служат в качестве противосудорожных средств. Несколько соединений такого типа были разделены на колонках с фазами Пиркла [43]. Мефенитоин ($R = CH_3$, $R_1 = C_2H_5$, $R_2 = C_6H_5$) можно разделить на энантиомеры на сорбенте с ковалентно-связанным ДНБ-*L*-Leu ($\alpha = 1,06$), проводя элюирование смесью гексан/пропанол-2/ацетонитрил (89:10:1) [42]. Его можно также непосредственно, без модификации, разделить на энантиомеры на колонке Chirasil-Val в режиме ГХ, и этот метод был элегантно использован в фармакокинетических исследованиях [44]. Метаболические превращения (+)-мефенитоина служат наглядным примером биологической энантиоселективности, и результаты их наблюдения посредством метода хиральной ГХ заслуживают дальнейшего обсуждения.

В течение двух недель после перорального приема пациентом 300 мг (\pm)-мефенитоина проводился анализ крови. Плазму крови (1 мл) после введения 100 мкл внутреннего стандарта и подкисления (1 мл 10М уксусной кислоты) экстрагировали 6 мл дихлорметана. Органическую фазу упаривали, а остаток растворяли в 1 мл раствора 4:1 (по объему) 0,1М гидроксида натрия в смеси метанол/пропилиодид и далее нагревали 18 ч на водяной бане при 50°C. (В результате этой реакции деметилированный метаболит, который не разделяется на колонке, превращается в соответствующее пропильное производное,

поддающееся разделению.) Дериватизацию прекращали добавлением 1 мл 0,1М соляной кислоты и 3 мл дихлорметана. После экстракции производного его переносили в небольшую коническую ампулу и упаривали досуха в атмосфере азота. Остаток растворяли в 10 мкл этил-ацетата. Порцию этого раствора 0,5—1,0 мкл вводили в газовый хроматограф со стеклянной капиллярной колонкой Chirasil-Val размером 25 м × 0,25 мм и термоионным детектором, специфичным для азота и фосфора. Разделение проводили в указанных условиях: температура инжектора 225°C, температура колонки 165°C, температура детектора 300°C, скорость потока гелия 1,2 мл/мин с делением потока 20:1, скорость потока газа-носителя 2,5 мл/мин, скорость потока водорода 3,5 мл/мин и скорость потока воздуха 175 мл/мин. Роль внутреннего стандарта выполнял 3-метил-5-фенил-5-изопропилгидантоин.

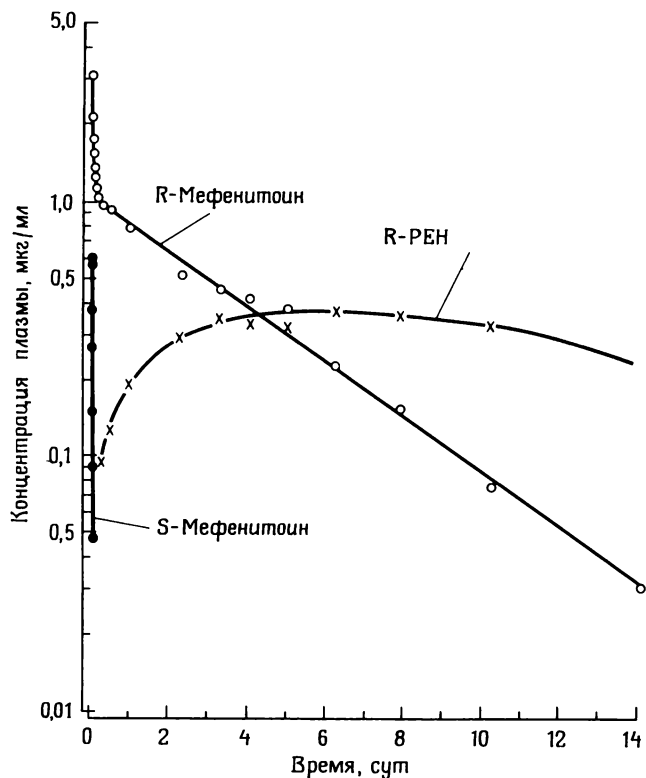


Рис. 8.9. Кинетика выведения (из организма) рацемического мефенитоина, установленная с помощью хиральной газовой хроматографии [44] (с разрешения Elsevier Science Publishers B.V.).

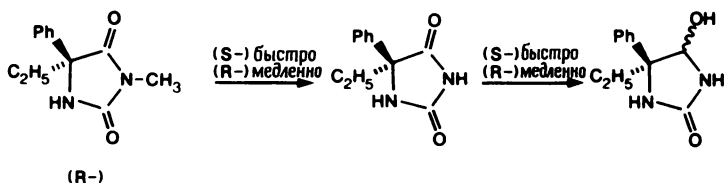
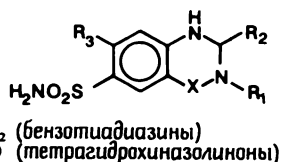


Схема 8.4. Метаболизм мепенитоина.

Этот метод позволяет одновременно наблюдать разделение на энантиомеры мепенитоина, его деметилированного метаболита (переведенного в 3-пропилпроизводное) и внутреннего стандарта. Исследование проб, взятых в различные моменты времени, показало, что время полупревращения (удаления) (S)-энантиомера мепенитоина составляет менее 3 ч, тогда как для (R)-формы оно превышает 70 ч. Соответственно при максимальном уровне препарата в плазме соотношение энантиомеров (R):(S) равно 5 и концентрация (S)-метаболита такова, что он едва обнаруживается, а концентрация (R)-метаболита ((R)-ПЕН) прежде чем начать убывать, в течение 4—6 дней возрастает. Все описанное иллюстрирует рис. 8.9, а схема 8.4 показывает, как происходит превращение метаболитов [45].

8.3.1.3. БЕНЗОТИАДИАЗИНЫ И СТРУКТУРНО-РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Названные соединения (5) принадлежат к группе диуретиков, кото-



5

рые интересны стереохимически, поскольку близки к диуретикам типа мепфузида [4-хлор-N'-метил-N'-(2-метилтетрагидрофурил)-м-бензендисульфонамид], проявляющим заметную энантиоселективность в действии [46, 47].

Разделение серии рацемических диуретиков с $X = SO_2$ было выполнено на полиакриламидных фазах методом ЖХ [48]. Хотя разделение антиподов было неполным, тем не менее этим способом удалось достигнуть высокой степени энантиомерного обогащения. Далее, поскольку разделение проводилось в полупрепаративном режиме, использование рециклической хроматографии позволило выделить некоторые соединения в оптически чистом состоянии.

В качестве сорбентов были выбраны этиловый и бензиловый эфиры поли-[(S)-N-акрилоилфенилаланина], (**Ia** и **Iб**, см. разд. 7.1.2.1 и 11.2). Аналитические разделения были выполнены на стеклянной колонке ($\sim 10 \times 300$ мм) с 5 г сорбента при скорости потока элюента 10—15 мл/ч (2,5—3,0 бар). Колонка была соединена с УФ-детектором, работавшим при 285 нм, и поляриметром с проточной кюветой объемом 80 мкл. Фракции элюата собирались автоматическим коллектором фракций. Полупрепаративные разделения были осуществлены на стеклянной колонке ($\sim 38 \times 800$ мм) с 235 г **Ia** при расходе элюента 50 мл/ч (3,0 бар). Элюентом во всех случаях служила смесь толуола с диоксаном (1:1 по объему). Загрузка колонки составляла примерно 5 мг (в виде раствора в 0,5—2,0 мл элюента) и 200—250 мг для аналитического и полупрепаративного разделений соответственно. Некоторые полученные результаты приведены в табл. 8.3.

Важность образования водородных связей для процессов удерживания и разделения энантиомеров следует из того факта, что добавление 6% метанола в подвижную фазу отрицательно сказывается и на α , и на k' и что аналогичное влияние оказывает замещение водорода в сульфонамидной группе на метильную группу. Значения k' на фазе **Iб**

Таблица 8.3. Экспериментальные данные, полученные при разделении энантиомеров лекарственных средств группы бензотиадиазинов (5, X=SO₂) [48] (с разрешения Am. Pharm. Ass.)

Заместители			Сорбенты			
R ₁	R ₂	R ₃	Ia		Iб	
			k'_1	k'_2	k'_1	k'_2
H	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	CF ₃	3,41(+)	3,98(—)	1,23(+)	1,60(—)
H	CH ₂ C ₆ H ₅	CF ₃	5,54(+)	6,31(—)	1,90(+)	2,11(—)
H	CH ₂ C ₆ H ₅	Cl	6,60(+)	7,07(—)	2,86	5,03(—)
H'	CH ₂ C ₆ H ₄ F- <i>n</i>	Cl	12,10(+)	12,90(—)		
H	CH ₂ C ₆ H ₄ F- <i>m</i>	Cl	10,20(+)	11,30(—)	—	2,47(—)
H	CH ₂ C ₆ H ₄ F- <i>o</i>	Cl	5,89(+)	6,23(—)		
H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Cl	5,45(+)	5,83(—)	2,22(+)	2,56(—)
H	CH ₂ SCH ₂ CF ₃	Cl	9,14(+)	10,20(—)	3,48(+)	4,23(—)
CH ₃	CH ₂ SCH ₂ CF ₃	Cl	4,70		1,85	
H	CHCl ₂	Cl	6,29		2,38	
CH ₃	CH ₂ Cl		5,22		2,20	

Подвижная фаза толуол/диоксан (1 : 1)

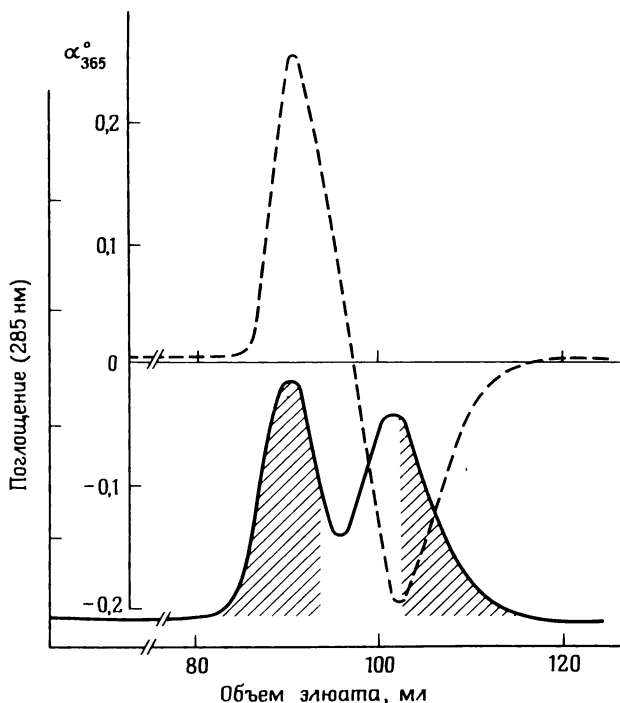


Рис. 8.10. Полупрепаративное разделение энантиомеров пенфлутизида [48] (с разрешения Am. Pharm. Assoc.).

заметно ниже, чем на фазе **Ia**, но порядок выхода в обоих случаях сохраняется неизменным.

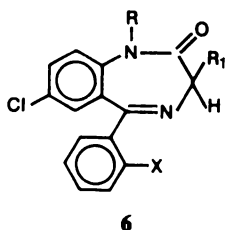
На рис. 8.10 показана хроматограмма неполного разделения 5,0 мг рацемата пенфлутизида. Энантиомерный выход, указанный в табл. 8.3, был определен как выраженное в процентах отношение суммарного количества двух энантиомеров в оптически чистой форме, которое можно выделить за одно разделение (заштрихованная область на рис. 8.10), к общему введенному на колонку количеству (полная площадь пиков).

Оба энантиомера пенфлутизида и бендрофлуметиазида были получены с оптической чистотой $> 97\%$ и использованы для поляриметрического изучения кинетики рацемизации, которая в слабоосновном водном растворе показала прекрасное соответствие кинетике реакции псевдопервого порядка. С увеличением pH время полурацемизации быстро снижается и составляет всего несколько минут при

$\text{pH} > 9$. Следовательно, одновременно с гидролизом тиадиазинов, который наблюдался ранее, протекает катализируемая основаниями рацемизация этих соединений.

8.3.1.4. БЕНЗОДИАЗЕПИНОНЫ

Соединения этой группы уже давно используются как седативные и снотворные средства. Хотя многие представители этой группы ахиральны, ряд соединений являются рацематами общей формулы (6). Исходное соединение ($\text{R} = \text{R}_1 = \text{X} = \text{H}$), диазепам, ахирально.



У соединений этой группы отчетливо выражена зависимость физиологического воздействия от энантиомерного состава [49]. Бензодиазепиноны являются слишком полярными для разделения с помощью ГХ, но вполне подходят для разделений с помощью ЖХ. Их хроматографирование было выполнено как в аналитическом, так и в препаративном масштабе и основные результаты суммированы ниже.

Первые успешные разделения были описаны Блашке и др. [50]. Эти авторы использовали сшитый хиральный полиакриламидный сорбент [с этил-(S)-фенилalaniновым заместителем] для препаративного разделения оксазепам ($\text{R}_1 = \text{OH}$, $\text{R} = \text{X} = \text{H}$). В дальнейшем этот метод был улучшен: нанесение полимера на силикагелевую матрицу позволило осуществить разделение в условиях ВЭЖХ и применить в качестве подвижной фазы смесь гексана с диоксаном (65:35) [51]. Для разделения энантиомеров этого класса (темазепам: $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R}_1 = \text{OH}$, $\text{X} = \text{H}$; камазепам: $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R}_1 = \text{OCONMe}_2$, $\text{X} = \text{H}$) пригодна также ХНФ на основе силикагеля, содержащая ковалентно-связанный N-формил-(S)-фенилаланин (см. разд. 7.2.5).

Широкие исследования, проведенные Пирклом и др. [52], показали, что различные бензодиазепиноны (всего 42 соединения) легко разделяются на сорбентах с N-(3,5-динитробензоил)фенилглицином или N-(3,5-динитробензоил)фениллейцином. Обнаруженный поря-

док выхода энантиомеров хорошо согласуется с предложенной моделью их хирального распознавания. Так, на сорбенте с (R)-фенилглицином во всех случаях первым элюировался (–)-энантиомер, тогда как на сорбенте с (S)-лейцином он элюировался последним. Величина α находилась в пределах 1,07–4,33. В целом более высокая селективность разделения была получена на сорбенте с (S)-лейцином. Наиболее существенные результаты этих разделений приведены в табл. 8.4.

Все соединения известной абсолютной конфигурации имеют отрицательное вращение для (R)-формы и положительное для (S)-формы. Это означает, что наиболее прочно удерживаемый энантиомер сорбируется на ХНФ вследствие взаимодействия с селектором одновременно в трех точках, как это показано на рис. 8.11.

Отметим, что наиболее стабильная конформация 3-замещенного диазепама соответствует показанной на рисунке конфигурации с псевдоэкваториальным расположением заместителя. В этом случае карбонил амидной группы изломанного цикла направлен непосредственно к атому водорода амидной группы селектора. Связы-

Таблица 8.4. Данные, полученные при разделении энантиомеров серии бензодиазепинов на сорбентах с N-(3,5-динитробензоил)аминокислотными группами [52] (с разрешения изд-ва)

Соединение (X = P = X) R ₁	Сорбент			
	(R)-ДНБ-фенилглицин k'_1	α	(S)-ДНБ-лейцин k'_1	α
CH ₃	3,2(–)-(R)	1,6	1,8(+)-(S)	4,11
CH ₂ CH ₃	2,3(–)	1,46	1,9(+)	2,22
CH ₂ CH ₂ CH ₃	2,2(–)-(R)	1,42	2,7(+)-(S)	2,35
CH(CH ₃) ₂	2,7(–)-(R)	1,92	1,8(+)-(S)	3,53
CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	2,7(–)	1,92	1,7(+)	4,0
CH ₂ CH(CH ₃) ₂	3,2(–)-(R)	1,89	1,9(+)-(S)	4,20
CH ₂ CH ₂ SCH ₃	4,0(–)	1,57	2,2(+)	3,0
CH ₂ C ₆ H ₅	4,0(–)-(R)	1,93	2,2(+)-(S)	4,33
CH ₂ C ₆ H ₄ OH- <i>n</i>	12,3(–)-(R)	1,48	6,3(+)-(S)	2,18
CO ₂ CH ₂ CH ₃	4,4(–)	1,36	4,3(+)	1,42
ОН	16,9(–)-(R)	1,20	11,7(+)-(S)	1,13
ОСН ₃	10,0(–)	1,33	11,0(+)	1,19
ОСОСН ₃	7,4(–)	1,27	3,8(+)	1,62
ОСОН ₆ H ₅	3,1(–)	1,87	2,3(+)	2,84
ОСОС(CH ₃) ₃	1,0(–)	2,05	0,7(+)	3,69

Подвижная фаза гексан/пропанол (9 : 1)

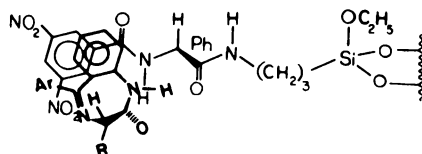


Рис. 8.11. Модель хирального распознавания при взаимодействии с неподвижной фазой более прочно удерживаемого энантиомера бензодиазепинона [52] (с разрешения Elsevier Science Publishers B.V.).

вающие взаимодействия с фазой предполагают образование а) комплекса с переносом заряда между 3,5-динитробензоильной группой селектора и бензольным кольцом сорбата, б) водородной связи между атомом водорода 3,5-динитробензамидной группы и карбонильным кислородным атомом амидной группы анализируемого соединения и в) водородной связи между карбонильным кислородным атомом аминокислотного фрагмента ХНФ и амидным водородным атомом сорбата.

Эта модель хорошо согласуется также с тем обстоятельством, что заместитель в положении 3 не влияет на разделение энантиомеров и, следовательно, не участвует в стерических взаимодействиях.

Большая селективность разделения, наблюдаемая для многих изученных соединений на ХНФ подобного типа, побудила использовать последние для препаративных разделений, о чем будет идти речь в гл. 9.

Разделение лекарственных средств этой группы на энантиомеры можно также проводить методом обращенно-фазовой ЖХ на силикагелевых сорбентах, покрытых альбумином. Как показали Алленмарк и Андерсон [53, 54], для этой серии соединений величина селективности разделения может достигать 7. Разделение в значительной степени зависит от природы заместителя в положении 3, и подвижную фазу выбирают таким образом, чтобы получить приемлемые значения k' . Суммированные в табл. 8.5 данные отражают основные особенности влияния заместителя и состава подвижной фазы на разделение энантиомеров этих соединений.

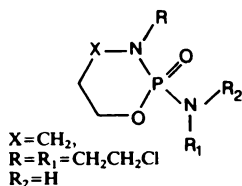
Таким образом, в заключение можно сказать, что многие методы разделения энантиомеров с помощью ЖХ хорошо подходят для прямого контроля энантиомерной чистоты или энантиомерного состава лекарственных средств данного типа. Они будут играть все большую роль в связи с развитием производства оптически чистых соединений и проведением фармакокинетических исследований.

Таблица 8.5. Данные, полученные при разделении рацематов бензодиазепинов на силикагеле с БСА (Resolvosil) [53] (с разрешения изд-ва)

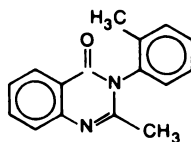
Соединение (X = R = H) R ₁	Характеристики подвижной фазы			k' ₁	k' ₂	α
концентра- ция, мМ	pH	содержание пропано- ла-1, %				
CH ₃	50	7,8	6	5,1	5,1	1,00
CH ₃	20	7,5	1	7,25	14,7	2,03
CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	50	7,8	6	11,1	17,4	1,57
CH ₂ C ₆ H ₅	50	7,8	6	41,0	110,0	2,68
CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	50	7,8	6	1,5	1,65	1,09
CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	20	7,5	1	3,0	5,0	1,67
O ₂ CCH ₂ CH ₃	50	7,8	6	3,2	4,7	1,47
O ₂ CCH ₂ CH ₃	20	7,5	1	6,5	10,75	1,65
OCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	50	7,8	6	14,0	28,2	2,01
OH	10	6,6	2	2,1	8,6	4,10

8.3.1.5. ПРОЧИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Многие представители рацемических лекарственных средств других классов были разделены на оптические изомеры прямыми методами хиральной хроматографии в основном благодаря работам Блашке и сотр. [51]. К числу такого рода средств относятся противораковый препарат "Ifosfamide" ("Holoخان") (7) и родственные соединения; все эти соединения содержат асимметрический атом фосфора в гетероцикле [55]. Разделение (7) было выполнено в полупрепаративном масштабе на метиловом эфире поли[(S)-N-акрилоилфенилаланина] со смесью толуол/диоксан (1:1) в качестве подвижной фазы.



7



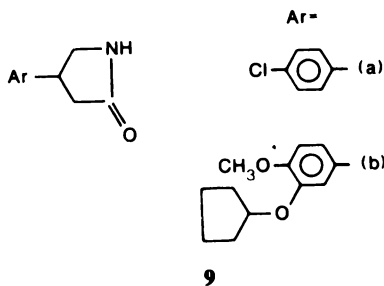
8

Метаквалон (8) используется как снотворное и противосудорожное средство [56] в течение долгого времени, но только в 1975 г. методом ЯМР было показано, что некоторые аналоги метаквалона обладают высоким барьером вращения вокруг связи азот-арил [57] и что, следовательно, они хиральны, и было осуществлено их разделение на

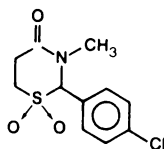
оптические изомеры. Для самого метаквалона, как недавно показали Маншрек и др. [58], величина барьера взаимопревращения энантиомеров (ΔG^\ddagger) равна 131,6 кДж/моль (при 135°C). Этого вполне достаточно, чтобы предотвратить рацемизацию, что и было экспериментально подтверждено частичным расщеплением рацемата метаквалона на колонке с МТАЦ [58]. Обычно хроматографирование 300 мг рацемата (**8**) дает примерно 100 мг (+)-**8** (оптическая чистота 70%, элюируется первым) и примерно 120 мг (-)-**8** (оптическая чистота 60%). Оба энантиомера обладают противосудорожным действием, причем более активен (-)-**8**.

В последнее время внимание исследователей привлекли соединения со структурой 1,4-дигидропиридина, их начали изучать как потенциальные лекарственные препараты, оказывающие влияние на транспорт кальция в организме [59]. Некоторые из этих соединений были разделены на энантиомеры, оказывающие противоположное влияние на транспорт кальция [60, 61]. Разделение энантиомеров проводилось на колонке с МТАЦ элюированием 96%-ным этанолом [62—64]. Для полного разделения энантиомеров использовалась техника рециклирования в двухколоночном варианте [64].

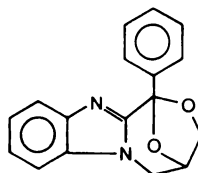
Два лекарственных средства общей структуры (**9**) также были разделены на оптические изомеры методом ЖХ. Баклофен-лактам ($\text{Ar} = n\text{-Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-$, **9a**) показывает исключительно высокую селективность при разделении ($\alpha = 28$) на колонке Resolvosil (50 мМ фосфатный буфер, pH 7,2, 2% пропанола-1) [54].



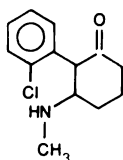
Ролипрам (**9b**) полностью разделен на энантиомеры при хроматографии на колонке с МТАЦ (96%-ный этанол) [51]. К числу других рацемических лекарственных средств, недавно разделенных на МТАЦ [51], относятся хлормезанон (**10**) (разделяется также и на Resolvosil [65]), оксападол (**11**), кетамин (**12**) и миансерин (**13**). Поли[(S)-N-акрилоилфенилаланинметилэфир] был успешно применен для разделения на оптические изомеры серусодержащего соединения (**14**) и хлорталидона (**15**) (подвижная фаза толуол/диоксан, 1:1) [51].



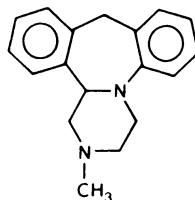
10



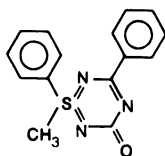
11



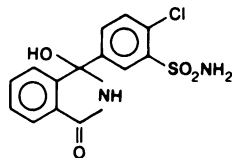
12



13



14



15

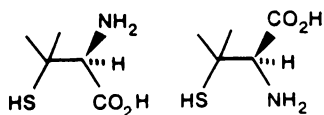
8.3.2. ПРОТОЛИТИЧЕСКИЕ (ЗАРЯЖЕННЫЕ) ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Для разделения соединений этого типа был использован целый ряд методов ЖХ, два из которых представляют особенный интерес, поскольку не требуют предварительной дериватизации. Один из этих методов, основанный на образовании комплексов с металлами, применим лишь к ограниченному кругу соединений. В основу другого, более общего, метода положены два различных варианта хиральной ион-парной хроматографии. В одном из них ахиральный сорбент сочетается с хиральным противоионом (разделение диастереомерных ионных пар), в другом — хиральный сорбент сочетается с ахиральным противоионом (разделение хиральных ионных пар, см. разд. 7.1.4.2). Как в водных, так и в органических апротонных средах ус-

пешное разделение энантиомеров осуществлено также при помощи ряда других методов. Большинство методов ГХ требует предварительной дериватизации этих соединений, но в настоящее время разработаны очень простые и элегантные способы модификации разделяемых соединений.

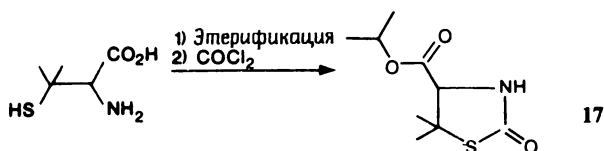
8.3.2.1. АМФОТЕРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

А. Пеницилламин. Как уже неоднократно указывалось выше, фармакологическое воздействие энантиомеров может быть совершенно различным. Наглядный пример тому — β -меркапто- α -аминокислота (16). Так, D-форма этого соединения является важным лекарственным средством, назначаемым при лечении ревматических артритов [66] и прошедшим клинические испытания как лекарственное средство против ряда других заболеваний, в частности болезни Вильсона [67], а его L-энантиомер — высокотоксичное соединение [68]. Это показывает, насколько необходим точный и прямой аналитический метод определения оптической чистоты каждого лекарственного средства. Эта задача была решена двумя элегантными хроматографическими методами.



16

1. Газовая хроматография [69]. Этерификация 16 пропанолом-2 и последующая реакция с фосгеном дают с хорошим выходом тиазолидин-2-он (17) (схема 8.5). Последующее хроматографирование на капиллярной колонке, покрытой ХНФ ХЕ-60-*l*-валин-(R)- α -фенилэтиламидом (хромпак), при 170°C с водородом в качестве газ-носителя позволяет разделить полученные производные с прекрасным разрешением. При этом также разделяется неметилированный аналог пеницилламина — цистеин (рис. 8.12). Значение селективности



17

Схема 8.5. Модификация пеницилламина для ГХ.

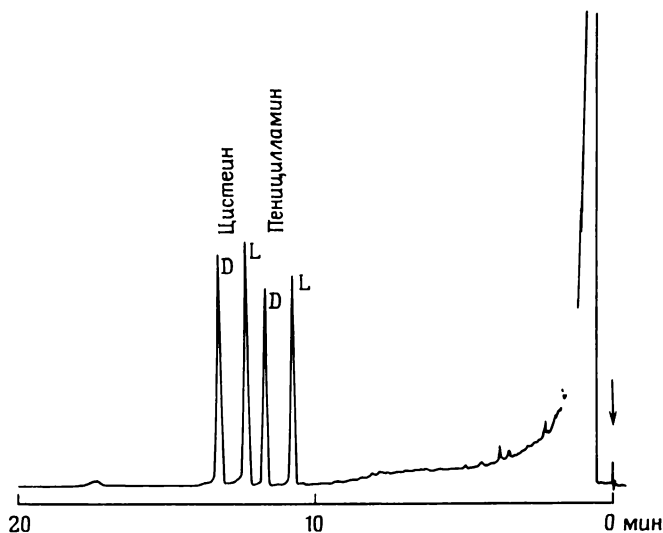


Рис. 8.12. Разделение энантимеров D,L-пеницилламина и D,L-цистеина после превращения их в тиазолидин-2-оны [69] (с разрешения Elsevier Science Publishers B.V.).

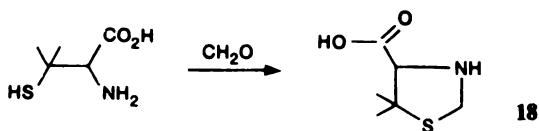
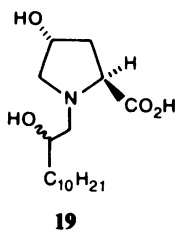


Схема 8.6. Модификация пеницилламина для ХЛОХ.

α для этой ХНФ составляет 1,085 для пеницилламина и 1,079 для цистеина. В обоих случаях первым элюируется L-энантиомер.

2. Жидкостная хроматография [70]. Реакция **16** с формальдегидом дает диметилтиазолидинкарбоновую кислоту **18** (схема 8.6). Разделение ее энантиомеров было осуществлено методом ХЛОХ на колонке, упакованной лихросорбтом RP-8 (Merck) с нанесенным комплексом



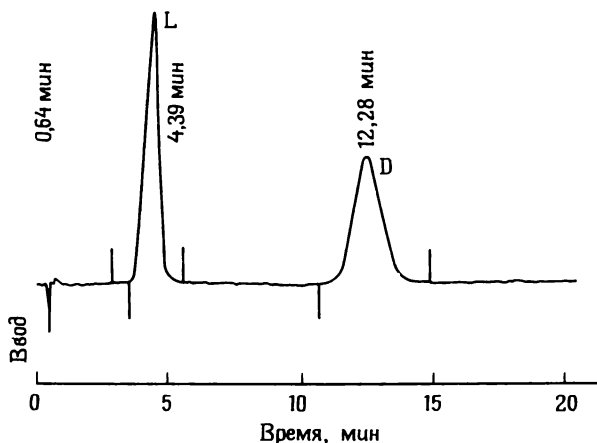


Рис. 8.13. Разделение энантимеров D,L-5,5-диметилтиазиолидинкарбоновой кислоты, полученной из D,L-пеницилламина (колонка 4×125 мм, скорость потока 3 мл/мин, УФ-детектор, 254 нм) [70] (с разрешения Elsevier Science Publishers B.V.).

Cu(II) и (2S, 4R, 2' RS)-4-окси-1-(2'-гидроксидодецил)пролина **19** [71]; подвижной фазой служила смесь метанол — вода (12:88 по объему) с 0,1 мМ сульфата меди (II), подкисленная до pH 4,5 фосфорной кислотой, при температуре колонки 50°C . Разделительную способность такой колонки демонстрирует рис. 8.13.

Оба метода позволяют определить менее 0,1% примеси другого энантиомера. Несколько более высокая чувствительность и точность ГХ-метода компенсируются риском частичной рацемизации ввиду более высокой температуры, необходимой для дериватизации [72].

Б. Дофа и ее производные. L-Дофа, L-(3,4-диоксифенил)аланин, широко применяется при лечении болезни Паркинсона. Она выступает в качестве предшественника дофамина, который вырабатывается в недостаточном количестве у страдающих этой болезнью. Однако L-дофа токсична [73, 74], и ее содержание необходимо контролировать, ввиду того что лечение предусматривает прием больших количеств препарата.

Как выяснилось, для такого контроля очень удобна ЖХ, основанная на методе ХЛОХ с применением подвижной фазы, содержащей добавки хирального соединения (см. разд. 7.3, а также описанный ниже метод) [75]. Хроматографическая система состоит из колонки C_{18} ($4,6 \times 250$ мм), которую уравнивают с подвижной фазой (водой), содержащей L-фенилаланин (6 мМ) и сульфат меди (II) (3 мМ). Элюируемые соединения обнаруживаются УФ-детектором при 280 нм.

Таблица 8.6. Данные по разделению оптических изомеров дофы и ее аналогов с помощью ХЛОХ [75] (с разрешения изд-ва)

Соединение	k'_D	k'_L	α	R_s	Состав подвижной фазы		
					L-Phe, mM	Cu(II), mM	CH ₃ OH, %
Дофа	1,7	2,4	1,4	2,9	6	3	0
Метилдофа	1,9	2,6	1,2	1,9	12	6	0
Карбидофа	7,4	9,5	1,2	3,4	6	3	0
Триптофан	5,8	7,0	1,2	2,6	8	4	10

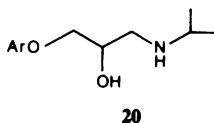
Два родственных химических соединения — метилдофа и карбидофа, L-формы которых используются как ингибиторы декарбоксилаз, и триптофан также можно анализировать этим методом. Как следует из табл. 8.6, все D-энантиомеры элюируются раньше соответствующих L-форм. Величины α (1,2—1,4) вполне достаточны для полного разделения энантиомеров. Градуировочная кривая дает коэффициент корреляции $> 0,986$ (для дофы 0,996) и относительное стандартное отклонение $< 1\%$.

8.3.2.2. ОСНОВНЫЕ (КАТИОННЫЕ) СОЕДИНЕНИЯ

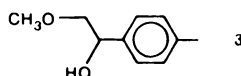
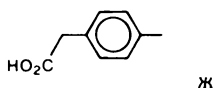
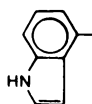
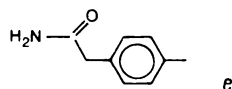
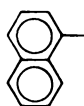
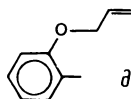
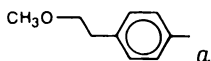
Многие важные лекарственные средства содержат алифатические аминогруппы и вследствие этого являются заряженными в физиологическом диапазоне pH. К такого рода лекарственным средствам принадлежат антихолиновые алкалоидные производные, аминоспирты, блокирующие или стимулирующие β -рецепторы и различные хиральные средства для местной анестезии.

Многочисленность и разнообразие имеющих большое значение хиральных лекарственных средств основного характера стимулировали интенсивное изучение возможности их непосредственного хроматографического разделения на энантиомеры. Далее, после сравнения достоинств различных подходов мы рассмотрим несколько конкретных биоаналитических методик.

Различное физиологическое воздействие энантиомеров β -адреноблокаторов привело к необходимости исследования возможности хроматографического разделения энантиомеров подобных соединений. Большинство из этих соединений отвечает общей формуле (20). Известно, что их (S)-форма часто в 50—100 раз более эффективна, чем (R)-энантиомер, и что последний даже может быть токсичным.



Ar =



Эти соединения слишком полярны, чтобы их можно было разделять методом ГХ без предварительной дериватизации, которая в некоторых случаях необходима и в ЖХ. Предпочтительный метод дериватизации — превращение в оксазолидоны реакцией с фосгеном [77]. В некоторых случаях используются нециклические карбаматы, получаемые по реакции с изоцианатами. Эти реакции представлены на схеме 8.7. Отметим, что оксазолидоны легко и без рацемизации расщепляются разбавленной щелочью с регенерацией исходной аминокислоты.

Ниже приводятся некоторые экспериментальные методики определения энантиомерного состава β -блокаторов. Первая из них, основанная на ГХ оксазолидоновых производных метопролола (**20a**) и двух его метаболитов (**20ж** и **20з**) [78] на капиллярной колонке (0,25 мм \times 18 м, стекло дюран), покрытой полимером ХЕ-60-1-валин-(R)- α -фенилэтиламида, описана Кенигом и соавторами [79, 80]. Соответствующие реакции и структуры соединений указаны на схеме 8.7.

Дериватизацию образца обычно осуществляют следующим образом. Растворяют 1 мг вещества в 1 мл буфера (рН 12, ионная сила 1) и

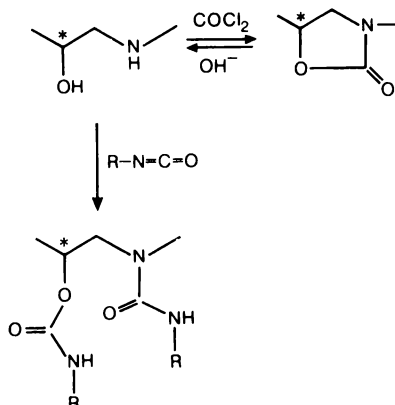


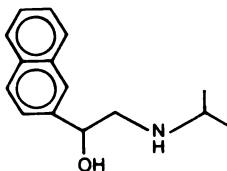
Схема 8.7. Общая структура β -блокаторов и реакции, используемые для превращения их в оксазолидины и карбоамидные производные.

перемешивают с 1 мл дихлорметана, далее добавляют 30 мкл 2М раствора фосгена в толуоле и встряхивают в течение 10 мин. После разделения фаз часть органической фазы упаривают и растворяют остаток в небольшом количестве дихлорметана.

Оксазолидон, полученный из α -оксиметаболита (20з), превращают в соответствующий триметилсилиловый эфир реакцией с N, O-бис(триметилсилил)ацетамидом (БСА). Другой метаболит, метопрололовую кислоту (20ж), этерифицируют диазометаном стандартным методом.

Газохроматографическое разделение проводят предпочтительно при температуре 195°C с водородом (давление 100 кПа) в качестве газа-носителя. Достигаемое значение α ($\sim 1,03$) соответствует полному или почти полному разделению. Порядок элюирования энантиомеров авторы не указывают.

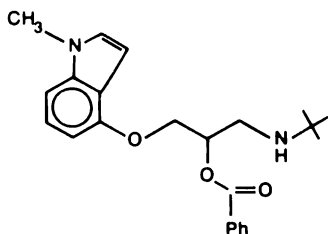
Вторая методика [81], применяемая для разделения энантиомеров пропанола (20б), основана на методе ЖХ. В этом случае хроматографирование проводится на колонке с (R)-N-(3,5-динитробензоил)фенилглицином (фаза Пиркла типа 1-A, 5 мкм, Regis Co., $4,6 \times 250$ мм). Образец плазмы крови человека [с введением внутреннего стандарта: 100 мкл раствора 20 мкг/мл пронетанола (21) в метаноле на пробирку] экстрагируют этиловым эфиром после добавления карбонатного буфера до pH 10. Собранные эфирные вытяжки (10 мл) охлаждают до 0°C , добавляют фосген (10 мкл 12,5%-ного раствора в толуоле) и интенсивно встряхивают 30 мин, после чего центрифугируют. Эфирную фазу упаривают в токе азота и растворяют остаток в 50 мкл метиленхлорида.



21

В качестве элюента используют смесь гексан — пропанол-2 — ацетонитрил (96:3:1) при скорости потока 2 мл/мин. Обнаружение осуществляют флуориметрически, облучая пробу светом с длиной волны 290 нм и измеряя излучение при 335 нм. Пропанолол можно обнаружить при его содержании в цельной крови вплоть до 10 нг/мл. Селективность разделения оксазолидонов пропанолола равна 1,09. Порядок элюирования оксазолидонов: (R, S)-пронетанол (один пик), (S)-пропанолол и (R)-пропанолол соответственно.

Третий способ — это разделение методом ЖХ на колонке ResolvoSil с силикагелем, покрытым БСА, в сочетании с масс-спектрометрией с термовводом [82]. Этим методом бопиндолол (22)



22

был разделен на энантиомеры непосредственно, без дериватизации. Пиндолол (20в) предварительно переводили в бисизопропилкарбомильное производное [$R = (CH_3)_2 CHNHCO$] (схема 8.7) реакцией с изоцианатом.

С этой целью 3 мг соединения нагревают 1,5 ч с 20 мкл метиленхлорида, 300 мкл триэтиламина и 400 мкл изопропилизоцианата при 100°C. После охлаждения растворитель и избыток реагентов удаляют током азота. Остаток растворяют в небольшом количестве пропанола-2.

Если для обнаружения используют УФ-детектор, подвижная фаза состоит из фосфатного буфера с добавкой небольшого количества пропанола-2 в качестве модификатора: например, для бопиндолла это — 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,0, с 0,5% пропанола-2, $\alpha = 1,46$.

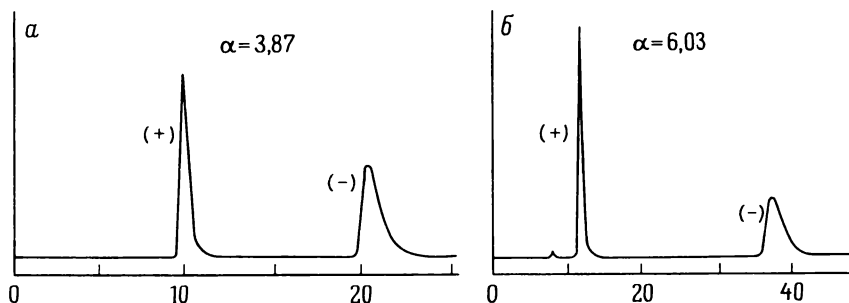


Рис. 8.14. Разделение энантимеров алпренолола (а) и оксипренолола (б) на колонках с силикагелем, покрытым трис (3,5-диметилфенилкарбаматом) целлюлозы [87] (с разрешения Chem. Soc. Japan.).

При масс-спектрометрическом обнаружении фосфатный буфер заменяют на 0,05М раствор формиата аммония с 2% пропанола-2 (этот же элюент пригоден для хроматографирования производных пиндолола).

Для непосредственного разделения энантимеров β -блокаторов пригодны также такие методы, как ион-парная хроматография с хиральным противоионом [83—85] и хроматографирование на колонках с α_1 -гликопротеиновой фазой (EnantioPac) [86]. Очень интересные результаты были получены Окамато и др. [87], проводившими разделение на силикагеле, покрытом трис(3,5-диметилфенил)карбомоилцеллюлозой. На этом сорбенте пять β -блокаторов (альпренолол 20г, оксипренолол (20д), пропанола 20б, пиндола 20в и атенола 20е) были полностью разделены на энантиомеры без дериватизации при элюировании смесью гексан — пропанол-2 (9:1). Некоторые из полученных результатов показаны на рис. 8.14. Причем в этом случае легко изменить масштаб хроматографического разделения с аналитического на препаративный. На препаративной колонке (20 × 500 мм) за один прогон были полностью разделены 100 мг (20), 150 мг (20г) и 400 мг (20д).

Полупрепаративное разделение (20а) и (20б) (в виде их оксазолидонов) осуществлено также на МТАЦ [88].

В ряде работ рассматривается разделение структурно-родственных эфедринов (имеющих структуру β -аминоспиртов). Непосредственное разделение энантимеров эфедрина и его метаболитов (в виде N, O-ПФП-производных) методом ГХ на колонке Chirasil-Val было описано еще в 1978 г. [89]. Позднее эфедрин, псевдоэфедрин и норэфедрин были разделены на энантиомеры в виде оксазолидонов на колонке с ХЕ-60-*L*-валин-(R)-фенилэтиламидом [90].

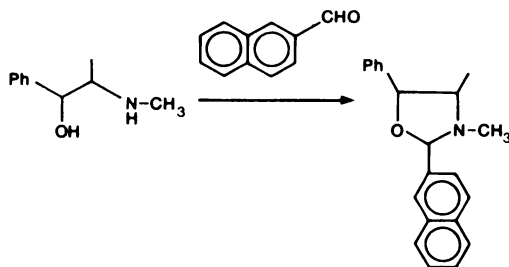


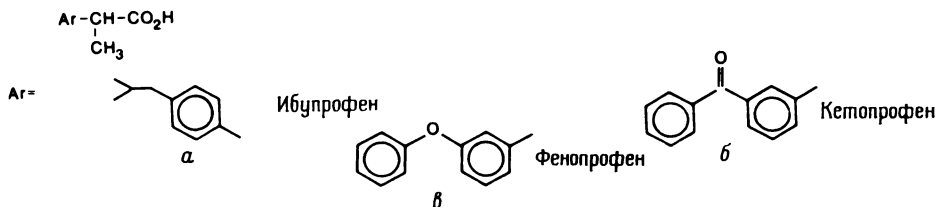
Схема 8.8. Циклизация эфедрина при реакции с 2-нафталальдегидом.

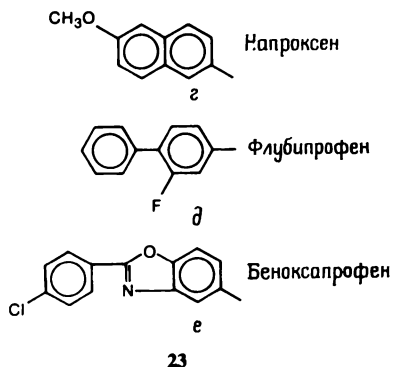
Интересный прием, использованный при разделении эфедрина методом ЖХ, описан Вайнером и др. [91]. Циклизацией с нафталальдегидом-2 были получены нафтилзамещенные оксазолидины, содержащие сильную π -донорную группу (схема 8.8), разделение которых, хотя и неполное, было проведено на колонке с (R)-N-(3,5-динитробензоил)фенилглицином (фаза Пиркла типа 1-А, 5 мкм, Regis Co, $4,6 \times 250$ мм). (1R, 2S)-Энантиомер элюировался раньше (1S, 2R)-энантиомера.

В статье [86] описано непосредственное, без предварительной дериватизации, разделение энантиомеров некоторых лекарственных средств основного характера, включая атропины, и средств для местной анестезии на колонках EnantioPac, а также посредством ионной хроматографии.

8.3.2.3. КИСЛОТНЫЕ (АНИОННЫЕ) СОЕДИНЕНИЯ

Многие кислотные карбоксилзамещенные лекарственные средства хорошо разделяются методом ЖХ без предварительной дериватизации. Особенно полезны колонки с ХНФ на основе белков, поскольку на них очень легко поддается регулированию и удерживание, и разделение. Типичными примерами лекарственных средств этой группы являются 2-арилзамещенные пропионовые кислоты (**23**), используемые как анальгетики. Эти соединения были разделены на колонках Resolvisil и EnantioPac.





При превращении свободной карбоксильной группы в амидную хорошие результаты были получены и на других типах сорбентов, например на сорбенте с ковалентно-связанным (R)-N-(3,5-динитробензоил)фенилглицином (Regis Hi-Chrom Reversible) или макропористом силикагеле, покрытом трис(фенилкарбаматом) целлюлозы (Daicel Chiralcel OC) [92, 93]. Для аналитических разделений последние колонки менее пригодны, чем колонки других типов, ввиду их

Таблица 8.7. Методы разделения энантиомеров некоторых жаропонижающих препаратов ряда арилпропионовых кислот^a

Соединение	Структура	Производное	Колонка/подвижная фаза	Литература
Ибупруфен	23а	— Амид (с НМА)	АГП/буфер ФГ/7,5% диоксана в гексане	94 92, 93, 95
Флубипрофен	23д	Амид (с НМА) Амид (с НМА)	ФГ/3% пропанола-2 в гексане ЦТФК/3% метанола в гексане	93 93
Беноксапрофен	23е	Амид (с НМА)	ФГ/пропанол-2 в гексане	92
Фенепрофен	23в	Амид (с НМА)	То же	92
Напроксен	23д	Амид (с НМА)		92
Кетопрофен	23б	— —	БСА/буфер БСА/буфер	54 54

^a АГП — колонка с кислотным α_1 -гликопротеином (EnantioPac), БСА — колонка с силикагелем, покрытым бычьим сывороточным альбумином (Resolvosil), ЦТФК — трис(трифенилкарбамат) целлюлозы, нанесенный на силикагель (Chiralcel OC), НМА — 1-нафтилметиламин, ФГ — ковалентно-связанный с силикагелем (R)-N-(3,5-динитробензоил)фенилглицин (Hi-Chrom Reversible).

невысокой эффективности. Ибупрофен (23а) и флупирофен (23д) в виде нафтилметиламидных производных были успешно разделены на колонках с фазами Пиркла при элюировании смесью диоксан/гексан (7,5:92,5); при этом можно было обнаружить наличие примерно 0,1% примеси второго энантиомера.

В табл. 8.7 представлены методы ЖХ для разделения энантиомеров кислотных лекарственных средств, основанные на ЖХ.

8.4. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

С развитием биотехнологии возрастает интерес к использованию ферментов и микроорганизмов как катализаторов химических превращений. Особый интерес в этом плане представляет возможность проведения реакций с высокой степенью стереоселективности с целью получения оптически активных соединений. И хотя уже накоплен большой практический опыт применения ферментов и клеток в этих целях, область приложения и потенциальные возможности метода намного шире. В частности, результаты микробиологических реакций трудно предсказуемы, и в этой связи практически всегда требуется мелкомасштабный скрининг. Такие исследования раньше тормозились из-за отсутствия необходимого метода контроля за прохождением стереоселективной реакции. Теперь с развитием хиральной хроматографии появилась возможность определять очень простым способом точный энантиомерный состав в пробах, взятых в любой момент прохождения ферментативной реакции. Площадь хроматографического пика измеряется электронным интегратором, связанным с детектором, что позволяет следить за прохождением реакции и ее стереохимией на пробах очень небольшого объема.

Для проведения таких анализов пользуются как ГХ, так и ЖХ на хиральных фазах. Примеры таких разделений, предусматривающих минимальную подготовку пробы, мы рассмотрим ниже.

8.4.1. ФЕРМЕНТАТИВНОЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ЭПОКСИДИРОВАНИЕ АЛКЕНОВ

После того как выяснилось, что некоторые ароматические углеводороды являются канцерогенами, началось интенсивное исследование реакции эпексидирования, катализируемой микросомами печени. Эти клеточные организмы содержат цитохром-Р-450-зависимую монооксигеназу, метаболическая функция которой состоит в окислении активированной двойной связи в оксирановую группу. Поскольку эта

группа высокореакционноспособна, предполагают, что она является ксенобиотиком, обладающим сильным канцерогенным и мутагенным действием [96].

Такое микросомальное эпексидирование, легко осуществляемое и *in vitro*, является высоко стереоселективным [97]. Однако до разработки методик хиральной ГХ провести прецизионное исследование этих процессов не представлялось возможным.

Поскольку эпексиды низших олефинов довольно летучи, их можно разделить посредством ГХ при относительно низкой температуре колонки без предварительной дериватизации. Первые работы по применению хиральной ГХ для исследования стереохимии микросомального эпексидирования серии олефинов были выполнены только несколько лет назад [97]. Приводимое ниже описание экспериментов заимствовано из работы [97], в которой окончательный энантиомерный анализ при помощи комплексообразующей ГХ.

Олефин (3—13 мкмоль) выдерживают с микросомомами (~ 1,5 мг белка/мл) при pH 7,4 и 37°C в 0,5 мл 0,15 М фосфатного буфера, содержащего NADP⁺ (1,0 мМ), изоцитрат-дегидрогеназу (0,1 МЕ), рацемический изоцитрат (8 мМ) для восстановления кофермента, хлорид магния (5 мМ) и 2-(трихлорметил)оксиран (4—9 мМ) (ингибитор эпексидгидролазы). Через 0,5—2 ч выделенный эпексид вводят в капиллярную колонку с нанесенным раствором 0,125 М бис[3-гептафторбутирил-(1R)-камфората]никеля в OV 101 (40 м × 0,25 мм, температура колонки 70°C, метод анализа газовой фазы).

Порядок элюирования и абсолютная конфигурация предпочтительно образующихся изомеров были определены хроматографией оксиранов с известной абсолютной конфигурацией. Во всех случаях наблюдалось предпочтительное образование (S)-изомера. Схема 8.9 показывает некоторые стереохимические результаты этих исследований.

Некоторые бактерии, как было показано, усваивают алкены, что сопровождается стереоселективным образованием эпексидов [98—102]. Авторы работы [103] изучали различные штаммы *Mucobacterium* в свете их способности продуцировать оптически активные эпексиды из ряда алкенов-1. Оптическую чистоту оксиранов определяли методом комплексообразующей газовой хроматографии [103] на капиллярной колонке, покрытой 0,12М раствором бис(3-гептафторбутирил-(1R)-камфората) никеля(II) (А) или 0,1М раствором бис(3-гептафторбутирил-(1R)-камфората)кобальта(II) (Б) в OV 101 (метилсиликон).

Эпексидирование пропена осуществлялось в ферментаторе при 30°C и pH 6,9 при непрерывной подаче в микробиологическую суспен-

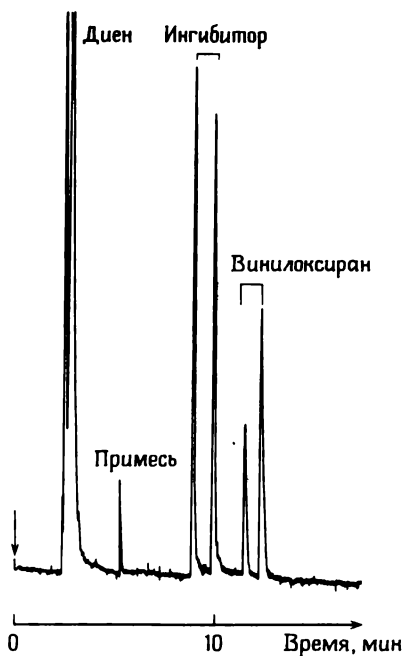
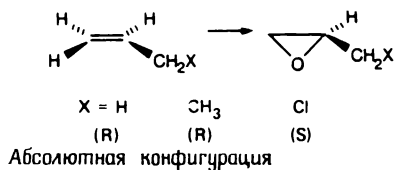


Схема 8.9. Микросомальное энантиоселективное эпоксирирование некоторых простых олефинов [97] (с разрешения Verlag Chemie GmbH.)

зию воздуха, содержащего 2% пропена. Микромасштабный скрининг процесса был проведен следующим образом. К суспензии клеток (20—50 мг сухой массы) в 50 мМ фосфатном буфере (3 мл), помещенной в сосуд с устройством для отбора пробы, добавляли 20 мкл алкена и перемешивали, периодически отбирая 100—200 мкл газовой фазы и непосредственно вводя ее в газовый хроматограф.

Результаты показывают, что большинство изученных организмов продуцируют один и тот же энантиомер с высоким оптическим выходом. Стереохимию реакции можно изобразить следующим образом:



Энантиомерная чистота эпоксидов, полученных с наиболее эффективным штаммом *Mycobacterium*, составляла 93—97% (X = H),

83—95% ($X = \text{CH}_3$) и 96—98% ($X = \text{Cl}$). Значения, полученные для каждого штамма, совпадали в пределах 1%.

При хроматографировании на колонках с хиральными фазами противоположной конфигурации [(R)- и (S)-хелаты металлов] наблюдалось полное изменение порядка элюирования энантиомеров на обратный. Этот элегантный и полезный метод позволяет путем сравнения данных интегрирования подтвердить энантиомерную чистоту фаз и правильность их идентификации.

На рис. 8.15 показана хроматограмма, иллюстрирующая очень быстрый стереохимический анализ микробиологической реакции эпексидирования.

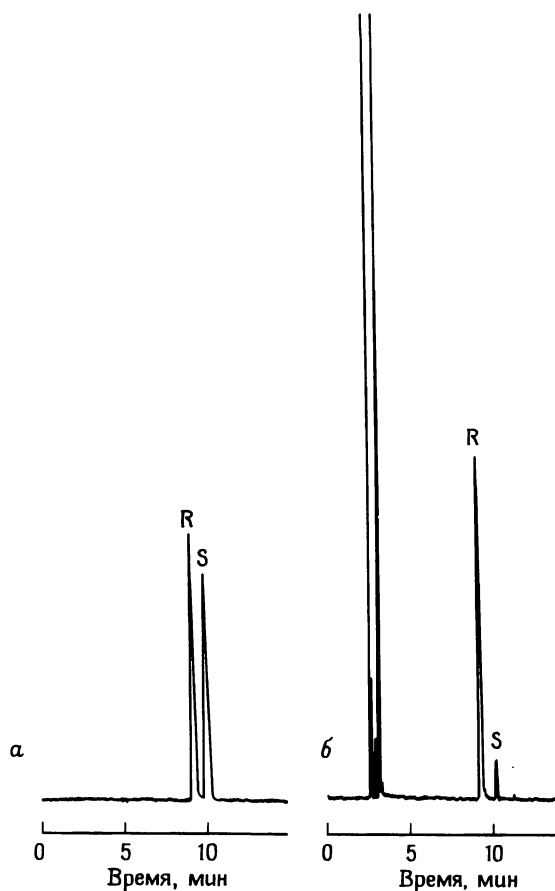


Рис. 8.15. Определение методом хиральной ГХ энантиомерного выхода эпексидов в микробиологической реакции (*a* — рацемический и *б* — синтезируемый микроорганизмами 1,2-эпоксипропан) [103] (с разрешения Butterworth Ltd.).

8.4.2. ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНЫЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ АМИДОВ И ЭФИРОВ

При изучении разделения оптических изомеров серии рацемических *N*-ацилированных аминокислот методом ЖХ на колонках Resolvosil неожиданно выяснилось, что отношение площадей пиков сильно отличается от 1, если буферный раствор анализируемого соединения находился при комнатной температуре в течение 24 ч [104]. Проведенные более систематические исследования микробиологических процессов показали, что как в *N*-бензоилаланине [105], так и в *N*-(*n*-нитробензоил)серине вследствие гидролиза амидной связи происходит предпочтительное разрушение *l*-энантимеров [105]. Аналогичным образом показано, что микроорганизмы вызывают энантиоселективный гидролиз эфирной связи. В этом случае энантиомерный состав эфирного субстрата и продукта гидролиза можно изучать одновременно [106]. Методика наблюдения за ходом реакции показана на рис. 8.16.

Из реакционной смеси отбирают аликвотную часть в несколько сот микролитров и быстро нагревают, чтобы дезактивировать фермент, убитые клетки отделяют центрифугированием и порцию надосадочной жидкости вводят в хроматографическую колонку.

В табл. 8.8 показаны результаты исследования ряда реакций.

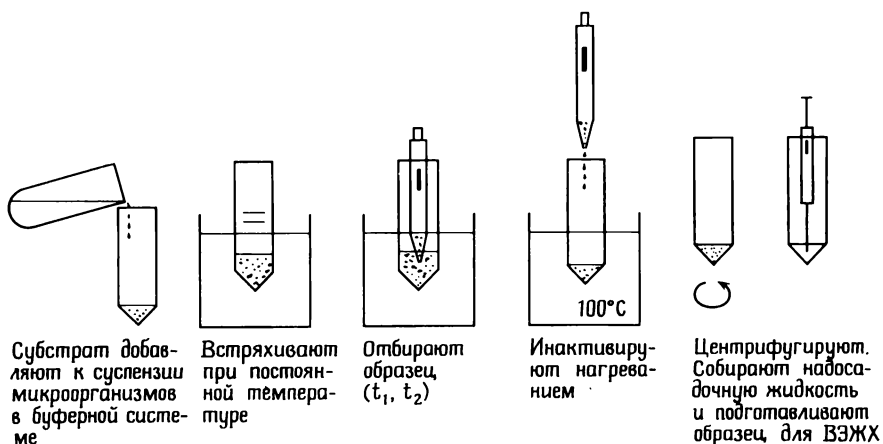


Рис. 8.16. Схема очень простой методики изучения с помощью обращенно-фазовой хиральной ЖХ кинетики энантиоселективного микробиального гидролиза.

Таблица 8.8. Энантиоселективность в микробиологических реакциях гидролиза, определенная с помощью хиральной ЖХ [106] (с разрешения Butterworth Ltd.)

Использованный микроорганизм	Субстрат	Наблюдаемый интермедиат	Стереохимическая предпочтительность
<i>Nocardia restrictus</i>	N-Ацетил-D, L-триптофан	—	L-Форма
	Этиловый эфир N-ацетил-D, L-триптофана	N-Ацетил-D-триптофан	(>95%)
	N-Бензоил-D, L-аланин	Бензойная кислота	L-форма (>98%)
<i>Arthrobacter oxydans</i>	N-Формил-D, L-триптофан	—	L-форма
	N-Ацетил-D, L-триптофан	—	L-форма
	Этиловый эфир N-ацетил-D, L-триптофана	N-Ацетил-D-триптофан	D-форма (>75%)
	N-Бензоил-D, L-аланин	Бензойная кислота	L-форма
<i>Pseudomonas putida</i>	N-Ацетил-D, L-триптофан	—	L-форма
	N-Бензоил-D, L-аланин	—	L-форма
<i>Nocardia coralina</i>	Этиловый эфир N-ацетил-D, L-триптофана	N-Ацетил-L-триптофан	L-форма

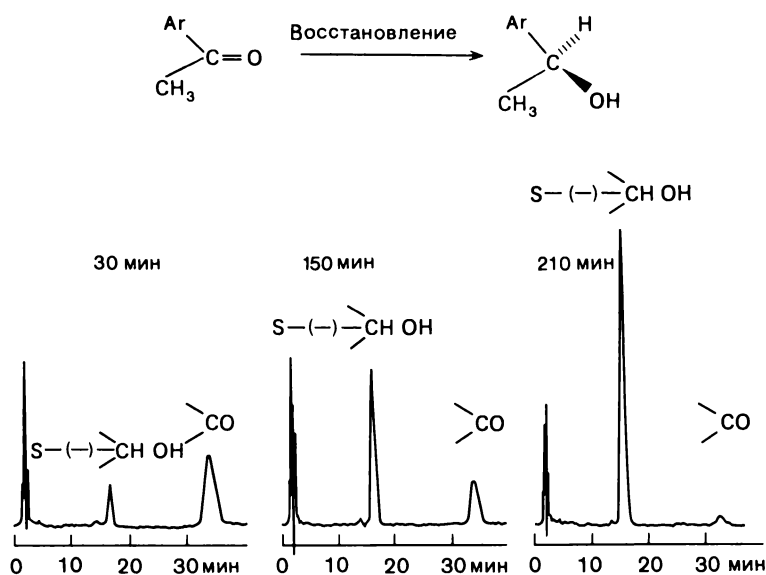


Рис. 8.17. Пример асимметрического восстановления ароматического кетона, изученного с помощью хиральной обращенно-фазовой ЖХ.

8.4.3. АСИММЕТРИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЕТОНОВ ДРОЖЖАМИ

Метод, описанный в разд. 8.4.2, был применен для изучения реакций асимметрического микробиологического синтеза. Субстратом в этом случае являлись ахиральные ароматические кетоны, и асимметрическое восстановление происходило под действием NAD(H)-зависимой алкогольдегидрогеназы, присутствующей в дрожжах. Эту реакцию лучше всего определить как энантиодифференцирующую по поверхности, т. е. она относится к тому же типу, что и описанная в разд. 8.4.1 реакция эпоксидирования (рис. 8.17).

Анализ реакционной смеси в различные моменты времени путем прямого ввода пробы на колонку Resolvosil показал, что реакция протекает с высокой или даже полной стереоспецифичностью, зависящей от конкретного вида микроорганизма. Во всех изученных случаях выполнялось правило Прелога: преимущественно образовывался (S)-энантиомер спирта.

8.5. ДРУГИЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ И ДРУГИЕ МЕТОДИКИ

8.5.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА РАЦЕМИЗАЦИИ

Как уже указывалось в разд. 5.3, многие хиральные соединения легко рацемизируются и скорость этого процесса часто слишком велика, чтобы его можно было изучить обычными хроматографическими методами или методом ЯМР. В обоих случаях скорость взаимопревращения энантиомеров коррелирует с коалесценцией пиков, зависящей от температуры. Хиральная хроматография может в этом случае служить методом непосредственного наблюдения за энантиомеризацией в процессе хроматографирования или выполнять роль препаративного метода обогащения одним из энантиомеров, осуществляемого с тем, чтобы иметь возможность поляриметрически изучить их взаимопревращение.

Первый из этих приемов был в очень элегантной форме использован Шурихом и сотр. [107, 108] в комплексообразующей газовой хроматографии (см. разд. 6.2). ГХ почти идеально подходит для этого, поскольку благодаря точным регуляторам температуры колонок, которыми снабжены современные приборы, легко позволяет определить зависимость хроматографических параметров от температуры.

Энантиомеризация в процессе разделения наблюдалась также и в жидкостной хроматографии. При попытке разделения ряда рацемических N,N'-диметилтиобензамидов (**24**) на энантиомеры на МТАЦ при комнатной температуре выяснилось [109], что ряд произ-

водных ($X = \text{H}$ или F) дает на хроматограмме только один пик, но не вследствие плохого разделения, а из-за быстрой рацемизации соединений, протекающей параллельно с их разделением на колонке (коалесценция пиков). Это обстоятельство характерно для всех соединений (вследствие термической рацемизации), если величина $\Delta\Delta G^\ddagger$ барье-

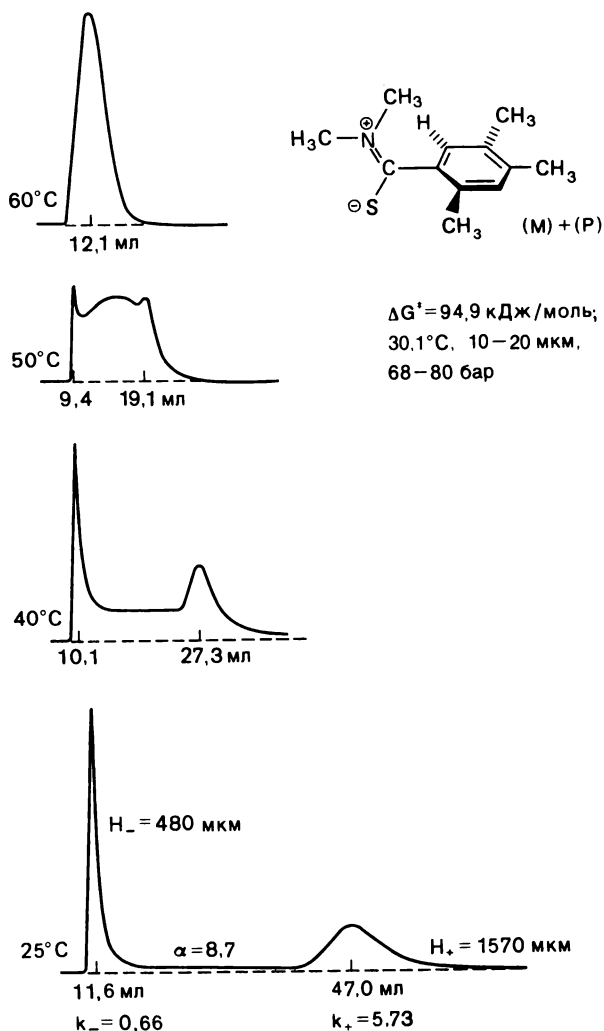
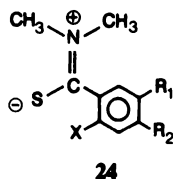


Рис. 8.18. Пример применения хиральной хроматографии для определения барьера термической рацемизации в тиобензамиде [109] (с разрешения Elsevier Science Publishers B.V.).

ра энантиомеризации составляет примерно 90 кДж/моль. Температурная зависимость результатов разделения для тиобензамида (**24**, $X = CH_3$) показана на рис. 8.18.

На МТАЦ было проведено энантиомерное обогащение многих со-



единений, представляющих теоретический интерес, с целью их последующего поляриметрического изучения. В числе прочих соединений описанным образом были исследованы хиральные углеводороды, такие как фенантроны [110] и *цис*, *транс*-циклооктадиен-1,3 [111], а также другие скрученные 1,3-циклодиены [112] и поляризованные алкеновые системы [113, 114].

8.5.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНОЙ КОНФИГУРАЦИИ ИЗ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ДАННЫХ

Как следует из изложенного в предшествующих главах, хиральная хроматография делает возможным определение абсолютной конфигурации соединения, присутствующего в очень малых количествах, если известно время удерживания обоих антиподов и если оно согласуется с общим механизмом хирального распознавания в данной системе. При этом можно руководствоваться двумя подходами: 1) устанавливать идентичность, исходя только из данных по удерживанию и используя в качестве стандарта соединение с уже известной абсолютной конфигурацией, и 2) исходить из предположения, что порядок элюирования данного соединения идентичен с таковым для родственного соединения с известной абсолютной конфигурацией.

В первом случае хиральная хроматография применяется лишь как чувствительный и селективный метод идентификации, во втором случае абсолютная конфигурация соединения устанавливается исключительно на основании механизма стереодифференциации, принимаемого для данной ХНФ. Следовательно, в этой ситуации необходимо детальное понимание взаимодействия сорбат—сорбент. Как было недавно показано [115], наличие различных функциональных групп в молекуле сорбата затрудняет создание единого механизма хирального распознавания. Поэтому в настоящее время определение абсолютной конфигурации более или менее сложных соединений на основании

только хроматографических данных является не вполне надежным. Требуется подтверждение независимыми методами, например ЯМР (см. гл. 3) [115]. В то же время, как следует из табл. 8.4, для замещенных бензодиазепинов существует отчетливая корреляция между порядком элюирования и конфигурацией соединения, что предполагает для них общий механизм хирального распознавания. Если селективность разделения энантиомеров достаточно велика, абсолютную конфигурацию членов данной серии можно с уверенностью найти по временам удерживания. Несомненно, что значение этого метода в будущем значительно возрастет.

8.5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ НЕПОЛНОМ РАЗДЕЛЕНИИ ЭНАНТИОМЕРОВ (МЕТОД МАНШРЕКА)

Определение оптической чистоты не представляет каких-либо сложностей, если разделение энантиомеров происходит полностью, до нулевой линии. Но ситуация становится более сложной, если мы имеем дело лишь с частичным разделением. Однако Маншрек и др. [116] разработали элегантное решение этой проблемы и с этой целью предложили использовать одновременно и УФ-детектор, и поляриметрический детектор.

Предположим, что мы можем измерить одновременно оптическое вращение α и поглощение A смеси энантиомеров в небольшом объеме в различное время. Как следует из закона Ламберта — Бера,

$$A = A_+ + A_- = \epsilon b (c_+ + c_-)$$

а согласно закону Бийо,

$$\alpha = \alpha_+ + \alpha_- = [\alpha] l (c_+ - c_-)$$

где b и l — длина оптического пути в кюветах.

В хроматографии зависимость параметров от времени эквивалентна их зависимости от объема подвижной фазы, прошедшей через колонку. Таким образом, $A(v)$ и $\alpha(v)$ также представляют собой хроматограммы, и мы можем найти следующую функцию: $C(v) = (\alpha/A)(v)$, где $\alpha/A = [\alpha] l (c_+ - c_-) / \epsilon b (c_+ + c_-)$.

Поскольку c_+ и c_- — это истинные концентрации энантиомеров в данный момент времени в данном элементарном объеме dv , то, следовательно, $c_+ = dn_+/dv$ и $c_- = dn_-/dv$, и можно записать следующее выражение:

$$C = \alpha/A = \frac{[\alpha] l}{\epsilon b} \left(\frac{dn_+ - dn_-}{dn_+ + dn_-} \right) = \frac{[\alpha] l}{\epsilon b} P', \quad (8.1)$$

где dn_+ и dn_- — число молей соответствующего энантиомера, находящихся в элементарном объеме. Таким образом, $(dn_+ - dn_-)/(dn_+ + dn_-)$ отвечает истинной энантиомерной чистоте P' в данном элементарном объеме.

Если разделения энантиомеров не происходит (пропускание через ахиральную колонку), P' постоянно и равно оптической чистоте образца P . В этом случае уравнение (8.1) сводится к выражению

$$C_m = \alpha_m / A_m = [\alpha] l / \varepsilon b \quad (8.2)$$

Если все же происходит какое-то разделение энантиомеров (пропускание через хиральную колонку, дающую частичное разделение), P' изменится с изменением v (объема элюата). В этом случае в самых первых или самых последних порциях элюата $P' = 1$ (100%-ная энантиомерная чистота) и уравнение (8.1) принимает такой вид:

$$C_+ = \alpha_+ / A_+ = [\alpha] l / \varepsilon b \quad (8.3)$$

Соответственно P определяется следующим образом:

$$P = C_m / C_+ \quad (8.4)$$

Если α и A определяются одновременно, энантиомерную чистоту образца P можно установить экспериментально из наклона зависимости α от A , которую дает двухкоординатный самописец. Таким образом, C_m определяется или в результате хроматографирования на

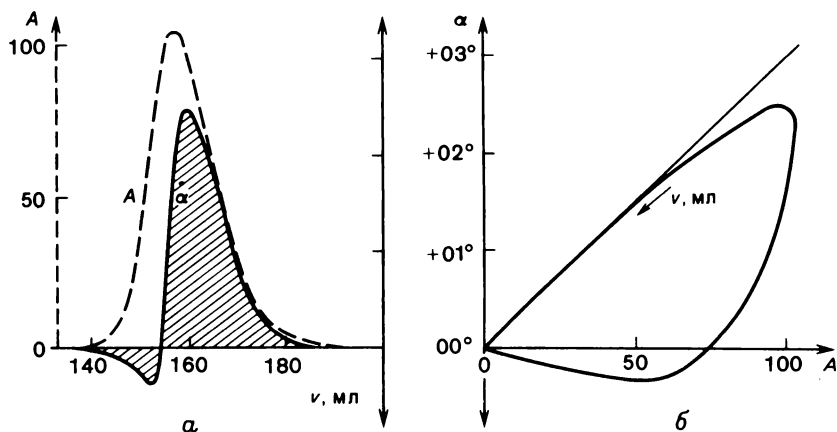


Рис. 8.19. Экспериментальные результаты, иллюстрирующие применение метода Маншрека. a — изменение A и α в процессе разделения, b — двухкоординатная запись $\alpha(A)$ для (+)-1-фенилэтанола ($P = 52\%$), полученного пропусканием через колонку с МТАЦ (в 96%-ном этаноле) [116] (с разрешения Verlag Chemie GmbH).

ахиральной колонке, или в результате отдельного определения для пробы α и A , а c_- (или c_+) находят из наклона (положительно или отрицательного) зависимости α от A , полученной при хроматографировании на хиральной колонке.

Для того чтобы можно было одновременно определять α и A , желательно пропускать элюат через УФ-детектор дважды; в этом случае применяется двойная кювета. Наглядный пример использования этого метода дан на рис. 8.19.

Упражнения

1. Дает ли метод, показанный на рис. 8.1, какую-либо информацию о количестве анализируемого вещества, которое рацемизируется в процессе хроматографирования? Почему? Как можно сконструировать систему, которая позволила бы получить эту информацию из одного хроматографического эксперимента?

2. Изобразите стереопроекционную формулу (S)-1-(α -нафтил)этанол, образующегося в результате гидридного переноса к прохиральному кетону, показанному на рис. 8.17.

Рекомендуемая литература

Reley J., Robinson J. A. Stereospecificity in Organic Chemistry and Enzymology, Verlag Chemie, Weinheim, 1982.

Mori K. Techniques of Pheromone Research, Hummel H. E., Miller T. A. (eds.) Springer Verlag, New York, 1984, p. 323.

Tressl R., Engel K.-H., Albrecht W., Bille-Abdullah H. Analysis of Chiral Aroma Components in Trace Amounts, in Characterization and Measurements of Flavor Compounds, Bill B. B., Mussian C. J. (eds.) ACS, Washington DC, 1985, p. 43.

Tumlinson J. H. III Beetles: Pheromonal Chemists par Excellence, in Bioregulators for Pest Control, P. A. Hedin (ed.), ACS, Washington DC, 1985, p. 367.

Bojarski J. Chromatographic Resolution of Enantiomers and its Pharmaceutical Applications, in Chromatography 85, H. Kalaz and L. S. Ettre (eds.), Akademiai Kiado, Budapest, 1986, p. 343.

Dappen R., Arm H., Meyer V. R. Applications and Limitations of Commercially Available Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatog.*, **373**, 1 (1986), *Chromatog., Rev.*, **31**, 1 (1986).

Schurig V. Current Methods for Determination of Enantiomeric Compositions, Part 3, Gas Chromatography on Chiral Stationary Phases, Kontakte (Darmstadt), No. 1, 3 (1986).

Цитируемая литература

1. *Moore S., Stein W. H.* *J. Biol. Chem.*, **192**, 663 (1951).

2. *Kleikauf H., Von Doehren H.* (eds.), Peptide Antibiotics: Biosynthesis and Funktion, de Gruyter, Berlin, 1982.

3. *Frank H., Nicholson G., Bayer E.* *J. Chromatog.*, **167**, 187 (1978).

4. *Blair N. E., Bonner W. A.* *J. Chromatog.*, **198**, 185 (1980).

5. *Bestmann H. J., Hirsh W. L., Platz H., Reinwald M., Wostrowsk O.* *Angew. Chem.*, **92**, 492 (1980).
6. *Silverstein R. M.* In *Chemical Ecology: Odour Communication in Animals*, F. J. Ritter (ed.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1979, p. 133.
7. *Cammaerts M., Attygalle A. B., Evershed R. P., Morgan E. D.* *Physiol. Entomol.*, 1985, **10**, 33.
8. *Pearce G. T., Gore W. E., Silverstein R. M., Peacock J. M., Cuthbert R. et al.* *J. Chem. Ecol.*, **1**, 115 (1975).
9. *Mori K.* *Tetrahedron*, **33**, 289 (1977).
10. *Riley R. G., Silverstein R. W., Moser J. M.* *Science*, **183**, 760 (1974).
11. *Sakito Y., Mukaiyama T.* *Chem. Lett.*, 1979, 1027.
12. *Asami A., Mukaiyama T.* *Chem. Lett.*, 1983, 93.
13. *Mori K., Watanabe H.* *Tetrahedron*, **41**, 3423 (1985).
14. *Bestmann H. J., Attygalle A. B., Glasbrenner J., Riemer R., Vostrovsky O.* *Angew. Chem.*, **99**, 784 (1987).
15. *Franke W., Heemann V., Gerken B., Ranwick A. A., Vite J. P.* *Naturwiss.*, **64**, 590 (1977).
16. *Franke W., Hindorf G., Reith W.* *Liebigs. Ann. Chem.*, 1979, 1.
17. *Franke W., Reith W., Bergstrom G., Tengo J.* *Naturwiss.*, **67**, 149, (1980).
18. *Franke W., Reith W., Bergstrom G., Tengo J. Z.* *Naturforsch.* **36**, 928 (1981).
19. *Koppenhofer B., Hintzer K., Weber R., Schurig V.* *Angew. Chem.*, **92**, 473 (1980).
20. *Weber R., Schurig V.* *Naturwiss.*, **68**, 330 (1981).
21. *Schurig V., Weber R., Klimentzek D., Kohnle U., Mori K.* *Naturwiss* **69**, 602 (1982).
22. *Schurig V., Weber R., Nicholson G. J., Oelschlager A. E., Pierce H. Jr., Pierce A. M., Borden J. H., Rykert L. C.* *Naturwiss.*, **70**, 92 (1983).
23. *Isaksson R., Liljefors T., Reinholdson P.* *Chem. Commun.*, 1984, 137.
24. *Allgaier H., Jung G., Werner R. G., Schneider U., Zahner H.* *Angew. Chem.*, **97**, 1052 (1985).
25. *Kusters E., Allgaier H., Jung G., Bayer E.* *Chromatographia*, **18**, 287 (1984).
26. *Gross E., Morrel J. L.* *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 4634 (1971).
27. *Gross E., Kiltz H. H., Nebelin E. Z.* *Physiol. Chem.*, **354**, 810 (1973).
28. *Wakamiya T., Ueki Y., Shiba T., Kido Y., Motoki Y.* *Tetrahedron Lett.*, **26**, 665 (1985).
29. *Bohle T., Yu D., Stuwe H. T., Konig W. A.* *Angew. Chem.*, **99**, 362 (1987), *Int. Ed.*, **26**, 331 (1987).
30. *Konig W. A., Benecke I., Lucht N., Schmidt E., Schulze J., Sievers S. J.* *Chromatog.*, **279**, 555 (1983).
31. *Kosceilski T., Sybilska D., Belniak S., Jurczak J.* *Chromatog.*, **19**, 292 (1984).
32. *Kosceilski T., Sybilska D., Jurczak J. J.* *Chromatog.*, **364**, 299 (1986).
33. *Ariens E. J., Soudijn W., Timmermans P.* *Stereochemistry and Biological Activity of Drugs*, Blackwell, Oxford, 1983.
34. *Ariens E. J.* *Trends Pharmacol. Sci.*, **7**, 200 (1986).
35. *Wahlstroem G.* *Life Sci.*, **5**, 1781 (1966).
36. *Wahlstroem G.* *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **26**, 81 (1968).
37. *Buch H., Buzello W., Nuerohr O., Rummel W.* *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 2391 (1968).
38. *Blaschke G.* *Angew. Chem.*, **92**, 14 (1984).
39. *Okamoto I., Shibata T.* неопубликованные результаты (см. [41]).
40. *Armstrong D. W., DeMond W. J.* *Chromatog. Sci.*, **291**, 411 (1984).
41. *Shibata T., Okamoto I., Ishii K. J.* *Liquid Chromatog.*, **9**, 313 (1986).
42. *Yang Z.-Y., Barkan S., Brunner C., Weber J. D., Doyle T. D., Wainer I. W. J.* *Chromatog.*, **324**, 44 (1985).
43. *Pirkle W. H., Finn J. M., Schreiner J. L., Hamper B. J.* *Am. Chem. Soc.* **103**, 3964 (1981).

44. *Wedlung P. J., Sweetman B. J., McAllister C. B., Branch R. A., Wilkinson G. R.* J. Chromatog., **307**, 121 (1984).
45. *Kupfer A., Roberts R. K., Schenker S., Branch R. A.* J. Pharmacol. Exp. Theor., **218**, 193 (1981).
46. *Wollweber H., Horstmann H., Meng K.* Eur. J. Med. Chem. (Chim. Theor.), **11**, 159 (1976).
47. *Tobert J. A., Cirilio V. J., Hitzenger G., James I., Pryor J., Cook T., Bunthinx A., Holmes J. B., Lutterbeck P. M.* Clin. Pharmacol., Ther. **29**, 344 (1981).
48. *Blaschke G., Maibaum J.* J. Pharm. Sci., **74**, 438 (1985).
49. *Sternbach L. H.* J. Med. Chem., **22**, 1 (1979).
50. *Blaschke G., Markgraf H.* Chem. Ber., **113**, 2031 (1980).
51. *Blaschke G.* J. Liquid Chromatog., **9**, 341 (1986).
52. *Pirkle W. H., Tsiouras A.* J. Chromatog., **291**, 291 (1984).
53. *Allenmark S.* J. Liquid Chromatog., **9**, 425 (1986).
54. *Allenmark S., Anderson S.* неопубликованные результаты.
55. *Brassfield H. A., Jacobson J. A., Verkade J. G.* Am. Chem. Soc., **97**, 4143 (1975).
56. *Johne S.* Pharmacie, **36**, 583 (1981).
57. *Colebrook L. D., Giles H. G.* Can. J. Chem., **53**, 3431 (1975).
58. *Mannschreck A., Koller H., Stuehler G., Davies M. A., Traber J.* Eur. J. Med. Chem. (Chim. Ther.), **19**, 381 (1984).
59. *Hess P., Lansman J. B., Tsien R. W.* Nature, **311**, 538 (1984).
60. *Franckowiak G., Bechem M., Schramm M., Thomas G.* Eur. J. Pharmacol. **114**, 223 (1985).
61. *Hof R. P., Ruegg U. T., Hoff A., Vogel A.* J. Cardiovasc. Pharmacol., **7**, 689 (1985).
62. *Blaschke G., Maibaum J.* J. Chromatog., **366**, 329 (1986).
63. *Blaschke G., Broeker W., Fraenkel W.* Angew. Chem., **98**, 808 (1986). Int. Ed., **25**, 830 (1986).
64. *Gjoerstrup P., Harding H., Isaksson R., Westerlung C. J.* Eur. Pharm., **122**, 357 (1986).
65. *Allenmark S., Thompson R. A.* Tetrahedron Lett., **28**, 3751 (1978).
66. *Jaffe A.* Arthritis Rheum., **13**, 436 (1970).
67. *Sternlieb I., Scheinberg I. H.* J. Am. Med. Assoc., **189**, 748 (1964).
68. *Wacker A., Heyl E., Chandra P.* Arzhineim. Forsch., **30**, 395 (1971).
69. *Konig W. A., Steinbach E., Ernst K. J.* Chromatog., **301**, 129 (1984).
70. *Busker E., Gunter K., Martens J. J.* Chromatog., **350**, 179 (1985).
71. *Busker E., Martens J. Z.* Anal. Chem., **319**, 907 (1984).
72. *Frank H., Woiwode W., Nicholson G., Bayer E.* Liebigs. Anal. Chem., **1981**, 354.
73. *Cotzias G. C., Papavasiliou P. S., Gellene R.* New Engl. J. Med., **280**, 337 (1980).
74. *Poskanzer D. C.* New Engl. J. Med., **280**, 362 (1969).
75. *Gelber L. R., Neumeyer J. L.* J. Chromatog., **257**, 362 (1983).
76. *Nelson W. L., Burke T. R., Jr.* J. Org. Chem., **43**, 3641 (1978).
77. *Gyllenhaal O., Vessman J. J.* Chromatog., **273**, 129 (1983).
78. *Gyllenhaal O., Konig W. A., Vessman J. J.* Chromatog., **350**, 328 (1985).
79. *Konig W. A., Benecke I., Sievers S. J.* Chromatog., **217**, 71 (1981).
80. *Konig W. A., Ernst K. J.* Chromatog., **280**, 135 (1983).
81. *Wainer I. W., Doyle D., Donn K. H., Powell J. R. J.* Chromatog., **304**, 405 (1984).
82. *Kusters E., Giron D. J.* High Resol. Chromatog. Chromatog. Commun., **9**, 531 (1986).
83. *Pettersson C., Schill G. J.* Chromatog., **204**, 179 (1981).
84. *Pettersson C., Schill G. J.* Liquid Chromatog., **9**, 269 (1986).
85. *Pettersson C., Josefsson M.* Chromatographia, **21**, 321 (1986).
86. *Schill G., Wainer I. W., Barkan S. A. J.* Liquid Chromatog., **9**, 641 (1986).

87. Okamoto Y., Kawashima K., Aburatani R., Hatada K., Nishiyama T., Masida M. Chem. Lett., 1986, 1237.
88. Isaksson R., Lamm B. J. Chromatog., **362**, 436 (1986).
89. Frank H., Nicholson G. J., Bayer E. J. Chromatog., **146**, 197 (1978).
90. Konig W. A., Ernst K., Vessman J. J. Chromatog., **294**, 423 (1984).
91. Wainer I. W., Doyle T. D., Hamidzadeh Z., Aldridge M. J. Chromatog. **261**, 123 (1983).
92. Wainer I. W., Doyle T. D. J. Chromatog., **284**, 117 (1984).
93. McDaniel D. M., Shider B. G. J. Chromatog., **404**, 123 (1987).
94. Hermansson J., Eriksson M. J. Liquid Chromatog., **9**, 621 (1986).
95. Crowther J. B., Covey T. R., Dewey E. A., Henion J. D. Anal. Chem., **56**, 2921 (1984).
96. van Bladeren P. J., Armstrong R. N., Cobb D., Thakker D. R., Ryan D. E., Thomas T. E., Sharma N. D., Boyd D. R., Levin W., Jerina D. E. Biochem. Biophys. Res. Commun., **106**, 602 (1982).
97. Schurig W., Wistuba D. Angew. Chem., **96**, 808 (1984).
98. May S. W., Schwartz R. D. J. Am. Chem. Soc., **96**, 4031 (1974).
99. May S. W., Steltenkamp M. S., Schwartz R. D., McCoy C. J. Am. Chem. Soc., **98**, 7856 (1976).
100. Ohta H., Tetsukawa H. Agric. Biol. Chem., **43**, 2099 (1979).
101. Furuhashi K., Taoka A., Uchida S., Karube I., Suzuki S., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **12**, 39 (1981).
102. deSmet M. J., Kingma I., Wynberg H., Witholt B. Enzyme Microb. Technol., **5**, 352 (1983).
103. Habetz-Cruetzen A. W. H., Carlier S. J. N., deBont J. A. M., Wistuba D., Schurig V., Hartmans S., Tramper J. Enzyme Microb. Technol., **7**, 17 (1985).
104. Allenmark S., Bomgarten B., Boren H. J. Chromatog., **264**, 63 (1984).
105. Allenmark S., Bomgarten B., Andersson S. Prep. Biochem., **14**, 139 (1984).
106. Allenmark S., Bomgarten B., Boren H. Enzyme Microb. Technol., **8**, 404 (1986).
107. Schurig V., Buerkle W. J. Am. Chem. Soc., **104**, 7573 (1982).
108. Burkle W., Karfunkel H., Schurig V. J. Chromatog., **288**, 1 (1984).
109. Eiglsperger A., Kastner F., Mannschreck A. J. Mol. Structure, **126**, 421 (1985).
110. Scherubl H., Fritzsche U., Mannschreck A. Chem. Ber., **117**, 336 (1984).
111. Isaksson R., Roschester J., Sandstrom J., Wistrand L. G. J. Am. Chem. Soc., **107**, 4074 (1985).
112. Anderson L., Aurell C. J., Lamm B., Isaksson R., Sandstrom J., Stenval K. Chem. Commun., 1984, 411.
113. Berg U., Isaksson R., Sandstrom J., Sjostrand U., Eiglsperger A., Mannschreck A. Tetrahedron Lett., **23**, 4237 (1982).
114. Zul-Quarnain Khan A., Isaksson R., Sandstrom J. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1987, 491.
115. Stipanovic R. D., McCormick J. P., Schlemper E. O., Hamper B. C., Shinmyozu T., Pirkle W. H. J. Org. Chem., **51**, 2500 (1986).
116. Mannschreck A., Eiglsperger A., Stuhler G. Chem. Ber., **115**, 1568 (1982).

9. ПРЕПАРАТИВНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ — ЗНАЧЕНИЕ, УСПЕХИ И ПРОБЛЕМЫ

Классические методы разделения оптических изомеров, основанные на раскristаллизации диастереомерных солей или лабильных комплексов, можно легко масштабировать на большие количества вещества. Однако даже если весь процесс непосредственно ведет к целевому продукту (что бывает довольно редко), он обычно мало подходит для промышленного производства и автоматизации главным образом из-за большого числа перекристализаций, необходимых для выделения диастереомера требуемой чистоты. Полученный таким образом продукт, как правило, загрязнен небольшими количествами противоположного энантиомера, и для повышения его оптической чистоты необходима повторная кристаллизация. Второй энантиомер, который выделяют из маточных растворов после первых кристаллизаций, редко получается с тем же выходом, что и первый энантиомер. Таким образом, классический процесс разделения всегда сопровождается потерей ценного материала, которую трудно контролировать и которой трудно избежать, если не прибегать к сложным методам рециклизации.

В свете изложенного легко представить преимущества разделения больших количеств энантиомеров хроматографическими методами. Они суммированы ниже.

1. При разделении на иммобилизованных неподвижных фазах исключается потеря ценных оптически активных материалов.

2. Оптическая чистота материала, выполняющего роль неподвижной фазы, не является критическим параметром, поскольку она влияет только на селективность разделения.

3. Если хроматографические пики полностью разделены до нулевой линии, оба энантиомера получают со 100%-ной оптической чистотой и количественным выходом.

4. Контроль за процессом разделения можно легко автоматизировать.

Первые два положения являются очень важными и определяют перспективность ЖХ как метода препаративного разделения оптических изомеров. Непрерывность процесса без какой-либо потери ценно-

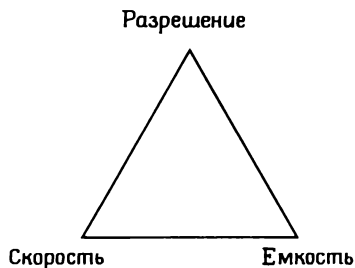


Рис. 9.1. «Хроматографический треугольник», показывающий, что выигрывая в одном, мы теряем в другом.

го разделяемого материала крайне необходима в промышленных процессах. Но использование метода ЖХ для разделения больших количеств сопряжено с определенными трудностями. Довольно ограниченная емкость хроматографических сорбентов означает, что чрезмерное увеличение нагрузки колонки ухудшает ее разделительную способность. В то же время размеры хроматографической колонки нельзя увеличивать до бесконечности, поскольку это приводит к возникновению других проблем, таких как проблема нанесения пробы, появление нежелательных мертвых объемов и т. д. В хроматографии всегда необходимо находить компромиссные решения. Изложенная ситуация часто изображается схемой, приведенной на рис. 9.1. Этот треугольник показывает, что если мы хотим увеличить емкость, то жертвуем скоростью и(или) разрешением. В общем случае, для того чтобы работать в линейной области изотермы сорбции, количество вещества, вводимого на колонку с обычной емкостью, не должно превышать 1 мг на 1 г сорбента. Следовательно, на препаративной колонке, содержащей 1 кг сорбента, можно разделить без заметного ухудшения ее разделительной способности пробу, масса которой не превышает 1 г. Вводимое количество можно увеличить, но только до такого уровня, при котором эффективность колонки и ее разрешение еще обеспечивают необходимый выход продукта желаемой оптической чистоты. Табл. 9.1 дает представление о величине пробы для колонок различных размеров.

Совершенно ясно, что область приложения препаративной ЖХ очень широка и предусматривает, в частности, выделение одного или нескольких соединений путем сбора соответствующих фракций элюата. Если необходимо получить всего несколько миллиграммов чистого продукта для масс-спектрометрического исследования, то в этом случае можно использовать аналитическую колонку, но обычно для разделения нескольких сотен и более миллиграммов за одно разделение прибегают к ЖХ. Колонки, допускающие загрузку 0,1—1 г, имеют обычные для лаборатории размеры, и работа с ними не вызывает

Таблица 9.1. Количество вещества, которое можно разделить на препаративных колонках различного назначения

Тип колонки	Внутренний диаметр, мм	Применение	Количество неподвижной фазы, г	Примерная максимальная нагрузка, мг
Аналитическая	1—5	Выделение чистых образцов для МС- или ИК-спектроскопического исследования (0,001—0,1 мг)	0,2—3	0,2—3
От аналитической до полупрепаративной	6—11	Выделение чистых образцов для ЯМР или элементного анализа (0,1—25 мг)	3—25	3—25
От полупрепаративной до препаративной	10—30	Мелкомасштабные синтезы (0,1—1 г)	25—100	20—1000
Препаративная	20—100	Крупномасштабные синтезы (1—100 г)	100—10 ⁴	100—10 ⁴
Промышленная	100—1000	Синтезы промышленного масштаба	10 ³ —10 ⁵	10 ³ —10 ⁵

каких-либо особых проблем. При дальнейшем увеличении загрузки, скажем в 100—1000 раз, которое может потребоваться в промышленных целях, необходимо найти подходящие методы, обеспечивающие равномерное распределение пробы на входе в колонку, поддерживающие постоянную скорость потока элюента через колонку и сохраняющие воспроизводимую разделительную способность колонки. Для этого необходимо контролируемое сжатие частиц сорбента в колонке, устранение мертвых объемов, а также решение ряда проблем, связанных с загрязнением продукта. В нашу задачу не входит подробное обсуждение подобных проблем, и мы перечислили их лишь с тем, чтобы показать, что практическое масштабирование хроматографического процесса существенно более сложно, чем это представляется теоретически.

Далее мы рассмотрим, какие свойства хиральных сорбентов наиболее важны для непосредственного разделения оптических изомеров в действительно препаративном масштабе, какие сорбенты более пригодны для использования в лаборатории и каковы достоинства и недостатки последних.

Из сказанного выше следует, что непрерывная эксплуатация колонки возможна в том случае, если материал упаковки отвечает опре-

деленным требованиям. Прежде всего необходима несжимаемая (типа силикагеля) матрица, поскольку пока мы не располагаем органическими материалами с эквивалентными механическими свойствами. Затем хиральный сорбент должен обладать высокой емкостью, т. е. число энантиодифференцирующих сорбционных центров в расчете на 1 г сорбента должно быть возможно более высоким. Желательно также, чтобы система сорбент/подвижная фаза обеспечивала высокую селективность разделения интересующих энантиомеров, поскольку чем выше значение α , тем выше допустимая перегрузка колонки. Конечно, стоимость хирального сорбента — очень важный фактор в промышленных процессах разделения. Далее, сорбент должен быть химически инертен в применяемых условиях, т. е. не должно происходить выноса неподвижной фазы или ее гидролиза, или каких-либо других реакций, которые могут изменить свойства сорбента.

Другие желательные, но менее обязательные в отношении данного разделения свойства — это широкий спектр применения сорбента и возможность эффективного регулирования времени удерживания путем изменения состава подвижной фазы.

В какой мере эти желаемые свойства характерны для хиральных сорбентов, используемых в настоящее время для препаративных разделений? Давайте рассмотрим различные типы сорбентов.

1. Сорбенты на основе полисахаридов и их производных. Как уже упоминалось в гл. 7, наиболее распространенный и наиболее полно изученный сорбент этой группы — триацетилцеллюлоза, особенно ее микрокристаллическая форма. Это довольно дешевый материал, но его свойства могут различаться от партии к партии. Поскольку для хроматографии сорбент используют в набухшем состоянии, он подвержен до некоторой степени сжатию, хотя МТАЦ с малым размером частиц была успешно применена в стальных колонках при довольно высоком давлении (50—100 бар) [1]. Тем не менее препаративные разделения на этом сорбенте были выполнены только при низком или среднем давлении, которые обеспечивают лишь очень низкую эффективность колонки. И все же на колонках вполне умеренного размера можно осуществить за один прогон разделение граммовых количеств энантиомеров (рис. 9.2).

В свете успехов, достигнутых Окамото и др. (см. разд. 7.1.1.2) при нанесении МТАЦ и других производных полисахаридов на силикагелевую подложку, в ближайшем будущем можно ожидать появления улучшенных сорбентов такого типа для препаративной хроматографии. Важный аспект применения МТАЦ, к которому стоит сейчас вернуться, — это возможность разделения на ней энантиомеров соедине-

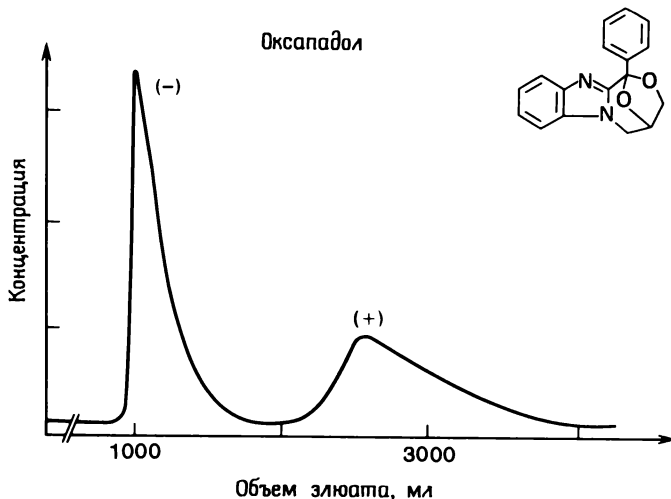


Рис. 9.2. Разделение 2,1 г рацемического оксападола на энантиомеры на колонке (38 × 700 мм) с 380 г МТАЦ (элюент 95%-ный этанол, скорость потока 90 мл/ч). Обратите внимание, что для разделения необходимо почти 48 ч [8] (с разрешения Magel Dekker Inc.).

ний, не имеющих полярных функциональных групп, например углеводов [2]. Эти свойства, в настоящее время уникальные, делают данный тип хиральных сорбентов чрезвычайно необходимым для получения небольших количеств оптически активных углеводов, которые другими методами пока недоступны.

Явным недостатком таких модифицированных биополимеров является их плохая совместимость со многими органическими растворителями. Так, МТАЦ, например, частично растворима в хлороформе, диоксане и ацетоне [3].

Нанесение производных микрокристаллической целлюлозы на силикагель неизбежно связано с образованием более аморфной структуры, даже если исследование этого материала с помощью дифракции рентгеновских лучей [4, 5] показывает, что в них еще присутствует некоторое количество микрокристаллических областей. Влияние подобной обработки на хроматографические свойства было тщательно изучено группой Маншрека [6], которая обнаружила очень большое различие в разделительных свойствах МТАЦ в зависимости от того, в каком виде она используется — как таковая или после нанесения на силикагель. В одинаковых условиях (96%-ный этанол) значения k' на МТАЦ значительно выше. Аналогично все исследованные соединения, за исключением гексагелицена, показывают на МТАЦ значитель-

но более высокие значения α . Однако на колонке с силикагелевой матрицей k' и α значительно возрастают с увеличением полярности (содержания воды) подвижной фазы. Колонки с сорбентом на основе силикагеля имеют явно бо́льшую эффективность для неудерживаемого соединения (1,3,5-три-*трет*-бутилбензола); высота, эквивалентная теоретической тарелке, H , составляет около 50 мкм [5]. С другой стороны, их емкость меньше, чем у колонок с МТАЦ.

Исследования, проведенные авторами статьи [6], показали, что емкость колонки с МТАЦ составляет примерно 0,5 мг/г; при большей загрузке k' резко уменьшается. Кроме того, при этом наблюдается значительное возрастание высоты, эквивалентной теоретической тарелке, что приводит к быстрому ухудшению разрешения.

Другим очень важным параметром, влияющим на результаты препаративной работы на МТАЦ, является скорость подачи элюента. Как установили авторы работ [3, 7], чтобы снизить H до минимума, необходимо в соответствии с уравнением Ван-Деемтера (см. разд. 4.2) проводить разделение при линейной скорости потока около 0,1 мм/с. В цитируемой работе использовалась аксиально сжатая препаративная колонка (40 × 243 мм) со свободным объемом (V_0) 191 мл (по 1,3,5-три-*трет*-бутилбензолу). Это означает, что время выхода неудерживаемого компонента t_0 при оптимальной скорости потока составляет 40,5 мин. Соответственно препаративные разделения на тонкоизмельченной МТАЦ ускорить очень трудно, и в большинстве случаев они требуют нескольких часов или даже дней.

2. Сорбенты на основе производных полиакриламида и полиметакриламида. Сорбент, полученный Блашке и соавт. (см. разд. 7.2.1), широко используется для полупрепаративных и препаративных разделений энантиомеров различных полярных фармацевтических препаратов [8]. Материал достаточно дешев, и его относительно просто получить даже в больших количествах. Однако вследствие трудности точного воспроизведения условий полимеризации возможны нежелательные колебания свойств материала от партии к партии.

Эти сорбенты обычно применяются в виде набухших полимерных частиц размером от 50 до 100 мкм, которые довольно легко сжимаются и поэтому пригодны только для колонок, работающих при низком давлении. После того как удалось закрепить полимер на силикагеле путем ковалентного связывания, хроматографисты получили сорбент, пригодный для аналитической ВЭЖХ. Однако в настоящее время его недостатком является значительное уменьшение емкости, что делает его не вполне пригодным для препаративной работы. Хотя эффективность колонки, упакованной полимерным сорбентом с разме-

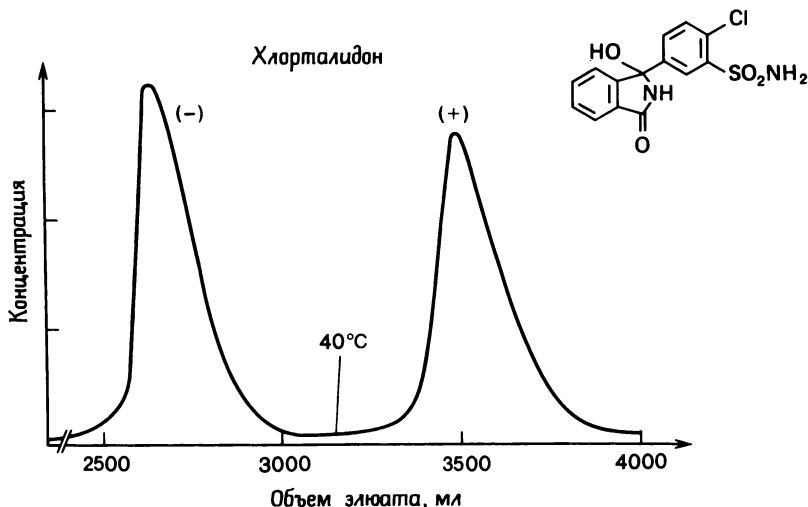


Рис. 9.3. Разделение на энантиомеры 0,53 г рацемического хлорталидона на колонке (32 × 360 мм) с 250 г оптически активного метилового эфира поли(N-акрилоилфенилаланина) (элюент толуол/диоксан, 1:1) [8] (с разрешения Marsel Dekker Inc.).

ром гранул 50—100 мкм, довольно мала, этот ее недостаток часто компенсируется большой селективностью разделения, что позволяет перегружать колонку. Разделительная способность колонки показана на рис. 9.3. В данном случае соотношение сорбат/сорбент составляет 1:470 и второй энантиомер элюируется при повышенной температуре (40°C). Количество введенной пробы и расход элюента (~ 4 л) сравнимы с показанными на рис. 9.2.

3. Сорбенты Пиркла. Используя в качестве хирального лиганда (R)-N-(динитробензоил)фенилглицин, связанный ионной связью с аминопропилсиликагелем (см. разд. 7.2.3), Пиркл и соавт. провели очень эффективное разделение оптических изомеров. Для этого препаративного разделения Пиркл выбрал относительно недорогой, полностью пористый силикагель со средним размером частиц неправильной формы 40 мкм, из которого он получил аминопропилсиликагель [9]. На этой матрице из неполярного растворителя сорбировался хиральный лиганд. Колонки с таким сорбентом обычно показывают значительно более низкую эффективность, чем аналитические колонки, которые упакованы более дорогим сорбентом с частицами размером 5 мкм. Однако общий результат разделения, как сообщили авторы, был отчасти компенсирован несколько более высоким значением α (как результат применения силикагеля другого типа).

Этот сорбент вполне отвечает требуемой механической стабильности и обладает приемлемой емкостью. Он достаточно прочно удерживает хиральный модификатор, пока полярность подвижной фазы не повышается слишком сильно (что вызывает вымывание селектора).

Другой положительной особенностью данной системы является возможность иммобилизации на той же самой основной матрице ряда других N-замещенных аминокислот в качестве хиральных лигандов, что позволяет оптимизировать данную систему. Например, селектор ДНБ-лейцин, как выяснилось, во многих случаях дает лучшие результаты (см. разд. 7.2.3).

Подвижной фазой в таких системах обычно служит смесь гексана и пропанола-2, причем максимальное содержание полярного компонента составляет 20%. Соответственно выделить разделенные энантиомеры можно, выпаривая растворитель из собранных фракций.

В первых сериях опытов по препаративному разделению [10] Пиркл использовал колонку размером 2×30 дюймов (51×760 мм). Загрузка колонки была достаточно высокой, в пределах 1—8 г. Для сорбатов с $\alpha > 1,4$ наблюдалось практически количественное разделение образцов массой в несколько грамм. Был создан также прибор для непрерывного разделения методом ЖХ в режиме повторяющегося ввода пробы, что позволило в некоторых случаях достигнуть производительности разделения 0,9 г/ч. Впоследствии масштабы разделения были увеличены еще больше [11]. Это позволило разделить за один проход 50 г рацемического метилового эфира N-(2-нафтил)аланина на большой препаративной колонке с 13 кг хирального сорбента.

(R)-N-3,5-Динитробензоилглициновая ХНФ и ее (S)-лейциновый аналог (ковалентно-связанные с аминопропилсиликагелем) также были использованы Пирклом для препаративного разделения в режиме простой вытеснительной хроматографии [12]. На основе силикагеля с частицами размером 58 мкм были получены килограммовые количества сорбента. Линейная скорость подачи элюента составляла примерно 50 мм/мин, обеспечивалась она давлением газа. При введении 1 г некоторых рацемических бензодиазепинов и фталидов меньше чем за 20 мин удалось получить фракции оптически чистых энантиомеров массой примерно по 300 мг каждая.

Общая проблема всех препаративных разделений — это невозможность создания очень большой колонки при сохранении ее эффективности. Вследствие этого всегда допускается определенная перегрузка колонки пробой и условия разделения оптимизируются эмпирически.

И хотя требования увеличения емкости и выхода приводят к резкому ухудшению разделения, ситуация часто не настолько плоха, как

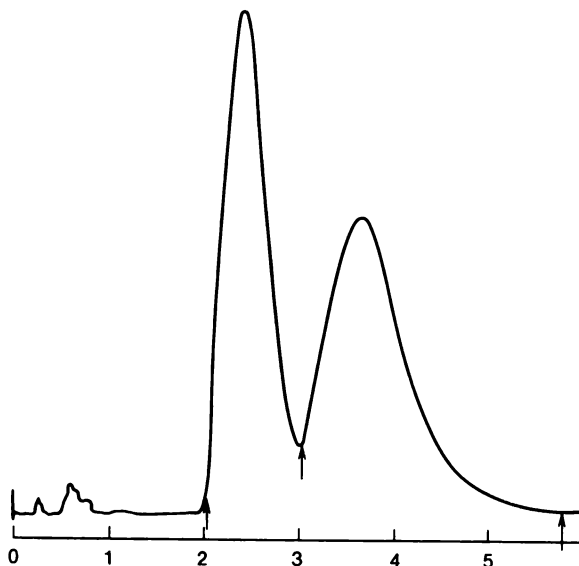


Рис. 9.4. Разделение 1,6 г рацемического 5-(1-нафтил)-5-(4-пентенил)гидантоина на колонке размером 2×30 дюймов [9] (с разрешения Am. Chem. Soc.).

это может показаться. Путем отбора и переработки соответствующих фракций элюата можно достигнуть высокой оптической чистоты при удовлетворительном выходе. Оставшуюся часть элюата можно сконцентрировать и вновь ввести на колонку в следующем цикле.

Из сказанного выше ясно, что хотя в последнее время и был достигнут значительный успех в хиральной препаративной хроматографии, проблем еще много. Если полупрепаративные разделения (скажем, < 0,1 г вещества) осуществляются довольно легко с помощью одного или нескольких из описанных выше методов, то разделение граммовых или килограммовых количеств, требующее больших колонок и автоматизации процессов, еще находится на стадии разработки.

В настоящее время лучшую разделяющую способность в отношении емкости, скорости и эффективности колонки показали сорбенты Пиркла. Другое их преимущество — это возможность использования в сочетании с летучими органическими растворителями, что облегчает выделение разделенных антиподов. Недостаток этого метода — его высокая стоимость, которая связана с большими масштабами производства сорбента, поскольку необходимые хиральный лиганд и связывающий реагент довольно дороги.

Наиболее доступным и дешевым сорбентом является МТАЦ. Нет

сомнения, что гетерогенное ацилирование микрокристаллической целлюлозы можно легко выполнить в крупных масштабах и что этот продукт является относительно дешевым для получения и использования. Ограничением здесь является, вероятно, не стоимость больших колонок, а скорее их низкая эффективность, медленность процесса разделения и часто плохая его воспроизводимость.

Рекомендуемая литература

- Snyder L. R., Kirkland J. J.* Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Ed., Wiley, New York, 1979.
- Reese C. E.* in *Techniques in Liquid Chromatography*, C. F. Simpson (ed.), Wiley, New York, 1982, p. 97.
- Poole C. F., Schuette S. A.* Contemporary Practice of Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- Mannschreck A., Koller H., Wernike R.* Microcrystalline Cellulose Triacetate, a Versatile Stationary Phase for the Separation of Enantiomers, in *Kontakte* (Darmstadt), No 1, 40 (1985).
- Pirkle W. H.* Chromatographic Separation of Enantiomers on Rationally Designed Chiral Stationary Phases, in *Chromatography and Separation Chemistry*, S. Ahuja (ed.), ACS Washington DC, 1986, p. 101.
- Bidlingmeyer B. A.* (ed.) Preparative Liquid Chromatography, Elsevier Amsterdam, 1987.
- Meyer V. W.* Some Aspects of Preparative Separation of Enantiomers on Chiral Stationary Phases, *Chromatographia*, 1987, 24, 639.

Цитируемая литература

1. *Lindner K. P., Manschreck A. J.* *Chromatog.*, **193**, 308 (1980).
2. *Scherubl H., Fritzsche U., Mannschreck A.* *Chem. Ber.*, **117**, 336 (1984).
3. *Mannschreck A., Koller H., Wernicke R.* *Kontakte* (Darmstadt), No. 1, 40 (1985).
4. *Shibata T., Okamoto I., Ishii K. J.* *Liquid Chromatog.*, **9**, 313 (1986).
5. *Rimbock K. H., Cuyegkeng M. A., Mannschreck A.* *Chromatographia* **21**, 223 (1986).
6. *Rimbock K. H., Kastner F., Mannschreck A. J.* *Chromatog.*, **329**, 307 (1985).
7. *Koller N., Rimbock K. H., Mannschreck A. J.* *Chromatog.*, **282**, 69 (1983).
8. *Blashke G. J.* *Liquid Chromatog.*, **9**, 341 (1986).
9. *Pirkle W. H., Finn J. M. J.* *Org. Chem.*, **47**, 4037 (1982).
10. *Pirkle W. H., Finn J. M., Hamper B. C., Schreiner J., Pribish J. R.* in *Asymmetric Reactions and Process in Chemistry*, E. L. Eliel and S. Otsuka (eds.), ACS, Washington DC, 1982, Chap. 18.
11. *Pirkle W. H.* частное сообщение.
12. *Pirkle W. H., Tsiouras A., Sowin T. J. J.* *Chromatog.*, **319**, 392 (1985).

10. БУДУЩЕЕ РАЗВИТИЕ

Совершенно очевидно, что общее быстрое совершенствование хроматографических методик способствует улучшению разделения оптических изомеров. В последующих разделах мы рассмотрим некоторые области, представляющие в связи с этим особый интерес.

10.1. НОВЫЕ СИСТЕМЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

Для многих современных детекторов характерны высокая чувствительность и высокая селективность. Примеры тому термоионизационный детектор (ТИД), специфичный к азоту и фосфору, детектор электронного захвата (ДЭЗ), применяемый в ГХ, или ставшие обычными в ЖХ флуориметрические и электрохимические детекторы. Соединение этих детекторов с хиральными хроматографическими колонками приведет к дальнейшему расширению области применения аналитических разделений оптических изомеров. Одна из очевидных причин этого — уменьшение риска случайного перекрытия пиков в сложных образцах, приводящего к ошибочным результатам при определении энантиомерного состава.

Минимальное количество азота, обнаруживаемое ТИД, составляет порядка 10^{-13} г/с, а это практически означает, что данный метод пригоден для определения азотсодержащих соединений на субпикомольном уровне [1]. Такая техника обнаружения позволяет определять методом хиральной ГХ энантиомерный состав ультрамикроб, что имеет большое значение для многих областей биоанализа. До сих пор, однако, *селективные детекторы* такого типа не получили широкого распространения в хроматографических методах разделения оптических изомеров.

Легкость применения и универсальность метода ГХ-МС также способствуют его сочетанию с хиральными капиллярными колонками. Франк и др. [2] еще в 1978 г. показали, что ввиду термостойкости колонок Chirasil-Val их можно объединять с масс-спектрометрами, и продемонстрировали важность такого сочетания при изучении метаболизма и родственных процессов. Целесообразно более детально рассмотреть некоторые из результатов, полученных этими авторами.

Как уже упоминалось (см. разд. 8.3.2.1), L-дофа в качестве предшественника катехоламинов играет важную роль не только как эндогенное соединение, но и как лекарственное средство против болезни Паркинсона, тогда как ее D-форма не участвует в метаболизме и адсорбируется (организмом) очень слабо. Вследствие этого во многих случаях необходимо контролировать содержание L-дофы во времени. Такой контроль можно осуществлять после дериватизации L-дофы на колонке Chirasil-Val. Рис. 10.1 показывает масс-спектр N,O-ИФП-изопропилового эфира L-дофы после выхода его из колонки, а также типичный (низкий) вынос фазы из этой колонки. Пик с m/z 472 можно использовать для наблюдения за элюатом по одному иону (НОИ). Как иллюстрация достигаемой при этом высокой чувствительности на рис. 10.1, б дана хроматограмма всего 30 пг L-дофы, обнаруживаемой данным методом. Поскольку соотношение сигнал/шум равно примерно 10, то ясно, что этот чувствительный метод пригоден для определения микроколичеств соединения. Введение увеличенной пробы (10 нг) коммерческой L-дофы показало наличие в ней 2,9% примеси D-энантиомера.

В хиральной ЖХ наиболее очевидным энантиоселективным детектором является поляриметр. Но он пригоден только для относительно больших количеств пробы, для аналитических же разделений его чувствительность явно недостаточна, даже при использовании микрокюветы (объем 40 мкл). То же самое относится и к другим хирооптическим детекторам, таким как дихрографы. Резкого улучшения чувствительности этих приборов ожидать трудно, тем не менее при применении лазерной техники недавно были получены очень интересные результаты. На этой основе был сконструирован микрополяриметр, чувствительность которого на два порядка выше, чем у лучших обычных коммерческих приборов [3]. Если такой детектор применяется в сочетании с прибором для ЖХ, то с его помощью можно не только обнаруживать многие оптически активные соединения, присутствующие в пробах биологических объектов, когда они элюируются с обычных обращенно-фазовых колонок [3], но и устанавливать порядок элюирования энантиомеров при разделении очень небольших количеств рацемата на хиральных аналитических колонках. К сожалению, коммерческие приборы такого рода пока еще отсутствуют.

Улучшить разделение оптических изомеров с помощью ЖХ в аналитическом масштабе можно целым рядом способов. Прежде всего можно прибегнуть к ахиральной пред- или послеколоночной дериватизации с целью повышения чувствительности и(или) удерживания. Кроме того, сейчас происходит быстрое развитие микроколоночной хроматографии и новых методов обнаружения.

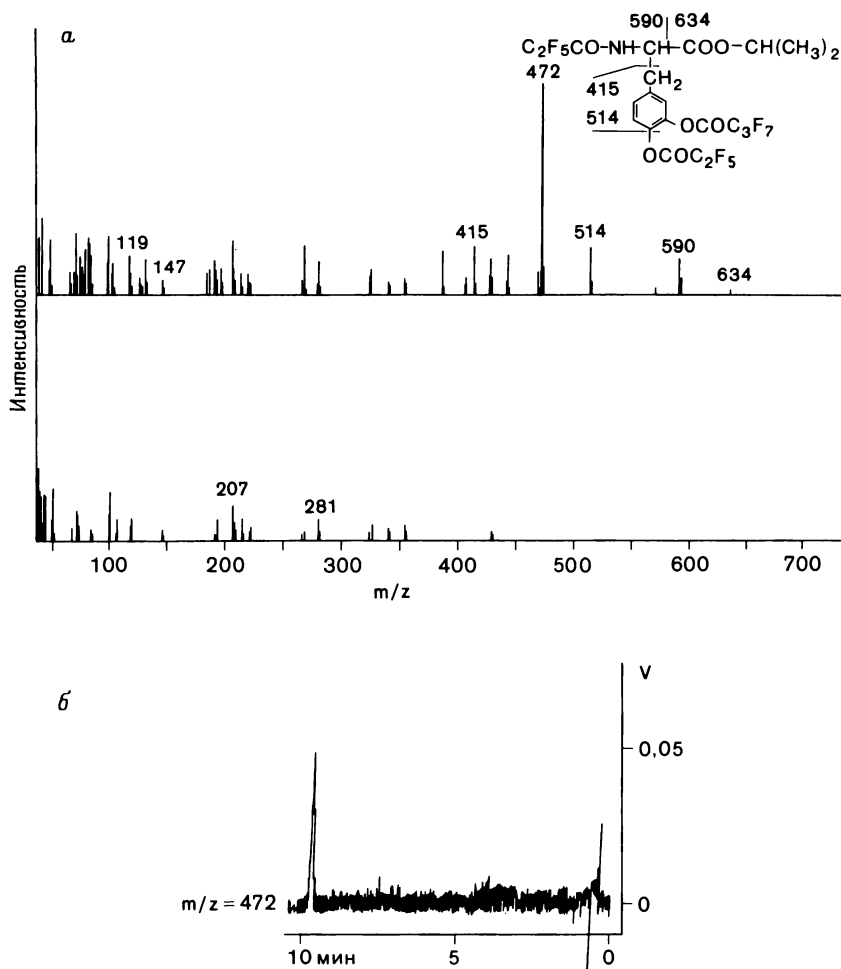


Рис. 10.1. Хиральная ГХ-МС О,N-ПФР-изопропилового эфира L-дофы. *а* — масс-спектр газохроматографического пика, *б* — наблюдение одного пика (при $m/z = 472$) [2] (с разрешения Elsevier Science Publishers B.V.).

Электрохимические детекторы, впервые предложенные Адамом и Киссинджером [4] в начале 70-х годов, превратились сейчас в мощный инструмент биохимических исследований. Успешное применение этих детекторов в обращенно-фазовой ЖХ позволяет предположить, что они являются весьма перспективными при разделении энантиомеров с водными элюентами. Электрохимическое обнаружение при разделении двух оптических изомеров было впервые выполнено Алленмар-

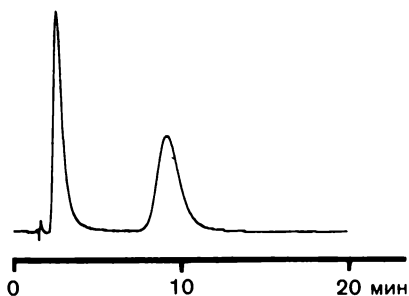


Рис. 10.2. Электрохимическое обнаружение энантиомеров D,L-3-оксикинурина, элюируемых с колонки Resovosil.

ком и др. [6], которые исследовали разделение двух ароматических аминокислот (5-окситриптофана и 3-оксикинурина) на колонке с БСА-агарозой. Рис. 10.2 демонстрирует разделительную способность колонки Resovosil с частицами размером 7 мкм.

Можно также предполагать, что широкое распространение получат люминесцентные детекторы. Этот метод уже используется в хиральной жидкостной хроматографии, при этом амины и аминокислоты предварительно превращаются во флуоресцирующие производные. Так, дансиламинокислоты можно разделить на нескольких типах хиральных колонок для ЖХ [7—9] и обнаруживать затем в микроколичествах различными флуоресцентными методами. Вероятно, потенциально наиболее интересным методом является хемилюминесценция [10], с помощью которой удастся обнаруживать менее одного фемтомоля дансиламинокислоты [11, 12]. В сравнении с обычным фотоизлучением (используемым в обычных флуориметрах) химически индуцированное излучение дает значительно меньший фоновый шум, что существенно улучшает отношение сигнал-шум, но имеет тот недостаток, что требует послеколоночного добавления реагента (обычно пероксида водорода и оксалата) и обеспечения высокоэффективного смешения и быстрого переноса в ячейку детектора. Однако ввиду чрезвычайно высокой селективности и чувствительности этого метода обнаружения в будущем он, вероятно, будет играть важную роль в обнаружении сверхмалых количеств энантиомеров, разделяемых методом ЖХ.

10.2. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КОЛОНОК

Введение в ГХ гибких, покрытых внутри полимером капиллярных колонок из кварцевого стекла сделало этот метод более удобным для

осуществления, не снизив при этом его эффективности. Поверхность таких колонок совершенно инертна вследствие низкого содержания оксидов щелочных металлов. В силу инертности колонки отпадает необходимость в специальном дезактивировании поверхности с целью уменьшения хвостования пиков, но одновременно в ряде случаев по этой же причине могут возникнуть проблемы с закреплением неподвижной фазы. Хотя обработке поверхности капиллярных колонок и нанесению на нее неподвижной фазы посвящено чрезвычайно много работ, существующие в настоящее время методики требуют серьезной доработки. Сегодня большинство наиболее важных неподвижных фаз, используемых в нехиральных стеклянных капиллярных колонках, можно также наносить и на колонки из кварцевого стекла. Очень большую роль в этом плане играют уже имеющиеся и находящиеся еще на стадии доработки способы получения иммобилизованных (связанных или неэкстрагируемых) фаз. В сравнении с пленками, наносимыми обычным образом, такие фазы совершенно не экстрагируются органическими растворителями. Подобная иммобилизация, которая, как правило, осуществляется таким образом, чтобы обеспечить одновременно сшивку и связывание с поверхностью, имеет целый ряд преимуществ: значительно меньшее вымывание неподвижной фазы при повышенных температурах, возможность получения более тонких пленок и возможность промывки колонок растворителями. Соответственно колонки с такими свойствами исключительно важны для сверхкритической флюидной хроматографии.

Из числа доступных в настоящее время хиральных колонок для ГХ колонки Chirasil-Val и Sumipax CC OA (см. Приложение) выпускаются в вариантах, изготавливаемых из кварцевого стекла. Благодаря связи хирального селектора в Chirasil-Val с полисилоксаном с этими колонками можно работать при высоких температурах (вплоть до 200°C).

С развитием методов получения еще более термостойких хиральных капиллярных колонок можно ожидать дальнейшего расширения применения комбинации хиральная ГХ-МС в различных биоаналитических целях.

Большинство работ в области хиральной ЖХ было сконцентрировано на синтезе и изучении новых и улучшенных ХНФ и хиральных добавок в подвижную фазу. Как уже указывалось ранее, в ЖХ в общем намного проще улучшить разделение энантиомеров путем изменения подвижной фазы, тогда как в ГХ хорошее разделение энантиомеров достигается в основном благодаря высокой эффективности колонки, несмотря на сравнительно низкие значения α . Много усилий было направлено на то, чтобы повысить эффективность в обращенно-фазовой ЖХ путем использования полых капиллярных колонок [13].

Успешная эксплуатация таких колонок, однако, связана с использованием инжекторов и детекторов исключительно малого объема (для инжекторов это диапазон в несколько нанометров). Для некоторых хорошо сконструированных систем была достигнута исключительно высокая эффективность [14], но требуемая при этом скорость потока элюента делает этот процесс очень длительным.

Применение микроколоночной ЖХ, по-видимому, приведет к повышению разрешения и улучшению пиковой емкости колонок при разделении энантиомеров. При современном уровне разрешения в ЖХ для полного разделения энантиомеров значение α должно быть не ниже 1,2. Если удастся понизить это значение, скажем до 1,1 или лучше до 1,05, то это будет означать, что число соединений, которые можно разделить (до нулевой линии) на имеющихся ХНФ, значительно возрастет. В сочетании с селективными и чувствительными детекторами (например, основанными на индуцируемой лазерным излучением флуоресценции, хемилюминесценции, электрохимии или масс-спектрометрии) это приведет к значительному расширению аналитических возможностей.

Недавно был проведен ряд интересных работ в этом направлении. В одном из таких исследований микрокапилляр (кварцевое стекло, $0,26 \times 106$ мм или капилляр из нержавеющей стали, покрытый изнутри стеклом $0,30 \times 144$ мм), заполненный неподвижной фазой C_{18} -силикагель с частицами размером 3 мкм, был использован для разделения за один проход рацематов двенадцати дансиламинокислот с хиральным элюентом, содержавшим 12,5 мМ β -ЦД [15]. D-Энантиомеры всех аминокислот элюировались в этом случае раньше L-энантиомеров, и селективность разделения находилась в пределах 1,5—1,12.

Авторами работы [16] выполнено подобное же исследование дансиламинокислот, но с использованием β -ЦД, связанного с матрицей (сферические частицы 5 мкм). Поскольку такие системы позволяют достигнуть большого числа теоретических тарелок, для многих соединений R_s превышал 2,00. Так, дансил-D, L-валин показывает наивысшее значение разрешения $R_s = 2,83$ при величине $\alpha = 1,39$.

При проведении препаративных разделений, как мы видели, необходимы сорбенты с высокими значениями α , что позволяет в определенных пределах перегружать колонку пробой. Значения α , превышающие 10, были недавно обнаружены для некоторых комбинаций сорбент/сорбат/растворитель. Примеры подобных систем приведены в табл. 10.1.

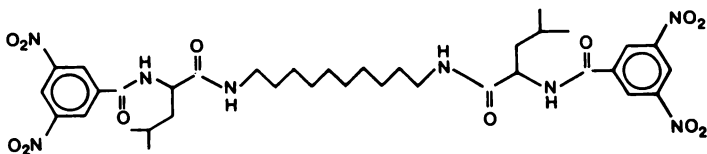
Теоретически удвоение величины $\Delta\Delta G$ означает, что соответствующее значение селективности α увеличится до α^2 (см. разд. 4.1 и 5.3).

Таблица 10.1. Некоторые необычно высокоселективные разделения энантиомеров с помощью хиральной жидкостной хроматографии

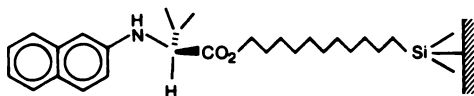
Сорбент	Сорбат	Растворитель	α	Литература
МТАЦ	3-(N'-Метилпиперидин-2'-тион-3'-ил)метилиндо́л	Этанол (96%)	16,7	17
МТАЦ	1-(1-N, N-Диметилкарбомоилэтил)-2-метилиндо́л	Этанол (96%)	12,7	17
БСА-силикагель	Лактам 4-амино-3-(<i>n</i> -хлорфенил)бутановой кислоты	Фосфатный буфер	28	18
БСА-силикагель	D, L-Куниренин (3-(2-Аминобензоил)) аланин	Фосфатный буфер	37	18
БСА-силикагель	N-(<i>n</i> -Нитробензоил)-D, L-аланин	Фосфатный буфер	17	19
(S)-N-(2-Нафтил)-аланин-силикагель	N-(3,5-Динитробензоил)-лейцин-бутиламид	Пропанол-2 (10%) в гексане	15,4	20

Увеличения $\Delta\Delta G$ вдвое можно достигнуть, если сорбат сможет взаимодействовать с двумя (идентичными) связывающими центрами на поверхности сорбента, тогда как первоначально он мог связываться только с одним центром. Если рацемат модифицировать бифункциональным реагентом таким образом, чтобы биопроизводное (реагента) имело две концевые группы, образованные рацематом, то возможны три продукта — (R, R), (R, S) (мезо-форма) и (S, S) в соотношении 1:2:1. Предположим теперь, что (S)-энантиомер удерживается прочнее на данной колонке и что значение селективности разделения энантиомеров равно 10. Если две связывающиеся концевые группы (S, S)-производного смогут взаимодействовать одновременно и независимо с двумя лигандами или двумя идентичными связывающими центрами хирального сорбента, значение α (относительно энантиомера (R, R)-производного) будет равно 100, поскольку $\Delta\Delta G$ удвоится.

Недавно такое высокое значение α для биопроизводного было получено экспериментально [21]. Пиркл и соавт. смогли получить $\alpha = 121$ для энантиомеров биопроизводного (1), образованного в результате реакции сочетания N-(3,5-динитробензоил)-д, N-лейцина с 1,10-динаминодеканом. Сорбентом при этом служила N-(2-нафтил)-аланиновая фаза (2).



1



2

Вполне понятно, что при столь высоких значениях селективности разделить энантиомеры можно очень простым адсорбционным методом. Раствор рацемата достаточно профильтровать через слой хирального сорбента на воронке Бюхнера. После промывки десорбцию сорбата можно провести путем смены элюента. Первая и последняя порции фильтрата должны содержать (R, R)- и (S, S)-энантиомеры с высокой степенью обогащения. Если производное можно затем легко разрушить с выделением исходного соединения, то таким способом можно получить его энантиомеры с высокой степенью оптической чистоты.

10.3. СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В течение некоторого времени в центре внимания хроматографистов находилась сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) ввиду тех преимуществ, которые присущи этому методу [22]. Поскольку свойства жидкости в сверхкритическом состоянии являются промежуточными между свойствами жидкости и газа, она представляет интерес в качестве подвижной фазы в ЖХ, и СФХ часто рассматривают как гибрид ЖХ и ГХ. Вязкость жидкости в сверхкритическом состоянии намного ниже обычной, что делает возможной быструю диффузию сорбатов в подвижной фазе. Это в свою очередь влияет на скорость потока элюента, что может использоваться для достижения заданного разрешения. Другое очевидное преимущество СФХ — быстрое испарение подвижной фазы при атмосферном давлении. Следовательно, основные достоинства СФХ — это возможность проведения быстрых хроматографических разделений без потери разрешения, легкость соединения колонок для СФХ с масс-спектрометром и

детекторами для ГХ и быстрое и легкое выделение вещества из собранных фракций при препаративной работе.

Наиболее изученной подвижной фазой для СФХ является диоксид углерода [22]. Как и в ЖХ, элюирующую способность подвижной фазы можно изменять добавлением модификаторов.

В настоящее время ведется работа над созданием методик СФХ, предназначенных для решения различных задач. Так, недавно было проведено разделение оптических изомеров методом СФХ и ЖХ на одной и той же ХНФ. Как обнаружили Хара и др. [24], энантиомеры некоторых *трет*-бутиловых эфиров N-ацетиламинокислот можно разделить менее чем за 4 мин на ХНФ типа (N-формил-L-валил)аминопропилсиликагеля с диоксидом углерода с небольшими добавками метанола в качестве подвижной фазы.

Сверхкритическая флюидная хроматография на ХНФ типа фазы Пиркла (а также предкритическая жидкостная хроматография) была использована для разделения оптических изомеров некоторых рацемических амидов [25] и фосфинов [26]. Наблюдаемые удерживание, селективность и эффективность были примерно теми же, что и в обычной ЖХ, следовательно, эти методы могут быть взаимозаменяемыми.

Рекомендуемая литература

- Poole C. F., Schuette S. A. *Contemporary Practice of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- Kucera P. (ed.), *Microcolumn High Performance Liquid Chromatography* Elsevier, Amsterdam, 1984.
- Scott R. P. W. (ed.), *Small Bore Liquid Chromatography Columns*, Wiley, New York, 1984.
- Novotny M., Ishii D. (eds.), *Microcolumn Separations*, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- Krull I. S. Recent Advances in New and Potentially Novel Detectors in High Performance Liquid Chromatography and Flow Injection Analysis, in *Chromatography and Separation Chemistry*, S. Ahuja (ed.), ACS, Washington DC, 1986, 137.
- Smith R. D., Wright B. W., Udseth H. R. Capillary Supercritical Fluid Chromatography and Supercritical Fluid Chromatography Mass Spectrometry, in *Chromatography and Separation Chemistry*, S. Ahuja (ed.) ACS, Washington DC, 1986, p. 260.
- Parvez H., Bastart-Malsot M., Parvez S., Nagatsu T., Carpentier G. (ed.), *Electrochemical Detection in Medicine and Chemistry*, Progress in HPLC, Vol. 2, VNU Science Press, Utrecht, 1987.

Цитируемая литература

1. Lubkowitz J. A., Glajch J. L., Semonian B. P., Rogers L. B. J. *Chromatog.*, **133**, 37 (1977).
2. Frank H., Nicholson G. J., Bayer E. J. *Chromatog.*, **146**, 197 (1978).
3. Synovec R. E., Yeung S. E. *Anal. Chem.*, **57**, 2606 (1985).
4. Kissinger P. T., Refshauge G. J., Dreiling R., Adams R. N. *Anal. Lett.*, **6**, 465 (1973).

5. *Kissinger P. T., Bruntlett C. S., Shoup R. S.* Life Sci., **28**, 455 (1981).
6. *Allenmark S., Bomgren B., Boren H.* J. Chromatog., **237**, 473 (1982).
7. *Taphui Y., Miller N., Karger B. J.* Chromatog., **205**, 325 (1981).
8. *Feibush B., Cohen M. J., Karger B. J.* Chromatog., **282**, 3 (1983).
9. *Allenmark S., Andersson S. J.* Chromatog., **351**, 231 (1986).
10. *Imai K., Weinberger R.* Trends Anal. Chem., **4**, 170 (1985).
11. *Mellbin G. J.* Liquid Chromatog., **6**, 1603 (1983).
12. *Mellbin G., Smith B. E. F. J.* Chromatog., **312**, 203 (1984).
13. *Novotny M.* Anal. Chem., **53**, 1294A (1981).
14. *Ishii D., Takeuchi T.* Adv. Chromatog., **21**, 131 (1983).
15. *Takeuchi T., Assai H., Ishii D. J.* Chromatog., **357**, 409 (1986).
16. *Han S. M., Armstrong D. W. J.* Chromatog., **389**, 256 (1987).
17. *Nilsson I., Isaksson R.* Acta Chem. Scan., **B39**, 531 (1985).
18. *Allenmark S., Andersson S.* в печати.
19. *Allenmark S., Bomgren B., Boren H. J.* Chromatog., **316**, 617 (1984).
20. *Pirkle W. H., Pocharsky T. C., Mahler G. S., Corey E. D., Reno D. S., Alessi D. M.* J. Org. Chem., **51**, 4991 (1986).
21. *Pirkle W. H., Pocharsky T. C. J.* Chromatog., **369**, 175 (1986).
22. *Jackson W. P., Richter B. E., Fjeldsted J. C., Kong R. C., Lee M. L.* in Ultrahigh Resolution Chromatography, S. Ahuja (ed.), ACS, Washington DC, 1984, p. 21.
23. *Randall L. G.* in Ultrahigh Resolution Chromatography, S. Ahuja (ed.), ACS, Washington DC, 1984, p. 135.
24. *Hara S., Dobashi A., Kinoshita K., Hondo T., Saito M., Senda M. J.* Chromatog., **371**, 153 (1986).
25. *Macaudiere P., Tambute A., Caude M., Rosset R., Alembik M. A., Wainer I. M. J.* Chromatog., **371**, 177 (1986).
26. *Mourier P., Eliot E., Tambute A., Caude M., Rosset R.* Anal. Chem., **57**, 2819 (1985).

11. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ СИНТЕЗА ХИРАЛЬНЫХ СОРБЕНТОВ

Последняя глава этой книги посвящена описанию методов синтеза наиболее употребимых хиральных неподвижных фаз или сорбентов, а также проблемам, связанным с этими синтезами. Некоторые особенно важные методы синтеза были осуществлены в различных вариантах, и приведенные далее примеры, заимствованные из литературы, относятся к числу наиболее достоверных и подробно описанных.

11.1 МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ХИРАЛЬНЫХ СОРБЕНТОВ МОДИФИКАЦИЕЙ ПОЛИСАХАРИДОВ

Как указывалось в разд. 7.1.1.2, многие природные полисахариды представляют интерес как исходные материалы для синтеза хиральных сорбентов. Лучше всего изучена целлюлоза. Однако при получении ее хроматографических производных очень важно сохранить микрокристалличность целлюлозы. Вследствие этого микрокристаллические производные получают обычно гетерогенными реакциями, т. е. в условиях, исключающих растворение исходного материала.

11.1.1. ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОКРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ТРИАЦЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ

а. Синтез [1, 2]. Микрокристаллическую целлюлозу (200 г), например авицел, суспендируют в бензоле (4 л) и добавляют при перемешивании к суспензии в указанном порядке уксусную кислоту (800 мл), 60%-ную хлорную кислоту (6 мл) и уксусный ангидрид (800 мл). Суспензию выдерживают 3 сут при 35°C, при этом она становится более прозрачной, но одновременно и более темной. Далее суспензию центрифугируют, суспендируют в метаноле и снова центрифугируют. Эту операцию повторяют несколько раз, чтобы удалить исходные реагенты, и полученный светло-коричневый продукт сушат в вакууме при 30°C.

б. Измельчение и рассеивание [3]. Сухой хрупкий материал измельчают в шаровой мельнице или каким-либо другим подходящим спосо-

бом. Рассеивание фракций лучше всего проводить методом воздушно-го сепарирования (установка Zick-Zack Sichter A 100 MZR фирмы Alpine AG, Аугсбург, ФРГ). Фракция 15—25 мм пригодна для использования в колоночной хроматографии низкого и среднего давления.

в. Набухание и приготовление суспензии перед упаковкой колонки [2, 3].

Частицам МТАЦ дают набухнуть и кипятят их в избытке 95%-ного этанола в течение 20—30 мин. После этого охлаждают до комнатной температуры и центрифугируют или фильтруют на стеклянном фильтре. Влажный материал суспендируют в равном количестве этанола и озвучивают ультразвуком 2—3 мин, после чего проводят обезгаживание при пониженном давлении. Приготовленную суспензию используют для набивки колонок. Для расчета: 10 г сухого МТАЦ занимают в результате в колонке объем примерно в 25 мл.

11.1.2. ПОЛУЧЕНИЕ СИЛИКАГЕЛЯ, ПОКРЫТОГО ТРИАЦЕТИЛ-ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ [4, 5]

МТАЦ (~ 1,1 г), полученную, как описано выше, растворяют в хлороформе (16,5 мл) и к раствору добавляют 10 г 3-аминопропилсиликагеля (10 мкм, 500 Å) (например, лихросфера 500-NH₂, Merck). Суспензию перемешивают, после чего растворитель медленно упаривают. Операцию нанесения повторяют еще раз с дополнительной порцией (1,1 г) МТАЦ. Суспензия сухого материала в смеси гликоль/метанол (1:2) пригодна для упаковки в стальные колонки под высоким давлением.

Получение других производных микрокристаллической целлюлозы довольно трудно провести в строго гетерогенных условиях, и как результат кристалличность исходной матрицы всегда снижается. Из числа производных типа сложных эфиров в продаже имеются бензоат и циннамат, нанесенные на силикагель (см. Приложение).

Карбаматы целлюлозы обычно получают реакцией с изоцианатами (схема 11.1) в пиридине в качестве растворителя при повышенной температуре (80—100°C).

11.1.3. ПОЛУЧЕНИЕ СИЛИКАГЕЛЯ, ПОКРЫТОГО ТРИФЕНИЛКАРБАМАТОМ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ [6]

Микрокристаллическую целлюлозу (авицел, Merck) обрабатывают избытком фенилизотиоцианата в пиридине при 100°C. После охлаждения продукт осаждают метанолом, который более чем на 60% состоит из трифенилкарбамата (по данным ИК-спектроскопии и ЯМР).

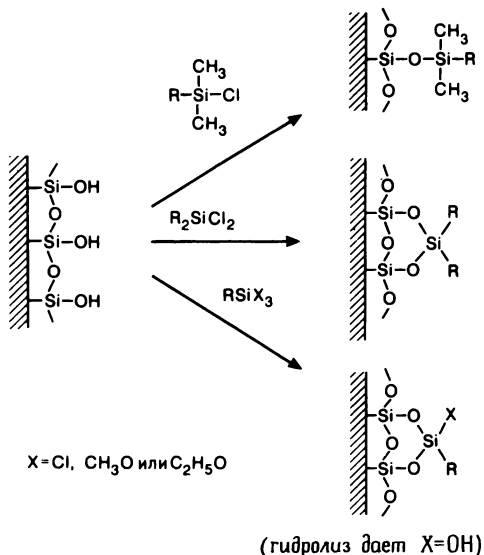


Схема 11.1. Реакции, обычно используемые для модификации силикагеля.

Полученный продукт (0,75 г) растворяют в тетрагидрофуране (10 мл) и добавляют половину этого раствора к 3 г 3-аминопропилсиликагеля (10 мкм, 4000 Å) (лихросфер 4000-NH₂, Merck), после чего медленно испаряют растворитель. Второй порцией раствора проводят повторное покрытие.

11.2. ПОЛИМЕРИЗАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИРАЛЬНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Метод, разработанный Блашке, можно применять для получения различных хиральных полиакриламидов и полиметакриламидов. Синтез одного из наиболее популярных представителей этого класса описан ниже [7, 8].

11.2.1. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИ[ЭТИЛОВОГО ЭФИРА (S)-N- АКРИЛОИЛФЕНИЛАЛАНИНА]

а. Синтез мономера. Суспензию 0,1 моля гидрохлорида этилового эфира аминокислоты, 0,15 моля ангидрида акриловой кислоты и 0,1 г 4-*трет*-бутил-1,2-диоксибензола (ингибитор полимеризации) в 150 мл хлороформа охлаждают при перемешивании до 0—5°C. После чего добавляют насыщенный водный раствор карбоната натрия в таком количестве, чтобы поддерживать рН водной фазы около 8. При

этом рН смесь перемешивают при 10—15°C в течение 1 ч, затем хлороформную фазу отделяют и промывают последовательно холодной 2М серной кислотой и водой далее упаривают до объема примерно 20 мл. Упаренный раствор наносят на короткую колонку (10 × 2 см) с основным оксидом алюминия и элюируют этиловый эфир *N*-акрилоиламинокислоты хлороформом. В процессе элюирования одновременно удаляется ингибитор полимеризации. Собранный хлороформ упаривают при температуре не выше 40°C. Выделенный продукт перекристаллизовывают при низкой температуре, чтобы избежать самопроизвольной полимеризации. Перекристаллизованный (S)-*N*-акрилоилфенилаланинат имеет т.пл. 66°C и $[\alpha]_D^{20} = +121,7$ (с. 3,0, бензол).

Описанный метод применим к синтезу *N*-акрилоильных и *N*-метакрилоильных производных эфиров различных оптически активных аминокислот.

б. Полимеризация. Смесь (S)-*N*-акрилоилфенилаланина этилового эфира (10,0 г, 40,5 ммоль), 1,2-этанジオлдиакрилата (0,69 г, 4,05 ммоль) и азоизобутиронитрила (66 мг, 0,405 ммоль), растворенных в толуоле (17 мл), добавляют при охлаждении к 5%-ному водному раствору поливинилового спирта (197 мл) и перемешивают в инертной атмосфере (металлическая мешалка, около 300 об/мин). Не прекращая перемешивания, температуру постепенно повышают до 80°C и выдерживают смесь при этой температуре 5 ч. После охлаждения органическую фазу удаляют отгонкой, а водную декантируют. Белые частички полимера промывают несколько раз горячей водой, метанолом, толуолом, петролевым эфиром и высушивают под вакуумом. Выход почти 100%.

в. Фракционирование и набухание [2, 3]. Рассеиванием выделяют фракцию 50—100 мкм. Частичкам дают набухнуть при кипячении в используемом растворителе в сосуде с обратным холодильником. После охлаждения растворитель вместе с самыми мелкими частичками декантируют, а остальной полимер суспендируют повторно в том же растворителе и используют для упаковки колонок. Широкое распространение получила также методика полимеризации, разработанная Окамото и Юки, позволяющая синтезировать с применением хиральных катализаторов полимеры, обладающие хиральностью вследствие спирального строения молекулы.

11.2.2. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИ(ТРИФЕНИЛМЕТИЛМЕТАКРИЛАТА) [9—12]

а. Синтез мономера [9]. Раствор тритилхлорида в диэтиловом эфире добавляют к суспензии серебряной соли метакриловой кислоты в том же растворителе и перемешивают несколько часов при комнат-

ной температуре. Выделяющийся хлорид серебра удаляют фильтрованием, а эфир упаривают. Выход образующегося кристаллического тритилакрилата составляет 75%, т. пл. 101—103 °С. Мономер хорошо растворим в бензоле и метаноле.

б. Полимеризация [10—12]. Мономер (20,0 г, 60,7 ммоль) растворяют в сухом толуоле (400 мл) в атмосфере азота и раствор охлаждают до –78 °С. Далее с помощью шприца туда же добавляют раствор (–)-спартеина (0,34 г, 1,46 ммоль) и бутиллития (1,21 ммоль) в толуоле. Через 24 ч эту смесь прикапывают в метанол (4 л) и выпавший в осадок полимер отделяют центрифугированием. Измельченный полимер промывают тетрагидрофураном (700 мл) и после высушивания в вакууме получают 19,4 г (97%) продукта, который затем дополнительно измельчают и фракционируют. Перед упаковкой в колонку полимеру дают набухнуть в соответствующем органическом растворителе.

Важно отметить, что растворимость полимера ограничивает число органических растворителей, которые могут применяться в качестве элюентов. В частности, элюентами не могут быть ароматические углеводороды, хлороформ и тетрагидрофуран. Предпочтительно использование метанола и смесей гексана с пропанолом-2.

11.3. МЕТОДЫ ЗАКРЕПЛЕНИЯ ХИРАЛЬНОГО СЕЛЕКТОРА НА СИЛИКАГЕЛЕВОЙ МАТРИЦЕ

В настоящее время разработан ряд способов модификации силикагеля. Чаще всего для этого используют реакции с алкилтриалкоксиланами с замещенной концевой группой, которая приводит к образованию новых силоксановых связей с выделением спиртов (CH_3OH или $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) в соответствии со схемой 11.1. Получающиеся при этом производные силикагеля имеют стабильную связь Si - C. Ряд наиболее употребимых групп (R_1), которые могут быть привиты подобным образом, показан на схеме 11.2.

Все эти производные легкодоступны, поскольку используемые силаны являются коммерческими продуктами. Синтетический метод был исследован очень подробно, и обычно вносимые в него изменения весьма незначительны. Однако относительная важность некоторых определенных этапов синтеза, таких как предварительная кислотная обработка модифицируемого силикагеля или силанизация в строго безводных условиях, выяснена недостаточно. Так, существует мнение, что обработка силикагеля кипящей соляной кислотой приводит к разрыву силоксановых связей и создает дополнительное количество свободных силанольных групп, участвующих в модификации. Безводные условия считаются необходимыми для образования мономолекулярного слоя модификатора на поверхности силикагеля вместо адсор-

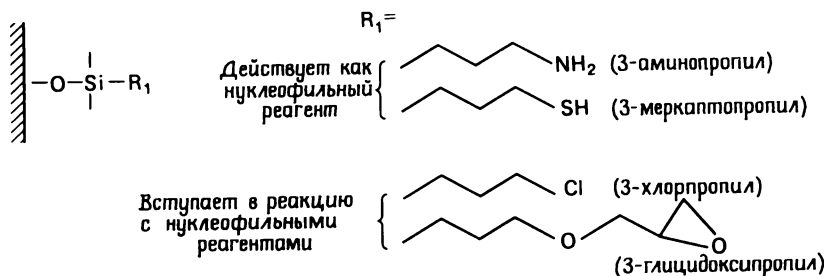


Схема 11.2. Важные концевые реакционноспособные группы, используемые для реакции с лигандами.

бированных полимерных пленок различной толщины. Растворителем в реакции, как правило, служит сухой толуол, скорее всего это обусловлено его способностью давать азеотропную смесь со спиртом и таким образом удалять его из сферы реакции.

Приводимые ниже синтезы иллюстрируют общую методику модификации силикагеля триалкоксисиланами.

11.3.1. ПОЛУЧЕНИЕ 3-ГЛИЦИДОПРОПИЛСИЛИКАГЕЛЯ

а. Предварительная обработка кислотой и высушивание [13]. Силикагель активируют кипячением (с обратным холодильником) в концентрированной соляной кислоте в течение 1 ч. После чего промывают водой до нейтральной реакции промывных вод и выдерживают в вакуумном эксикаторе.

б. Силилирование [14]. К пористому силикагелю (3 г), высушенному в течение примерно 12 ч при 200°C и суспендированному в 100 мл перегнанного над натрием толуола, добавляют 80 мкл триэтиламина и 4 мл 3-глицидоксипропилтриметоксисилана. Смесь кипятят 4 ч в атмосфере азота в колбе, снабженной тефлоновой мешалкой. Продукт отфильтровывают на стеклянном фильтре, промывают толуолом, ацетоном, диэтиловым эфиром (по 100 мл) и высушивают отсасыванием. Степень силинизации можно определить гидролизом эпоксидных групп до диольных обработкой разбавленной серной кислотой (рН 2, 90°C, 1ч) и последующим окислением периодатом. Их количество должно быть в пределах 320 мкмоль/г силикагеля.

11.3.2. ПОЛУЧЕНИЕ БОЛЬШИХ КОЛИЧЕСТВ (R)-N-(3,5-ДИНИТРОБЕНЗОИЛ)ФЕНИЛГЛИЦИНА, КОВАЛЕНТНО-СВЯЗАННОГО С СИЛИКАГЕЛЕМ [15]

а. Синтез 3-аминопропилсиликагеля. Из суспензии 4 кг силикагеля (58 мкм) в 8 л бензола в колбе объемом 22 л азеотропной перегонкой

отгоняют воду (насадка Дина — Старка). Когда отделение воды прекратится, в колбу из капельной воронки в течение 20 мин добавляют 3-аминопропилтриэтоксисилан (400 г) и продолжают азеотропную отгонку с целью удаления выделяющихся этанола и воды. Смесь кипятят с обратным холодильником примерно 12 ч, после чего охлаждают. Надосадочную жидкость отделяют (отсасыванием через стеклянную трубку с фильтром), а оставшийся твердый продукт вновь суспендируют в бензоле и жидкость опять удаляют отсасыванием.

б. Получение ХНФ. Твердый (R)-N-(3,5-динитробензоил)фенилглицин (346 г) и 1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин (ЭЭДХ) (300 г) добавляют к аминопропилсиликагелю (~ 4 кг). После этого добавляют метиленхлорид в количестве, достаточном для образования промешиваемой суспензии (~ 6 л). По мере растворения реагента суспензия постепенно темнеет. После 2-часового перемешивания надосадочную жидкость удаляют отсасыванием и ХНФ промывают шестью порциями метанола по 2 л каждая. Поскольку ЭЭДХ может вызывать частичную рацемизацию селектора, очень важно удалить основание тщательной промывкой и не увеличивать продолжительность реакции.

11.3.3. ПОЛУЧЕНИЕ (S)- α -N-(2-НАФТИЛ)ЛЕЙЦИНА [16]

Смесь L-лейцина (10 г, 76 ммоль), β -нафтола (11 г, 76 ммоль) и безводного сульфита натрия (9,6 г, 76 ммоль) помещают в устойчивый к действию давления сосуд с магнитной мешалкой. Туда же добавляют насыщенный раствор бисульфита натрия (60 мл), сосуд плотно закрывают и медленно при перемешивании нагревают до 115°C. Через 4 сут сосуд охлаждают и выливают содержимое в литровый стакан, после чего сосуд ополаскивают последовательно 5%-ным раствором бикарбоната натрия и ацетоном. Объединенные промывные жидкости и реакционную смесь разбавляют до 500 мл водой и доводят pH до 8,5—9,0 (с помощью карбоната натрия). Смесь экстрагируют дважды метиленхлоридом (порциями по 50 мл), чтобы удалить непрореагировавший β -нафтол. Органический слой промывают дважды порциями по 20 мл 5%-ного раствора бикарбоната натрия и промывные воды объединяют с водным слоем. Далее pH водного слоя доводят до 3—3,5, добавляя 6M соляную кислоту (сопровождается выделением CO₂ и SO₂), и выпадающий при этом белый осадок удаляют фильтрованием. Фильтрат экстрагируют несколько раз этилацетатом и объединенные экстракты упаривают. Остаток добавляют к первой порции продукта, собранной фильтрованием, и все вместе перекристаллизовывают из 95%-ного этанола. Выход замещенного лей-

цина 5,1 г (21,3 ммоль, 25%), т. пл. 125°C, $[\alpha]_D^{20} = -168,7$ (с 1,0; ТГФ).

11.3.4. ГИДРОСИЛИЛИРОВАНИЕ (R)-N-(10-УНДЕЦЕНОИЛ)- α -(6,7-ДИМЕТИЛ-1-НАФТИЛ)ИЗОБУТИЛАМИНА [17]

В 50-мл круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником и магнитной мешалкой, в атмосфере азота вносят 1,97 г (R)-N-(10-ундеценоил)- α -(6,7-диметил-1-нафтил)изобутиламина и 10 мл триэтоксисилана. Смесь нагревают до 40°C, после чего к ней добавляют 0,8 мл раствора хлороплатиновой кислоты (71,5 мг в 20 мл пропанола-2). Смесь нагревают до 90°C и перемешивают в течение 1 ч. Избыток триэтоксисилана отгоняют под вакуумом, а остаток быстро хроматографируют на силикагеле (метиленхлорид/этилацетат 10:1) и выделяют гидросилилированный продукт (1,48 г) в виде белого порошка (т. пл. 52—54°C) с выходом 53%.

11.3.5. ПОЛУЧЕНИЕ СИЛИКАГЕЛЯ С КОВАЛЕНТНО-СВЯЗАННЫМ (S)-1-(α -НАФТИЛ)ЭТИЛАМИНОМ [18]

К суспензии 25 г аминопропилсиликагеля (лихросорб NH₂, 10 мкм, Merck) в 30 мл воды при перемешивании добавляют 2,5 г янтарного ангидрида. Поддерживая путем добавления едкого натра (2М раствор) pH суспензии около 4,0 ее перемешивают при комнатной температуре в течение 5 ч. После этого силикагель отфильтровывают и промывают водой, метанолом и диэтиловым эфиром.

К 2,5 г этого продукта в 30 мл ТГФ при 0°C добавляют 1,1'-карбонилдиимидазол и смесь осторожно перемешивают в течение 3 ч. Затем добавляют (S)-1-(α -нафтил)этиламин (3 г) и продолжают перемешивание еще 5 ч. Силикагель отфильтровывают, промывают тщательно ТГФ, метанолом и диэтиловым эфиром.

Описанным методом хиральный селектор закрепляется на аминопропилсиликагеле посредством амидной связи через промежуточный фрагмент янтарной кислоты. С помощью несколько более усложненного метода [19] в качестве такого фрагмента можно ввести терефталоильную группу, т. е. фрагмент —CH₂CH₂— заменяется на $n = C_6H_4$ —

11.3.6. ПОЛУЧЕНИЕ СВЯЗАННОГО С СИЛИКАГЕЛЕМ ПОЛИАКРИЛАМИДА И ПОЛИМЕТАКРИЛАМИДА [19]

Суспензию диолсиликагеля (лихросорб диол, 5 мкм, 2,50 г) в 20 мл безводного диоксана перемешивают в атмосфере азота при комнат-

ной температуре 30 мин с раствором ангидрида метакриловой кислоты (1,50 г в 10 мл безводного диоксана) и диизопропиламина (0,80 г в 30 мл безводного диоксана). Через 24 ч модифицированный силикагель выделяют фильтрованием на стеклянном фильтре (№ 4), промывают 100 мл диоксана и высушивают под вакуумом. К суспензии 2,5 г этого продукта в 10 мл безводного толуола при перемешивании в атмосфере азота добавляют раствор (S)-N-акрилоилфенилаланина (7,5 г в 10 мл толуола) и азобис (изобутиронитрила) (22 мг в 10 мл толуола). После 15-мин перемешивания при 80°C реакцию обрывают, добавляя 4-трет-бутил-1,2-диоксибензол (200 мг в 10 мл толуола). Силикагелевый сорбент отфильтровывают на стеклянном фильтре и промывают последовательно толуолом, диоксаном, гексаном и изопропанолом. После высушивания под вакуумом элементный анализ показывает следующий состав: С 21,4%, Н 3,1%, N 1,2%.

Тот же метод можно использовать для иммобилизации полимеров на основе производных метакриламида; длительность полимеризации при этом увеличивается до ~ 30 мин.

Такие хиральные сорбенты рекомендуется упаковывать в стальные аналитические колонки в виде суспензии в пропанол-2 при давлении 450—500 атм. В качестве подвижной фазы предпочтительна смесь гексан/диоксан.

Рекомендуемая литература

- Unger K. K. Porous Silica, Amsterdam, 1979.
Hodge P, Sherrington D. C. (eds.) Polymer-supported Reactions in Organic Synthesis, Wiley, New York, 1980.
Souter R. W. Chromatographic Separation of Stereoisomers, CRC Press, Boca Raton, 1985.

Цитируемая литература

1. Hesse G., Hagel R. Liebigs. Ann. Chem., 1976, 996.
2. Hesse G., Hagel R. Chromatographia, 9, 62 (1976).
3. Mannschreck A., Koller H., Wernicke R. Kontakte (Darmstadt), No. 1, 40 (1985).
4. Okamoto Y., Kawashima M., Yamamoto K., Hatada K. Chem. Lett., 1984, 739.
5. Rimbock K. H., Cuyegkeng M. A., Mannschreck A. Chromatographia, 21, 223 (1986).
6. Okamoto Y., Kawashima M., Hatada K. J. Chromatog., 363, 223 (1986).
7. Blaschke G., Schwanghart A. D. Chem. Ber., 109, 1967 (1976).
8. Schwanghart A. D., Backmann W., Blaschke G. Chem. Ber., 110, 778 (1977).
9. Адпова Н. А., Прохорова Л. К. Высокомол. соед., 3, 1509 (1961).
10. Okamoto Y., Suzuki K., Ohta K., Hatada K., Yuki H. J. Am. Chem. Soc., 101, 4769 (1979).
11. Okamoto Y., Suzuki K., Yuki H. J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 18, 3043 (1980).
12. Yuki H., Okamoto Y., Okamoto I. J. Am. Chem. Soc., 102, 6356 (1980).
13. Fritz J. S., King J. N. Anal. Chem., 48, 570 (1976).
14. Glad M., Ohlson S., Hansson L., Mansson M. O., Mosbach K. J. Chromatog., 200, 254 (1980).

15. *Pirkle W. H., House D. W., Finn J. M.* J. Chromatog., **192**, 143 (1980).
16. *Pirkle W. H., Pochapsky T. S.* J. Org. Chem., **51**, 102 (1986).
17. *Pirkle W. H., Huyn M. H.* J. Org. Chem., **49**, 3043 (1984).
18. *Oi N., Nagase M., Doi T.* J. Chromatog., **257**, 111 (1983).
19. *Blaschke G., Broker W., Fraenkel W.* Angew. Chem., **98**, 808 (1986).

ПРИЛОЖЕНИЕ

Основные производители материалов для хиральной газовой и жидкостной хроматографии

Фирма	Материал (тип неподвижной фазы)
Alltech Associates Inc. 2051 Waukegan Road, Deerfield, Ill., 60015, U.S.A.	Колонки RSL-007 для капиллярной ГХ (связанная с полисилоксаном хиральная амидная фаза)
Applied Science Laboratories Inc., P. O. Box 440, State College, Pa. 16801, U.S.A.	Колонки Chirasil-Val для капиллярной ГХ Колонки Resolvosil для ВЭЖХ (бычий сывроточный альбумин)
Astec (Advanced Separation Technologies Inc.), 37 Leslie Court, P. O. Box 297, Whippany, N. J. 07981, U.S.A.	Колонки Cyclobond для ВЭЖХ (β -циклодекстрин)
J. T. Baker Research Products, 222 Red School Lane, Phillipsburg, N. J. 08865, U.S.A.	Колонки Bakerbond для ВЭЖХ (ДНБ-фенилглицин и ДНБ-лейцин)
Daicel Chemical Industries, 8-1, Kasumiga-saki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan	Колонки Chiralcel для ВЭЖХ (ОА: триацетат целлюлозы; UB трибензоат целлюлозы; ОС: трифенилкарбамат целлюлозы; ОЕ: трибензиловый эфир целлюлозы; ОК: трициннамат целлюлозы Колонки Chiralpak для ВЭЖХ [ОТ (+): поли(трифенилметилметакрилат); ОР(+): поли(2-пиридилдифенилметилметакрилат); WN: медный комплекс пролина; WM: медные комплексы аминокислот]
Macherey-Nagel GmbH, P. O. Box 307, D-5160, Düren, FRG	Колонки Resolvosil для ВЭЖХ Колонки Chiral-1 для ВЭЖХ Пластинки для ТСХ [медный комплекс пролина на силикагеле RP] (CEL-AC-40 XF (микрористаллическая триацетилцеллюлоза)

Фирма	Материал (тип неподвижной фазы)
<p>E. Merk Frankfurter Strasse 250, D-6100 Darmstadt, FRG</p> <p>Perstorp Biochem Ideon, S-22370, Lund, Sweden</p> <p>Pharmacia LKB Biotechnology, Box 308, S-1626 Bromma, Sweden</p> <p>Regis Chemical Co., 8260 Austin Avenue, Morton Grove, Ill. 60053, U.S.A.</p> <p>Serva Feinbiochemica, Postfach 105260, D-6900, Heidelberg 1, FRG</p>	<p>Микрокристаллическая триацетилцеллюлоза</p> <p>Колонки Conbrio-Тас для ЖХ с микрокристаллической целлюлозой (включая полупрепаративный вариант)</p> <p>Колонки EnantioPak для ВЭЖХ</p> <p>ДНБ—фенилглицин или ДНБ—лейцин</p> <p>Колонки для ВЭЖХ: Chiral BDex (β-циклодекстрин), Chiral .DNBPG-C (ДНБ—фенилглицин), Chiral DNBL-C, Chiral DNBDL-C [ДНБ—лейцин (D- или L-)], Chiral HyproCu (медный комплекс гидроксипролина); Chiral ProCu (комплекс меди с пролином); Chiral ValCu (комплекс меди с валином)</p>
<p>Sumitomo Chemical Co., Sumitomo BLd., 5-15 Kitahama, Higashi-ku, Osaka 541, Japan</p>	<p>Капиллярные колонки для ГХ Sumipax-CC: OA-200 [N, N'-[2,4-(6-этоксиг-1, 3, 5-триазинедил)]-бис-(L-валил-L-валина изопропиловый эфир)]; OA-300A [N, N'-2,4-(6-этоксиг-1, 3, 5-триазинедил)]-бис-(L-валил-L-валина изопропиловый эфир)]; OA-500 [N-лауроил-L-пролина (S)-1-(1-нафтил)этиламид]; OA-510 [(R, R)-<i>транс</i>-хризантемоил(S)-1-(1-нафтил)этиламид]; OA-520 [O-лауроил-(S)-миндальной кислоты (S)-1-(1-нафтил)этиламид]</p> <p>Хиральные колонки для ВЭЖХ: OA-1000, OA-1100 [N-ацильные производные (S)-(1-нафтил)этиламина], OA-2000 [N-(3,5-динитробензоил)-D-фенилглицина]; OA-2100 [(S)-2(4-хлорфенил)изовалерил-D-фенилглицинамид]; OA-2200 [(R, R)-<i>транс</i>-хризантемоил-D-фенилглицинамид]; OA-3100 (N-3,5-динитрофениламинокарбонил-L-валин); OA-4000, OA-4100 [(S)- и (R)-1-(1-нафтил)этиламинокарбонил-L-валин]; OA-4200, OA-4300 [(S)- и (R)-1-(1-нафтил)этиламинокарбонил-D-фенилглицин]; OA-4400, OA-4500 [(S)- и (R)-1-(1-нафтил)этиламинокарбонил-L-пролин]</p>
<p>Supelco Inc., Supelco Park, Bellefonte, Pa, 16823, U.S.A.</p>	<p>Хиральная фаза для ГХ SP-300 (лауроил-L-валин-<i>трет</i>-бутиламид) (продается также нанесенной на носитель Supelcoport, 100/120 меш)</p> <p>Колонки Sytelcosil LC-(R)-urea для ЖХ (1-фенилэтилмочевина)</p>

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Авицел 109, 245, 246
Адреналин 14, 15
Азиридины 97
Аланин 87
Алкалоиды 109
Алканолы-2 62
Алкены, эпоксидирование 210—212
Алкилминдальные кислоты 39
N-Алкил-L-оксипролины 133
Алкогольдегидрогеназа 216
Аллен 20, 21
(+)-Аллен 40
Аллоизолейцин 87
Алпренолол 207
Альбумин 132
 иммобилизованный 132
 на силикагелевой подложке 133, 138
Алюминия оксид 57
Амиды
 гидролиз 214
 как основа ХНФ 155
 разделение 243
Амилоза 110, 120, 121
Амилопектин 109, 110
3-(2-Аминобензоил)аланин 241
Аминокислотные карты гидролизатов 182
Аминокислотный хиральный анализ 173 и сл., 177, 182, 185
Аминокислоты
 абсолютная конфигурация и вкус 13
 ароматические 160
 N-ацил- 154
 бидентатные 143, 145
 БОК- 64
 N-гептафторбутирильные производные 88
 дансил- 160
 динитробензоильные производные 152
 N-карбоксиангидриды 64
 разделение методом ГХ 67
 — — ЖХ 109
 — — ХЛОХ 160
 тройные комплексы металлов с 142
 циклические 143
Аминоспирты 145, 153, 163, 164
Амины 68
Анальгетики 208
Антибиотики
 полипептидные 182
 транспортные 17
Аргинин 160
Арилакиламины, как основа ХНФ 153
Асимметрические атомы 20
L-Аспарагил-L-фенилаланина метиловый эфир 160
Аспарагин 13
Аспарагиновая кислота 87, 160
Аспартам 160
Атенолол 206
Атропин 139
Атропины 208
Атропоизомеры 21, 110, 111
N-Ацетиламинокислоты 242
N-Ацетил-L-валин-*трет*-бутиламид 155, 161
O-Ацетилмолочной кислоты хлорангидрид 59
Баклофен-лактамы 198
Барбитураты 145, 162, 188
Белки 131
 как основа ХНФ 140
 реакции иммобилизации 137

- Бендрофлуметиазид 193
(-)Бензилметилсульфоксид 27
Бензодиазепиноны 194, 195, 197
N-Бензоилаланин 214
N-Бензоил-D, L-аланин 134
N-Бензоилсерин 134
N-Бензоил-D, L-фенилаланин 134
Бензол 79, 114
Бензотиадиазины 192
Беноксапрофен 209
Бийо метод 40, 41
Бинафтилфосфорная кислота 23, 147
Бинафтол 12
Бинафтолдипентафторпропионат 94
 β -Блокаторы 204, 205
Бопиндолол 206
Бухерера реакция 150
- Валин 87
L-Валин-*трет*-бутиламидная фаза 91
Валиномицин 16, 17
L-Валин-1-фенилэтиламид 92
Ван-Деемтера кривая 52
Вильсона болезнь 200
(R, R)-Винная кислота
 диизопропиламид 153
 монооктиламид 160
D-Винная кислота 153
(+)-Винная кислота 41
 абсолютная конфигурация 41
 рубидиевая соль 40
Вода, содержание в подвижной фазе 165
Время удерживания 47
Высота, эквивалентная теоретической тарелке 47
- Газовая хроматография 38, 46, 50 и сл., 67, 85
Гексагелицен 26, 127
Гексобарбитал 188
Гелицены 23, 26, 76, 124, 127, 147, 148
Гистидин 13, 160
D-Глицериновый альдегид 24
Глутаминовая кислота 87
Глюкан 120
D-Глюкоза 24
Гомоатропин 139
Грамицидин А 16, 17
- Даглиша* модель трехточечного взаимодействия 72, 108, 148
Дансиламиноокислоты 160, 238
Дансил-D, L-валин 240
Двухточечное водородное связывание 154
Декстран 120
Декстрины 111
 Шардингера 77
Дериватизация (модификация) хиральная 38, 59, 67, 68
 принципиальная схема 38
 реагенты для 60—66
Детекторы 52
 люминесцентные 238
 с пламенной ионизацией 54
 селективные 235
 термоионные 235
 УФ 192
 флуоресцентные 58
 флуориметрические 235
 хирооптические 236
 электронного захвата 55, 235
 электрохимические 58, 235, 237
N-Децил-L-гистидин 159
Диаграмма плавления рацемического соединения 37
Диазепам 194
N, N-Диалкиламиноокислоты 160
(+)-2,2'-Диамино-6,6'-диметилдифенил 41
Диастереомерные соединения, разделение 58
Диастереомеры 27
Диизопропиламид винной кислоты 153
 β -Дикетоны, комплексы с 34
2,8-Диметил-1,7-диоксаспиро[5.5]ундекан 27, 179, 182
(S)-N-(3,5-Динитробензоил)лейцин 150
N-(3,5-Динитробензоил)фенилглицин 194
 получение 250
N-(3,5-Динитробензоил)фениллейцин 194
N-Динитрофенил-L-аланин 147
2,4-Динитрофенилметилсульфоксид 148
(+)-2,2'-Диокси-3,3'-диэтоксикарбонилдинафтил 41
(R, R)-ДИПАВК 155
N, N-Дипропилаланин 160
Дисимметричная молекула 27

- Диуретики 191
Дихрографы 236
D-Дофа 209, 236
L-Дофа 14, 15, 209, 236
Дофамин 14, 15
Дофа-декарбоксилаза 14
Дриманоилхлорид 60, 61
- Жидкостная хроматография (ЖХ) 38, 50
55, 68, 107, 109, 111, 120, 137, 153,
157, 177, 199, 208, 210, 214
- Ибупрофен 208—210
Изолейцин 13, 87
Изопреналин 14
(R)-(–)-Изопропилнорадреналин 14
Изотопно-меченные энантиомеры как
внутренние стандарты 175
Изотопное разбавление 35
Имобилизация
альбумина 133
белков 137
Инулин 120, 121
Ионообменная хроматография 56, 57
Ион-парная хроматография 138, 163,
164, 199, 207
Ион-парные модификаторы 138
- Калориметрия 36
дифференциальная сканирующая
36
Камазепам 194
(+)-Камфора 35
(+)-(R)-Камфора 97
(+)-10-Камфорсульфокислота 163, 164
Кана—Ингольда—Прелога номенкла-
тура 24
Карбидофа 203
N-Карбобензоксикарбонилглицил-L-про-
лин 165
N-Карбоксиангидриды аминокислот 68
Карвон 13, 14
2-Карен 187
Катехины 109
Катехоламины 14, 15
Катионообменная хроматография 56
Кетоны, восстановление асимметричес-
кое 216
Кинуренин 132, 136
- Коалесценция пиков 82
Колонки хроматографические 52, 56
высокоэффективные 55
насадочные 53
капиллярные 53, 238
— полые 53
совершенствование 238
эффективность 47, 49
SCOT 53, 54, 99
WCOT 53, 54, 99
- Комплексы
включения 77
координационные 74
металлов, используемые как до-
бавки в ХЛОХ 160
сорбционные гетеролигандные
158, 159
с переносом заряда 76, 148
тройные с иммобилизованным
лигандом 144
- Конфигурация
абсолютная 39—40, 212
— аминокислот 13
— ключевых соединений различ-
ных типов 41
— определение 39
относительная 39
- Коттона* эффект 42—44
- Коэффициент
емкости 48, 166
разделения 49, 50
— влияние температуры на 79
- Краун-эфиры 74, 78, 140, 142
- Крахмал 77, 110
разделение атропиноизомеров на
110
- Круговой дихроизм 40, 41
- Ксилан 120, 121
- Лактоза 107, 108
Ламберта—Бера закон 219
Лантаноиды, парамагнитные комплексы
с 34
Лантионины 183
N-Лауроил-L-валин-*тмет*-бутиламид 89
N-Лауроил-L-пролина-(S)-1-(α -наф-
тилэтиламид) 90
O-Лауроил-(S)-миндальной кислоты
(S)-1-(α -нафтил)этиламид 90

- Лиганды хиральные
 введение в подвижную фазу 156
 иммобилизованные 144, 145
 ковалентно-связанные 140
 нейтральные, введение в подвижную фазу 160
 обмен 75, 141
 образующие КПЗ 147
- Лимонен 13, 14
- Лейцин 13, 87, 99, 178, 195
- Маникон 180
- Маннан 120
- Манишка* метод 219, 220
- Меансерин 198
- Меди(II) комплексы 143, 146
- Мезитилен 79, 114
- О-(—)-Ментилгидроксиламин 63
- (—)-Ментилхлорформиат 61
- Ментол 62, 100
- Метаквалон 197
- Металлов комплексы
 как ХНФ 96
 — добавки в ХЛОХ 160
 хиральные 94, 96
- 4-Метилгексанол-3 180
- 4-Метилгептанол-3 180
- (—)-4-Метилгептанол-3 180
- Метилдофа 203
- Метил-о-карбоксифенилсульфоксид 133
- (S)-О-Метилминдальной кислоты хлорангидрид
- (+)-4-Метил-2-пентиламин 62
- 3-(N'-Метилпиперидин-2'-тион-3'-ил)метилиндола 241
- Метилциклогексилэтилбарбитуровая кислота 114
- 3-Метилциклопентен 96
- Метионин 87
- (—)-1-Метокси-1-метил-1-(1-нафтил)уксусная кислота 64
- (—)-1-Метокси-1-метил-1-(2-нафтил)уксусная кислота 64
- (S)-2-Метокси-2-трифтометилфенацетилхлорид (МТФА-Cl) 60, 61
- Метопролол 204
- Метопрололовая кислота 205
- Мефенитоин 189—191
- Мефобарбитал 188
- Мефрузид 191
- Микрополяриметр 236
- Миндальная кислота 40, 101, 124, 145, 160, 161
- Модель
 комплексов включения 78
 — с переносом заряда 77
 многоточечного взаимодействия 76
 трехточечного взаимодействия 72, 76, 148
 хирального распознавания 72 и сл., 149, 150, 196
- «Молекулярных отпечатков» метод 74, 130
- Моноалкиламиды L-аспарагиновой кислоты 160
- Монооктиламид (R, R)-винной кислоты 160
- Мочевина 77
 ХНФ на основе 155
- Напроксен 209
- (S)- α -N-(2-Нафтил)лейцин 251
- 5-1-(Нафтил)-5-(4-фенетил)гидантоин 233
- 1-(1-Нафтил)этиламин 66
- 1-(1-Нафтил)этилизоцианат 65
- Неподвижные фазы хиральные (ХНФ) 74, 112, 116, 120, 127, 200, 201, 245
 диамидные 160
 для ГХ
 — — на основе комплексов включения 97
 — — — металлов 94—97
 — — привитые полисилоксанового типа 91—94
 — — производные аминокислот и олигопептидов 86—90
 — — типы 99—107
 на основе природных и синтетических полимеров 107
 — — силикагеля 194
 — — целлюлозы 117
 с ацил-L-валином 154
 энантиомерное взаимодействие с 71 и сл.
- Низин 183, 184
- Никель (II)-бис(6-гептафторбутирил)-(R)-пулеогонат 179
- N-(n-Нитробензоил)-D, L-аланин 241
- N-(n-Нитробензоил)серин 214

- 1-(4-Нитрофенил)этиламин 66
(R, S)-Номенклатура 24
Норадреналин 14, 15
Норэфедрин 207
- Оксазепам 194
Оксападол 198
Оксикинуренин 238
 α -Оксикислоты 160
 производные 94
Оксипренолол 164, 207
Окситриптофан 238
(-)-Октанол-3 180
Олигопептидов производные, как ХНФ 86
Оптимизация разделения 136
Оптическая чистота 29, 31, 166
 методы определения 41, 219
 — — хроматографические 39
Оптически активные соединения, методы изучения 29 и сл.
Оптические антиподы, определение 27
Оптическое вращение 30
 дисперсия 40, 41
Орозомукоид 137
- (R)-(-)-[2,2]Парациклофан-4-карбоновая кислота 26, 41
Паркинсона болезнь 14, 236
Пеницилламин 200—202
Пентафторпропионильные (ПФП-) производные 88, 176, 177, 237
Пенфлутизид 193
Переходные металлы 74, 142, 158
Пинан 186, 187
Пиндолол 206, 207
Пинен 97, 187
Пиркла
 модель хирального распознавания 148, 149
 спирт 148
 фаза 30, 189
Подвижная фаза
 влияние на разделение 136
 добавки к
 — — ион-парные 163
 — — нейтральных хиральных лигандов 160
 — — хиральные 160
 и оптимизация разделения 136
- Полиакриламиды 122—124, 145, 230, 247, 252
Поли[(S)-N-акрилоилфенилаланин], метиловый эфир 197
Полиметакриламиды 123, 124, 145, 230, 247, 252
Полиметакрилаты со спиральной конформацией 126
Полипептидные антибиотики 173, 179, 182
Полисахариды 125, 228, 245
Полисилоксановые фазы 91
Полисилоксаны 91, 92
Полистирол 145
(+)-Поли(трифенилметилметакрилат) 12, 126, 128
 получение 248
Поли[этиловый эфир (S)-N-акрилоил-фенилаланина], получение 247
Поляриметрия 29
Прелюга правило 216
Приборы для хроматографии 51 и сл.
Пригожина—Дефоя уравнение 35, 36
Прогестерон 30
Пролин 87, 160
(R, S)-Пронетанол 206
Пропанолол 206, 207
Пропил-N-октиламид 158
Простагландин F_{2 α} 12, 13
Псевдоэфедрин 207
Пуллулан 120
- Разрешение пиков 49
Рацемизация энантиомеров 82, 84
 термическая 83
 энергетический барьер 82, 83
Реакции хиральной модификации *см. также* Дериватизация хиральная в ГХ 60-63
 — ЖХ 64—66
Резерпин 12
Рентгеновская кристаллография аномального рассеяния *см. Бийо* метод
Родия(І) хелат 96
Рубидия D-(+)-тарtrat 23
- Сверхкритическая флюидная хроматография 242
Сдвигающие реагенты хиральные 34
Селективность 49

- влияние температуры 81, 88
 и число теоретических тарелок 51
 Селекторы хиральные 140, 146, 155, 160
 амидо- и мочевиноподобные 156
 π -донорные, метод закрепления
 метод закрепления 249
 образующие водородные связи
 153
 — — — метод закрепления 154
 энантиоселективность 77
 (–)-Серрикорнин 180
 Серин 25
 Силикагель 56, 146
 алкил- 146
 альбумин- 133
 3-аминопропил- 250
 БСА- 206, 241
 глицидопропил- 250
 в ХЛОХ 145
 (S)-N-(2-нафтил)- 241
 покрытый ТАЦ 246
 — трифенилкарбаматом целлю-
 лозы 246
 реакции модификации 247
 Сорбенты
 для ХЛОХ 173
 методы получения 245
 на основе полимеров 123
 Пиркла 231
 полистирольные 129
 Спирокеталь 179
 Стабильность диастереомерных комп-
 лексов 75
 Стереонизомеры 26
 Стереохимические корреляции 44
 Стерическое соответствие 74, 81
транс-Стильбена оксид 116
 Талидомид 15, 17
 Теин 201
 Темазепам 194
 Температура, влияние на
 коэффициент разделения 79
 селективность 81, 88
 Терпены 13, 14, 185, 187
 Тетраацетилглюкозы изотиоцианаты 68
 2,3,4,6-Тетра-О-ацетил- β -D-глюкопирано-
 зилизотиоцианат 64
 Тетрагидрохиназолинозоны 191
 α -(2,4,5,7-Тетранитрофлуоренилиденами-
 нокси)пропионовая кислота 147
 Тиазолидин-2-оны 201
 Тиобензамид 217
 Тирозин 13, 15
 N-(*n*-Тозил)фениланилин 160
 Тонкослойная хроматография 57, 108
Трегера основания 108
 Трехточечное взаимодействие 72, 108
 Триацетиларабиноза 68
 2,3,4-Три-О-ацетил- β -D-арабинофурано-
 зилизотиоцианат 65
 Триптофан 13, 132, 203
 Трисацетилацетонаты алюминия, ко-
 бальта, хрома 128
 [Трис(3-трифторметилоксиметил)-(+)-
 камфорато]-европий(III) 34
 N-Трифторацетил-D, L-аминокислоты
 (N-ТФА-) эфиры 86
 (+)-2,2,2-Трифтор-1-фенилгидразин 63
 R-(–)-2,2,2-Трифтор-1-фенилэтанол 31
 Тройные комплексы 142
 участие растворителя в 144
 N-ТФА-D, L-аланин-*трет*-бутиловый
 эфир 87
 N-ТФА-L-валил-L-валина циклогексило-
 вый эфир 87
 N-ТФА-пропилхлорид 60
 О-ТФА-серин 87
 О-ТФА-тирозин 87
 О-ТФА-треонин 87
 Удельное вращение 30
 Удерживаемый объем 48
 (R)-N-(10-Ундеценоил)- α -(6,7-диметил-1-
 нафтил)изобутиламин 252
 Фенилаланин 68, 87, 160
 метиловый эфир 142
 Фенилалленкарбоновые кислоты 40
 2-Фенилбутанол-2 34
 2-Фенилбутирилхлорид 61
 Фенил- β -D-маннопиранозид 130, 131
 L-Фенилглицин 68
 2-Фенилпропионилхлорид 61
 (+)-1-Фенилэтанол 220
 1-Фенилэтиламин 65

- 1-Фенилэтилизотиоцианат 62, 65
Фенопрофен 208
Ферромоны 27, 179, 180
Флубипрофен 209
(+)-Фронталин 180
Фруктан 120
- Халькогран 179, 181
Хинидин 165
Хинин 165
Хиральная
 дериватизация энантиомеров 38
 хроматография 37
Хиральное распознавание, модели 73
Хиральность 20
 аксиальная 21, 23, 38, 39
 и молекулярная структура 19
 планарная 21, 23, 38, 39
 центральная 21, 39
Хиральные
 молекулярные структуры 20
 неподвижные фазы 53
 сдвигающие реагенты 32, 33
 соединения 25
 противоионы 165
Хитозан 120, 121
Хлорталидон 198
6-Хлортриптофан 13
ХЛОХ 141, 143, 144, 157—159, 202
 типы используемых сорбентов 145
Хризантемовая кислота 90
Хризантемоилминдальной кислоты
 1-(α -нафтил)этиламин 90
Хризантемоилхлорид 60
Хризантемоил-1-(α -нафтил)этиламин 90
Хроматография
 адсорбционная 46, 71, 73
 аппаратурное оснащение 50 и сл.
 аффинная 56, 131
 бумажная 108
 высокоэффективная жидкостная 57
 газовая 38, 46, 50, 53 и сл., 67
 — комплексобразующая 96
 — хиральная 86 и сл., 93, 98, 185
 гель-проникающая 57, 72
 жидкостная 38, 50, 55, 68, 107
 — хиральная 241
 ионообменная 56, 57
 ион-парная 163, 164, 193
 классификация видов 46
 комплексов включения 113
 нормально-фазовая 56, 57
 обращенно-фазовая 56, 57
 сверхкритическая флюидная 242, 243
 тонкослойная 57
 хиральная 38, 39, 46, 86 и сл., 93, 98, 185, 241
 — лигандообменная 114 и сл., 141, 145
Хроматограф, основные узлы 52, 56
- Целлюлоза 108 и сл., 245
 производные 117
 разделение методом ЖХ на 109
 триацетил- 113 и сл., 120
 — микрокристаллическая 79, 113 и сл., 245
 — — механизм удерживания на 116
 — — получение 245
 пересаживаемая 115, 116
 трибензоат-117 и сл.
 трифенилкарбамат 121, 246
 структура 109
Циклодиены 218
Циклодекстрины 77, 79, 111 и сл.
 α -, β -формы 77, 78
 как хиральные добавки к элюенту 161—163
 конформация в водном растворе 112
 структура 112
цис-, *транс*-1,3-Циклооктадиен 120
Циклософороза 120
Цинка(II) комплексы 158, 160
Цинхонидин 165
Цистеин 200
- Число теоретических тарелок 50, 80
- Энантиомерная чистота 35
 определение 27 и сл.

- Энантиомерной метки метод 174 и сл.,
Энантиомеры 27
 взаимопревращение 82
Энантиселективное распознавание, ме-
ханизм 59
Энергетический барьер рацемизации
216
Энтальпийный и энтропийный вклады в
разделение 81
- Эпидермин 182, 183
2-Этил-1,6-диоксаспиро[4.4]нонан 179
L-2-Этил-4-октилдиэтилентриамин 157
Эфедрин 206, 207
Эффективность колонки 49
- ЯМР 27, 29 и сл.
 хиральные сдвигающие реагенты
 в 34

ОГЛАВЛЕНИЕ

От переводчика	5
Предисловие	7
Список символов и сокращений	9
1. Введение	11
Литература	17
2. Развитие современных стереохимических воззрений	19
2.1. Хиральность и молекулярная структура	19
2.1.1. Молекулы с асимметрическим атомом	20
2.1.2. Другие типы молекулярных хиральных структур	20
2.2. Определения и номенклатура	23
Литература	27
3. Методы изучения оптически активных соединений	29
3.1. Определение оптической или энантиомерной чистоты	29
3.1.1. Методы, не требующие разделения энантиомеров	29
3.1.2. Методы, основанные на разделении энантиомеров	37
3.2. Определение абсолютной конфигурации	39
3.2.1. Рентгеновская кристаллография аномального рассеяния	40
3.2.2. Спектроскопические (ДОВ, ЦД) и хроматографические методы, основанные на корреляциях	41
Литература	44
4. Современные хроматографические методы разделения	46
4.1. Обзор основ теории хроматографии	46
4.2. Приборы	50
4.2.1. Приборы для газовой хроматографии	51
4.2.2. Приборы для жидкостной хроматографии	55
4.3. Разделение энантиомеров через образование ковалентных диастереомерных соединений. Обзор	58
4.3.1. Газовая хроматография	67
4.3.2. Жидкостная хроматография	68
Литература	68
5. Теория хирального хроматографического непосредственного разделения оптических изомеров	71
5.1. Необходимые условия энантиоселективного взаимодействия с хиральной неподвижной фазой	71

5.2. Некоторые общие аспекты моделей хирального распознавания и хроматографической энантиоселективности	73
5.2.1. Координационные комплексы с переходными металлами	74
5.2.2. Комплексы с переносом заряда (КПЗ)	76
5.2.3. Комплексы включения	77
5.3. Обсуждение некоторых термодинамических и кинетических аспектов ..	79
5.3.1. Влияние температуры на коэффициент разделения	79
5.3.2. Коалесценция пиков, обусловленная рацемизацией	82
Литература	84
6. Хиральная газовая хроматография	86
6.1. Разработка хиральных неподвижных фаз, образующих водородные связи с сорбатом	86
6.1.1. Производные аминокислот и олигопептидов	89
6.1.2. Привитые фазы полисилоксанового типа	91
6.2. Фазы на основе хиральных комплексов металлов	94
6.3. Фазы на основе комплексов включения	97
6.4. Относительные преимущества различных методов хиральной газовой хроматографии	98
Литература	103
7. Хиральная жидкостная хроматография	106
7.1. Хиральные неподвижные фазы на основе природных и синтетических полимеров	107
7.1.1. Полисахариды и их производные	108
7.1.2. Производные полиакриламида и родственных синтетических полимеров	122
7.1.3. Синтетические полимеры со встроенными хиральными пустотами ..	129
7.1.4. Белки	131
7.2. Ковалентно-связанные хиральные лиганды	140
7.2.1. Краун-эфиры (комплексобразование «гость—хозяин»)	140
7.2.2. Комплексы металлов (обмен хиральных лигандов)	141
7.2.3. Селекторы, работающие по принципу образования комплексов с переносом заряда	146
7.2.4. Хиральные селекторы, работающие по принципу образования водородных связей	153
7.2.5. Другие типы селекторов	155
7.3. Методы, основанные на введении хирального лиганда в подвижную фазу ..	156
7.3.1. Комплексобразование с металлами	157
7.3.2. Добавление нейтральных хиральных лигандов в подвижную фазу ..	160
7.3.3. Ион-парные добавки	163
Литература	166
8. Аналитическое применение в теоретических исследованиях и в промышленных лабораториях	173
8.1. Аминокислоты	173
8.1.1. Метод энантиомерной метки	174

8.1.2. Другие области применения хроматографического аминокислотного анализа	177
8.2. Стереохимические проблемы в химии природных соединений	178
8.2.1. Стереохимия ферромонов	179
8.2.2. Установление структуры полипептидных антибиотиков и родственных соединений	182
8.2.3. Другие области применения	185
8.3. Применение в фармации	187
8.3.1. Нейтральные, слабокислотные или слабоосновные лекарственные средства	188
8.3.2. Протолитические (заряженные) лекарственные средства	199
8.4. Исследование микробиологических и ферментативных реакций	210
8.4.1. Ферментативное и микробиологическое эпексидирование алкенов	210
8.4.2. Энантиоселективный микробиологический гидролиз аминов и эфиров	214
8.4.3. Асимметрическое восстановление кетонов дрожжами	216
8.5. Другие области применения и другие методики	216
8.5.1. Определение энергетического барьера рацемизации	216
8.5.2. Определение абсолютной конфигурации из хроматографических данных	218
8.5.3. Определение оптической чистоты соединений при неполном разделении энантиомеров (метод Маншрека)	219
Литература	221
9. Препаративное разделение энантиомеров—значение, успехи и проблемы	225
Литература	234
10. Будущее развитие	235
10.1. Новые системы обнаружения	235
10.2. Совершенствование колонок	238
10.3. Сверхкритическая флюидная хроматография	242
Литература	243
11. Экспериментальные методы синтеза хиральных сорбентов	245
11.1. Методы получения хиральных сорбентов модификацией полисахаридов	245
11.1.1. Получение микрокристаллической триацетилцеллюлозы	245
11.1.2. Получение силикагеля, покрытого триацетилцеллюлозой [4, 5]	246
11.1.3. Получение силикагеля, покрытого трифенилкарбаматом целлюлозы [6]	246
11.2. Полимеризационные процессы, используемые для получения хиральных синтетических полимерных материалов	247
11.2.1. Получение поли[этилового эфира (S)-N-акрилоилфенилаланина]	247
11.2.2. Получение поли(трифенилметилметакрилата) [9—12]	248
11.3. Методы закрепления хирального селектора на силикагелевой матрице	249
11.3.1. Получение 3-глицидопропилсиликагеля	250
11.3.2. Получение больших количеств (R)-N-(3,5-динитробензоил)фенил-	

глицина, ковалентно-связанного с силикагелем [15]	250
11.3.3. Получение (S)- α -N-(2-нафтил)лейцина [16]	251
11.3.4. Гидросилилирование (R)-N-(10-ундеценоил- α -(6,7-диметил-1-нафтил)изобутиламина [17]	252
11.3.5. Получение силикагеля с ковалентно-связанными (S)-1-(α -нафтил)этиламино [18]	252
11.3.6. Получение связанного с силикагелем полиакриламида и полиметакриламида [19]	252
Литература	253
Приложение	255
Предметный указатель	257

Научное издание
Стиг Алленмарк
**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ
ЭНАНТИОМЕРОВ**

Заведующий редакцией О. А. Реутов
Зам. зав. редакцией Н. А. Козырева
Ст. научный редактор Р. И. Краснова
Мл. научный редактор О. А. Половнева
Художник А. А. Лукьянченко
Художественный редактор М. Н. Кузьмина
Технические редакторы Н. И. Борисова, М. А. Анциферова
Корректор Р. Л. Вибке

ИБ № 7475

Подписано к печати 28.12.90. Формат 60×90¹/₁₆. Бумага офсетная № 1
Гарнитура таймс. Печать офсетная. Объем 8,5 бум. л. Усл. печ. л. 17,0.
Усл. кр.-отт. 17,38. Уч.-изд. л. 17,5. Изд. № 3/7639. Тираж 1700 экз.
Зак. 59. Цена 3 р. 50 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

В/О «Совэкспорткнига» Государственного комитета СССР по печати.
Набрано в Межиздательском фотонаборном центре издательства «Мир».
129820, ГСП, Москва И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Тульская типография Государственного комитета СССР по печати.
300600, Тула, проспект им. В. И. Ленина, 109.

3 р. 50 к.

С. Алленмарк

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ

Цель данной книги — дать читателю по возможности полное представление о хроматографических методах разделения энантиомеров, причем как теоретическое, так и методологическое, включая, например, представление о типах неподвижных фаз и различных областях их приложения. И хотя в последние годы появился ряд обзоров, посвященных этой теме, к моменту написания данной книги ощущалась отчетливая потребность в монографии, которая обобщила бы имеющийся материал. Поскольку никакое достаточно глубокое обсуждение механизма хирального распознавания, лежащего в основе хроматографии энантиомеров, невозможно, если читатель плохо представляет себе основы органической стереохимии, то первые три главы книги мы посвятили именно этой теме. Изложение указанного материала ни в коей мере не является исчерпывающим, и задача состоит лишь в том, чтобы дать читателю необходимый минимум для понимания последующего материала.

Стинг Алленмарк

ISBN 5-03-002027-6 (русск.)

ISBN 0-89573-309-9 (англ.)