

**И. В. Чучелкин,  
И. Д. Фирсин**

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ  
МЕТОДЫ АНАЛИЗА.  
ХИРАЛЬНАЯ  
ХРОМАТОГРАФИЯ**

**Учебное пособие**

**Рязань 2021**

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Рязанский государственный университет имени С. А. Есенина»

И. В. Чучелкин, И. Д. Фирсин

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА.  
ХИРАЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Учебное пособие

Рязань 2021

УДК 543.544(075.8)  
ББК 24.427.1я73  
Ч-96

Печатается по решению редакционно-издательского совета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный университет имени С. А. Есенина» в соответствии с планом изданий на 2021 год.

Рецензенты:

*К. Н. Гаврилов*, д-р хим. наук, проф. кафедры химии  
(Рязанский государственный университет имени С. А. Есенина);  
*Н. Н. Грошкин*, канд. хим. наук (ООО «МЕТКОМ»)

**Чучелкин, Илья Валерьевич.**

Ч-96 Хроматографические методы анализа. Хиральная хроматография : учеб. пособие / И. В. Чучелкин, И. Д. Фирсин. — Рязань : Ряз. гос. ун-т имени С. А. Есенина, 2021. — 84 с.

ISBN 978-5-907266-57-5

Учебное пособие разработано с учетом компетентностного подхода к обучению и требований ФГОС ВО, отражает целевые установки и содержательную основу обязательной части учебного плана, содержит теоретическую информацию об истории развития хиральной хроматографии, основных теориях и моделях хирального распознавания, а также об основных типах хиральных неподвижных фаз, применяемых в жидкостной и газовой хроматографии.

Учебное пособие предназначено для студентов второго курса института естественных наук Рязанского государственного университета имени С. А. Есенина, обучающихся по направлению 04.03.01 «Химия» (профили подготовки «Нефтехимия», «Химия окружающей среды, химическая экспертиза и экологическая безопасность», «Медицинская и фармацевтическая химия»), а также для специалистов-практиков, изучающих хроматографические методы анализа.

УДК 543.544(075.8)  
ББК 24.427.1я73

ISBN 978-5-907266-57-5

© Чучелкин И. В., Фирсин И. Д., 2021  
© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный университет имени С. А. Есенина», 2021

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение .....</b>	<b>5</b>
<b>Глава 1. Непрямые хроматографические методы анализа хиральных соединений. Хиральная дериватизация .....</b>	<b>7</b>
<b>Глава 2. Прямое хроматографическое разделение энантиомеров на хиральных неподвижных фазах .....</b>	<b>10</b>
2.1. Сущность прямого хроматографического разделения энантиомеров на хиральных неподвижных фазах .....	10
2.2. Природа молекулярных взаимодействий между разделяемыми энантиомерами и хиральной неподвижной фазой .....	12
2.2.1. Дисперсионные силы .....	13
2.2.2. Полярные силы .....	14
2.2.3. Ионные силы .....	15
<b>Глава 3. Хиральная газовая хроматография .....</b>	<b>17</b>
3.1. Хиральные неподвижные фазы на основе производных аминокислот .....	19
3.2. Хиральные неподвижные фазы на основе хиральных комплексов металлов .....	21
3.3. Хиральные неподвижные фазы на основе циклодекстринов .....	23
<b>Глава 4. Хиральная высокоэффективная жидкостная хроматография .....</b>	<b>31</b>
4.1. Хиральные неподвижные фазы в высокоэффективной жидкостной хроматографии .....	32
4.1.1. Хиральные неподвижные фазы на основе белков .....	33
4.1.2. Хиральные неподвижные фазы Пиркла .....	36
4.1.3. Хиральные неподвижные фазы на основе полисахаридов .....	39
4.1.4. Хиральные неподвижные фазы на основе макроциклических антибиотиков .....	42
4.1.5. Хиральные неподвижные фазы на основе циклодекстринов .....	49

<b>Глава 5. Работа с высокоэффективным жидкостным хроматографом .....</b>	<b>54</b>
<b>Глава 6. Общие требования к проведению хроматографического анализа .....</b>	<b>58</b>
<b>Глава 7. Лабораторные работы .....</b>	<b>62</b>
Лабораторная работа № 1. Определение состава образца, содержащего диметил (Е)-2-(1,3-дифенилаллил)малонат и (Е)-1,3-дифенилаллил ацетат .....	62
Лабораторная работа № 2. Определение состава образца, содержащего (Е)-1-(1,3-дифенилаллил)пирролидина .....	64
Лабораторная работа № 3. Определение состава образца, содержащего этил 1-циннамил-2-оксоциклогексан-1-карбоксилат .....	67
Лабораторная работа № 4. Определение состава образца, содержащего этил (Е)-2-ацетамидо-2-ацетил-5-фенилпент-4-еноат .....	70
Лабораторная работа № 5. Определение состава образца, содержащего этил 1-циннамил-2-оксоциклопентан-1-карбоксилат .....	72
<b>Заключение .....</b>	<b>75</b>
<b>Список международных сокращений, принятых в хроматографии .....</b>	<b>76</b>
<b>Список рекомендуемых источников .....</b>	<b>80</b>
<b>Список использованных источников .....</b>	<b>81</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие для студентов направления подготовки 04.03.01 «Химия» (профили подготовки «Нефтехимия», «Химия окружающей среды, химическая экспертиза и экологическая безопасность», «Медицинская и фармацевтическая химия») предполагает получение новых знаний в области хиральной хроматографии в рамках изучения дисциплины «Аналитическая химия». В ходе освоения дисциплины «Аналитическая химия» студент формирует, совершенствует и закрепляет соответствующие компетенции:

– ОПК-1.1 (систематизирует и анализирует результаты химических экспериментов, наблюдений, измерений, а также результаты расчетов свойств веществ и материалов);

– ОПК-1.2 (предлагает интерпретацию результатов собственных экспериментов и расчетно-теоретических работ с использованием теоретических основ традиционных и новых разделов химии);

– ОПК-1.3 (формулирует заключения и выводы по результатам анализа литературных данных, собственных экспериментальных и расчетно-теоретических работ химической направленности);

– ОПК-2.1 (работает с химическими веществами с соблюдением норм техники безопасности);

– ОПК-2.3 (проводит стандартные операции для определения химического и фазового состава веществ и материалов на их основе);

– ОПК-2.4 (проводит исследования свойств веществ и материалов с использованием серийного научного оборудования);

– ПК-2.1 (выполняет требуемые операции при определении физико-химических характеристик исследуемых объектов);

– ПК-2.2 (контролирует в процессе соответствия промежуточной продукции и готовой продукции заданным требованиям).

Целью нашего учебного пособия является формирование у студентов знаний об основных типах хиральных неподвижных фаз, применяемых в газовой и жидкостной хроматографии, и способах их использования в анализе хиральных соединений.

Значение стереохимии соединений хорошо известно в науке со времен Луи Пастера, который открыл явление хиральности в 1848 году. Энантиомеры хиральных соединений часто отличаются по своим биологическим, фармакологическим, токсикологическим свойствам: один энантиомер является эффективным лекарственным средством, тогда как другой может быть неактивным или даже токсичным. Это различие в биологической активности имеет большое значение в фармацевтической науке, что отражено в требованиях регулирующих органов во всем мире. Например, для фармацевтических препаратов требуется наличие лишь одного из двух энантиомеров в составе препарата, если они различаются по фармакологическому действию, токсикологическим свойствам и т. д.

В настоящее время огромен спрос на аналитические методы, способные определять энантиомерный состав соединений. Хроматографические методы доминируют в этой области. Тем не менее в аналитической хроматографии разделение оптических изомеров остается одной из наиболее сложных задач. Причиной возникающих сложностей является то, что физические и химические свойства энантиомеров не различаются, за исключением направления вращения плоскости поляризованного света. Дополнительные сложности вносит многообразие геометрических изомеров из-за наличия в молекулах или их агрегатах нескольких источников хиральности. Таковыми могут выступать центр хиральности, ось и плоскость хиральности или даже спираль. Именно поэтому задача создания новых неподвижных хроматографических фаз и систем для разделения энантиомеров является исключительно актуальной.

## Глава 1

### НЕПРЯМЫЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ХИРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ. ХИРАЛЬНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ

Долгое время для анализа энантиомерного состава в газовой хроматографии (ГХ) и жидкостной хроматографии (ЖХ) применялись только ахиральные фазы, то есть их основу составляли оптически неактивные соединения. Следовательно, непосредственное разделение энантиомеров хроматографическими методами не представлялось возможным. Именно поэтому хроматографические разделения, ставившие своей целью определение энантиомерного состава, были ограничены разделением диастереомерных производных — дериватов, полученных взаимодействием с оптически чистым реагентом. Этот метод хиральной дериватизации позволяет разделять энантиомеры в виде их диастереомерных производных, которые, в свою очередь, можно разделить на ахиральных неподвижных фазах, так как диастереомеры не являются зеркальными антиподами и обладают различными химическими и физическими свойствами<sup>1</sup>.

При очевидной простоте метод хиральной дериватизации имеет ряд недостатков, которые порой значительно осложняют процесс и приводят к получению ошибочных результатов. Во-первых, хиральный дериватирующий реагент должен на 100 % состоять из одного энантиомера, и только в этом случае можно получить достоверные результаты аналитического разделения.

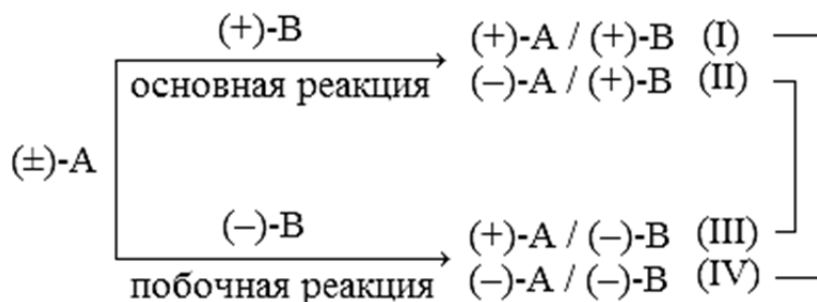


Рис. 1. Пример использования хирального дериватирующего реагента с оптической чистотой менее 100 %

Для разделения энантиомеров соединения А (рис. 1) в виде диастереомерных дериватов (I и II), полученных взаимодействием с хиральным дериватирующим реагентом (+)-В, загрязнение последнего его энан-

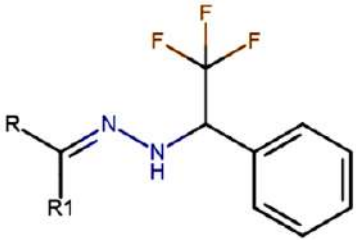
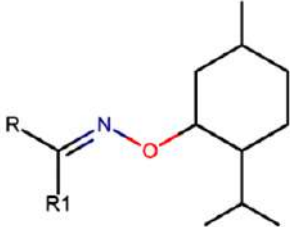
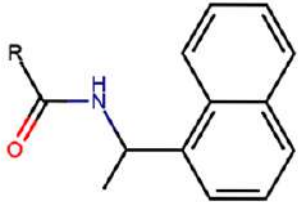
<sup>1</sup> См.: Gerhard K. E. Scriba. Chiral Separations: Methods and Protocols. New Jersey : Humana Press, 2013. P. 526.



тиомерным антиподом (-)-В недопустимо, поскольку это определенно внесет ошибку в результат анализа. Продукты, получаемые в результате реакции ( $\pm$ )-А с (-)-В, будут образовывать энантиомерные пары с основными продуктами, таким образом внося добавочный вклад в хроматографические пики основных продуктов. Например, при содержании в анализируемой смеси (+)-А — 99,5 % и при содержании в дериватизирующем реагенте (+)-В — 98,5 % ошибка определения оптической чистоты образца составит 3 % (результат анализа — 96 %, реальное значение — 99 %). Во-вторых, анализ этим методом основан на допущении, что дериватизация происходит количественно, что в противном случае также внесет ошибку в результат анализа. Также при работе с методом хиральной дериватизации необходимо удостовериться, что таких процессов, как рацемизация и эпимеризация, нет.

Таблица 1

<i>Модифицируемая группа / тип анализируемых соединений</i>	<i>Хиральный модифицирующий реагент</i>	<i>Структура производного</i>
амины, аминокислоты	хризантемоил-хлорид	
амины, аминокислоты	ментилхлор-формиат	
спирты, оксикислоты	2-фенил-пропионилхлорид	
аминокислоты, $\alpha$ -оксикислоты, другие кислоты	(-)-ментол	

кетоны	(+)-2,2,2-трифтор-1-фенилгидразин	
углеводы	O-(-)-ментил-гидроксиламин	
карбоновые кислоты	1-(1-нафтил)этил-амин	

### Вопросы и задания

1. Опишите сущность непрямых методов анализа хиральных соединений.
2. Что такое хиральная дериватизация? Что представляет собой хиральный дериват? Как хиральная дериватизация применяется в энантиомерном анализе?
3. Опишите основные недостатки непрямых методов разделения энантиомеров.
4. Чем грозит наличие примесей в хиральном дериватизирующем реагенте? Схематически изобразите возможные реакции.
5. Что такое рацемизация? Как этот процесс может повлиять на определение энантиомерного состава?
6. Что такое эпимеризация? Как этот процесс может повлиять на определение энантиомерного состава?

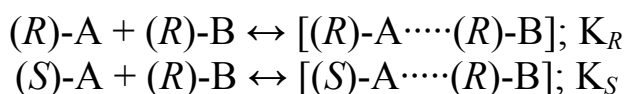
## Глава 2

### ПРЯМОЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ НА ХИРАЛЬНЫХ НЕПОДВИЖНЫХ ФАЗАХ

Разделение энантиомеров в виде их диастереомерных производных связано с рядом значительных неудобств (поиск хирального дериватизирующего реагента, сложность процесса дериватизации, побочные процессы рацемизации и эпимеризации), которые, в свою очередь, препятствовали распространению этого метода. Прямое разделение, то есть разделение, основанное на непосредственном взаимодействии энантиомеров с хиральной неподвижной фазой, значительно проще и поэтому представляет большой интерес как аналитический метод. Он позволяет проводить разделение энантиомеров без какой-либо их предварительной модификации. Основной проблемой этого способа разделения является поиск эффективных хиральных неподвижных фаз. Данный вопрос представлен в значительном количестве научных публикаций, работы активно ведутся и в настоящее время <sup>2</sup>.

#### 2.1. Сущность прямого хроматографического разделения энантиомеров на хиральных неподвижных фазах

Любой хроматографический процесс представляют в виде серии равновесных процессов, а константу равновесия, описывающую распределение соединения между подвижной (ПФ) и неподвижной (НФ) фазами, связывают с хроматографическим фактором удерживания (коэффициентом емкости). Любое хроматографическое разделение обусловлено различным удерживанием сорбатов каким-либо типом неподвижной фазы, то есть различными факторами удерживания и, соответственно, константами распределения. Константа распределения, в свою очередь, зависит от степени взаимодействия соединения с ПФ и НФ. В хиральной хроматографии в общем случае таким взаимодействием можно считать обратимое образование диастереомеров между энантиомерами анализируемого соединения и хиральным селектором, то есть хиральной неподвижной фазой. Именно различие в константах равновесия ( $K_R \neq K_S$ ) этих процессов является физико-химической основой разделения энантиомеров на хиральной неподвижной фазе:



---

<sup>2</sup> См.: Gerhard K. E. Scriba. Chiral Separations: Methods and Protocols.

Важным фактором в энантиоселективном удерживании являются пространственные и стерические особенности обратимого образования диастереомеров. Еще в 1933 году L.H. Easson и E. Stedman<sup>3</sup>, исследовав физиологическую активность препаратов, имеющих хиральный атом углерода, выдвинули теорию «трех точек», согласно которой три группы, окружающие хиральный атом углерода, могут быть вовлечены в процесс взаимодействия с «приемным устройством» в тканях — рецептором. Один энантиомер имеет оптимальную «посадку», формируя три взаимодействия с селектором, в то время как другой энантиомер связывается менее прочно из-за того, что имеет только два взаимодействия. Эту идею положил в основу энантиоселективного удерживания в хиральной хроматографии и С. Е. Dalgliesh в 1952 году<sup>4</sup>. Согласно ей (теория «трехточечного взаимодействия»), для хирального распознавания необходимы три одновременно проявляющихся взаимодействия между одним из энантиомеров и хиральной неподвижной фазой. В то же время второй энантиомер будет иметь меньше связей с НФ (рис. 2), тем самым обеспечивается худшее его удерживание, в результате чего и происходит разделение энантиомеров. Позднее было показано, что энантиоселективное разделение может осуществляться и в системах, где проявляется всего два или даже одно взаимодействие, но в любом случае должна быть разница во взаимодействиях одного и другого энантиомера с хиральной неподвижной фазой.

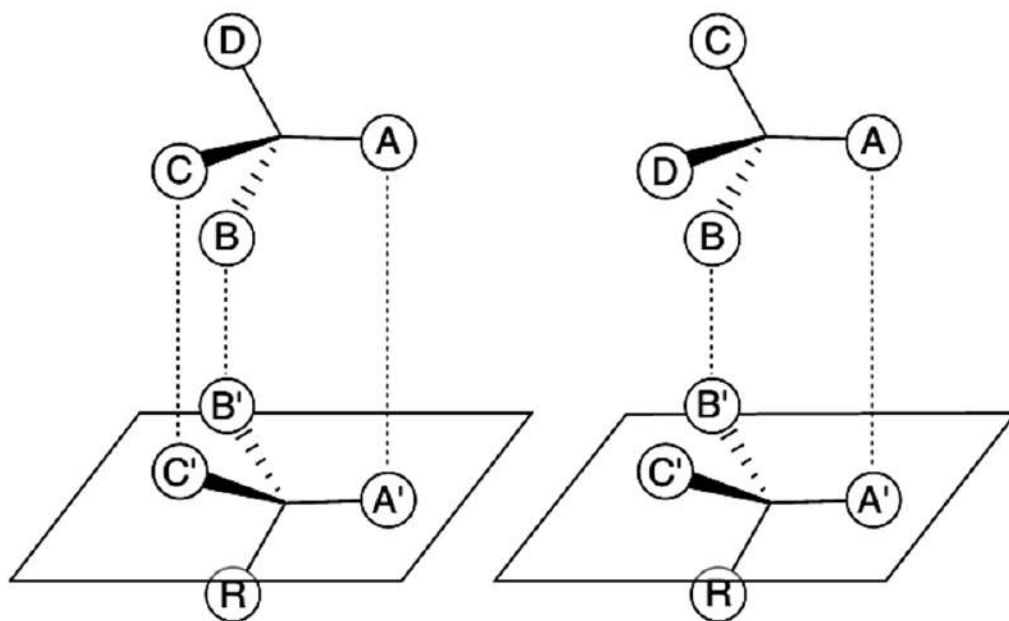


Рис. 2. Схематическая демонстрация теории трехточечного взаимодействия

<sup>3</sup> См.: Easson L. H., Stedman E. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: molecular dissymmetry and physiological activity // Biochemical Journal. 1933. Vol. 27. Pp. 1257–1266.

<sup>4</sup> См.: Dalgliesh C. E. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms // Journal of the Chemical Society. 1952. Pp. 3490–3942.

## 2.2. Природа молекулярных взаимодействий между разделяемыми энантиомерами и хиральной неподвижной фазой

Необходимо понимать механизмы удерживания энантиомеров и связь между этими механизмами и константой распределения, чтобы узнать, как достичь селективности, необходимой для разрешения пары энантиомеров. Константа распределения зависит от относительного сродства анализируемого вещества к подвижной и неподвижной фазам. Неподвижная фаза должна сильно взаимодействовать с анализируемым веществом для того, чтобы разделение было возможно, то есть межмолекулярные силы между НФ и удерживаемым соединением должны быть относительно большими. Напротив, взаимодействия между анализируемым соединением и ПФ должны быть относительно слабы, чтобы позволить НФ удерживать сорбат. В газовой хроматографии вероятность взаимодействия (столкновения) между молекулами сорбата и подвижной фазы мала по сравнению с жидкостной хроматографией, поэтому состав подвижной фазы в жидкостной хроматографии играет одну из решающих ролей. Подвижная фаза должна быть выбрана так, чтобы взаимодействия, которые проявляются между ней и сорбируемым веществом, были более слабыми, чем те, которые проявляются между сорбатом и неподвижной фазой. Существует три основных типа межмолекулярных сил: дисперсионные, полярные и ионные силы. Все взаимодействия между молекулами являются результирующими этих трех различных типов молекулярных взаимодействий (рис. 3).

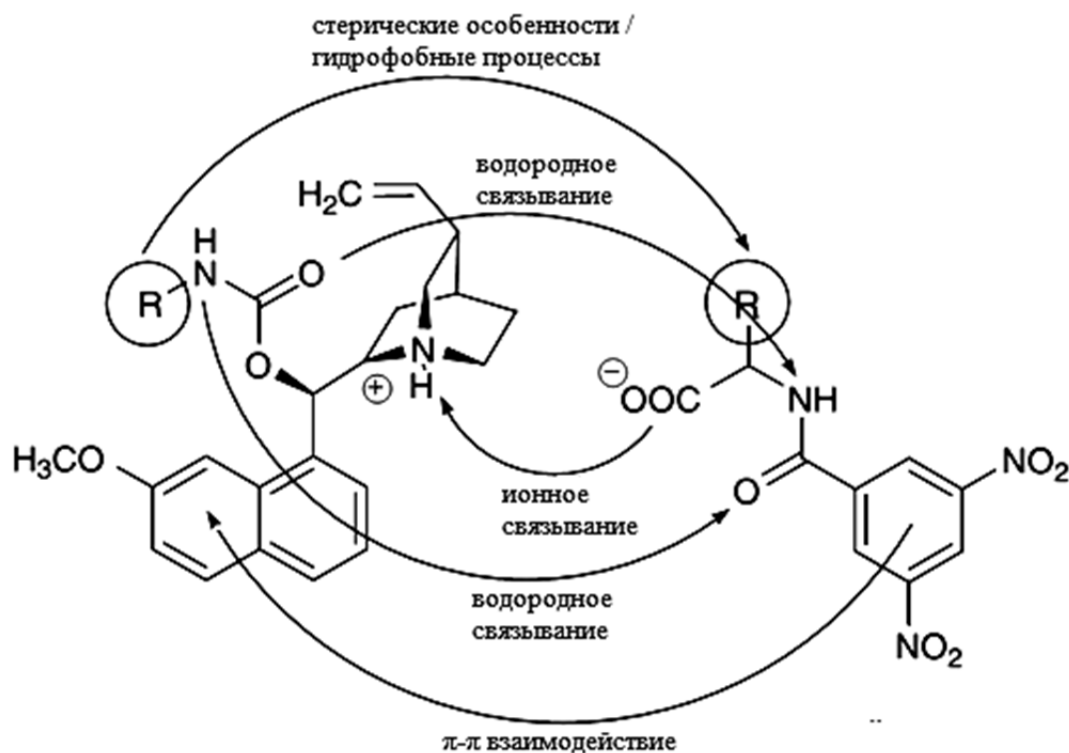


Рис. 3. Примеры межмолекулярных взаимодействий

### 2.2.1. Дисперсионные силы

Дисперсионные силы возникают из-за колебаний заряда по всей молекуле в результате колебаний электронов и ядер, представляют собой статистический эффект и их сложно оценить. В начале XX века Glasstone<sup>5</sup> дал подробное описание дисперсионных сил и предположил, что их физическое значение не может быть четко определено, но, вероятно, мгновенное изображение молекулы будет показывать различные расположения ядер и электронов, имеющих дипольные моменты. Эти быстро меняющиеся диполи при усреднении по большому количеству конфигураций дают результат, равный нулю. Однако в любой момент они могут создать электрические взаимодействия с другой молекулой, что приведет к некоторому связыванию этих молекул. Те из них, которые проявляют только дисперсионные взаимодействия, чаще всего неполярны (нет точек, где так или иначе сконцентрирован тот или иной по знаку заряд) поэтому они, как правило, проявляют гидрофобные свойства.

В первом приближении энергия взаимодействия ( $U_D$ ), связанная с дисперсионными силами, рассчитывается следующим образом:

$$U_D = \frac{3h\nu_0\alpha^2}{4r^6},$$

где  $\alpha$  — поляризуемость молекулы,  $\nu$  — характерная частота молекулы,  $h$  — постоянная Планка,  $r$  — расстояние между молекулами. Доминирующим и контролирующим дисперсионную силу фактором является поляризуемость  $\alpha$  молекулы, которая для веществ, не имеющих диполей, определяется так:

$$\frac{D-1}{D+2} = \frac{4}{3}\pi n\alpha,$$

где  $D$  — диэлектрическая проницаемость материала,  $n$  — число молекул на единицу объема. Если  $\rho$  — плотность среды, а  $M$  — молекулярная масса, то число молекул в единице объема  $n = N\rho / M$ , где  $N$  — число Авогадро, таким образом,

$$\frac{4}{3}\pi N\alpha = \frac{(D-1)M}{(D+2)\rho} = P,$$

где  $P$  — молярная поляризуемость. Молярная поляризуемость пропорциональна  $M/\rho$  — молярному объему; как следствие, дисперсионные силы («гидрофобные») будут связаны с молярным объемом взаимодействующих

---

<sup>5</sup> См.: Chen L., Reiss P. S., Chong S. Y., Holden D., Jelfs K. E., Hasell T., Little M. A., Kewley A., Briggs M. E., Stephenson A., Thomas M. K., Armstrong J. A., Bell J., Busto J., Noel R., Liu J., Strachan D. M., Thallapally P. K., Cooper A. I. Separation of rare gases and chiral molecules by selective binding in porous organic cages // Nature Materials. 2014. Vol. 13. Pp. 954–960.

щих веществ. Схематическое представление дисперсионных взаимодействий показано на рисунке 4.

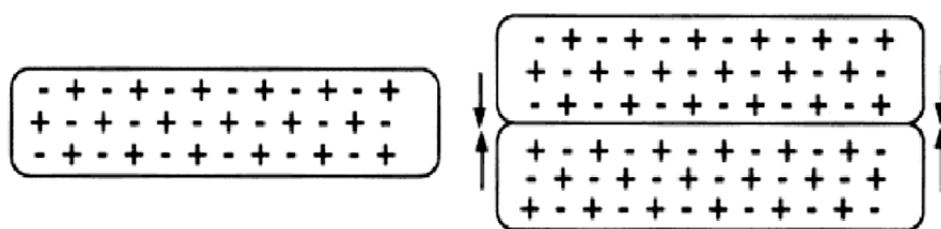


Рис. 4. Схематическое изображение дисперсионных взаимодействий.  
Слева: флуктуации заряда — источник дисперсионных сил и дисперсионного взаимодействия; справа: две молекулы взаимодействуют и удерживаются вместе в результате дисперсионных сил

Дисперсионные взаимодействия происходят там, где на молекуле нет локализованного заряда, а только множество флуктуирующих, тесно связанных зарядов, которые в любой момент могут взаимодействовать с мгновенными противоположного типа, расположенными на соседней молекуле. Дисперсионные взаимодействия играют большую роль во взаимодействиях разделяемых энантиомеров с неподвижной фазой.

### 2.2.2. Полярные силы

Полярные взаимодействия возникают из-за электрических сил между локализованными зарядами, находящимися в разных частях молекул, которые являются результатом постоянных или индуцированных диполей. Полярные взаимодействия не могут происходить изолированно и должны всегда сопровождаться статистически сгенерированными дисперсионными взаимодействиями. Полярные взаимодействия могут сильно различаться по силе, которая зависит от величины зарядов на каждом диполе. Взаимодействие может быть очень сильным и приводить к молекулярным ассоциациям, приближающимся по энергии к слабой химической связи. Примером такого случая является водородная связь. И наоборот, могут возникать очень слабые полярные взаимодействия, например, между индуцированными диполями.

*Диполь-дипольные взаимодействия (рис. 5).*

Энергия взаимодействия ( $U_P$ ) между двумя дипольными молекулами в первом приближении определяется как:

$$U_P = \frac{2\alpha\mu^2}{r^6},$$

где  $\alpha$  — поляризуемость молекулы,  $\mu$  — дипольный момент молекулы,  $r$  — расстояние между молекулами. Уравнение показывает, что энергия зависит от квадрата дипольного момента. К сожалению, численное значение дипольного момента, рассчитанное из измерений диэлектрической проница-

емости в диапазоне температур, не всегда дает представление о силе полярных взаимодействий, которые он может иметь с другими молекулами. Необычно, что низкие значения дипольных моментов сильно полярных веществ могут быть результатом взаимодействия двух диполей из-за молекулярной ассоциации. Например, молекулы воды ассоциируются между собой за счет сильного полярного взаимодействия — водородной связи, которая уменьшает дипольный характер связанных молекул при измерении, сделанном на веществе. Примерами некоторых веществ, которые имеют постоянные диполи и проявляют полярное взаимодействие с другими молекулами, являются спирты, сложные эфиры, простые эфиры, амины, амиды, нитрилы и др.

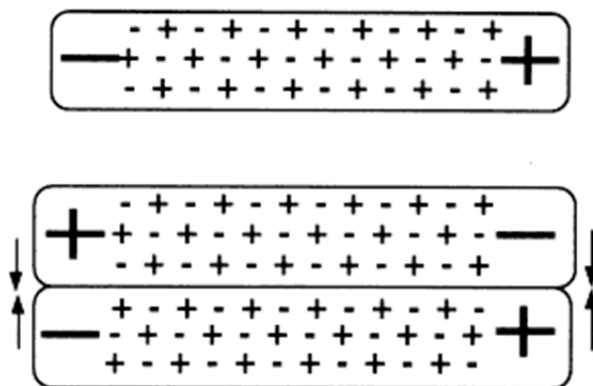


Рис. 5. Схематическое изображение дипольных взаимодействий.  
Вверху — диполь; внизу — диполь-дипольное взаимодействие

#### *Взаимодействия типа «диполь — индуцированный диполь».*

Некоторые соединения, например, содержащие ароматическое кольцо и, следовательно,  $\pi$  электроны, являются поляризуемыми. Когда такие молекулы находятся в непосредственной близости с молекулой, имеющей постоянный диполь, электрическое поле этого диполя индуцирует встречный диполь в поляризуемой молекуле. Этот индуцированный диполь действует так же, как и постоянный диполь, и полярные силы между двумя диполями приводят к взаимодействию между молекулами. Схематическое изображение взаимодействия типа «диполь — индуцированный диполь» совпадает со схематическим изображением диполь — дипольного взаимодействия (см. рис. 5), но следует учитывать, что один из диполей является «наведенным». Как и дипольные, взаимодействия типа «диполь — индуцированный диполь» всегда сопровождаются проявлением дисперсионных сил.

### **2.2.3. Ионные силы**

Полярные соединения, хотя и обладают диполями, не имеют суммарного заряда на молекуле. В отличие от них, ионы обладают суммарным зарядом и, следовательно, могут сильно взаимодействовать с ионами, имеющими противоположный заряд. Ионные взаимодействия используются



в ионообменной хроматографии, где противоионы находятся в неподвижной фазе. Подобно полярным взаимодействиям, ионные взаимодействия всегда сопровождаются дисперсионными взаимодействиями и, как правило, также полярными взаимодействиями. Ионное взаимодействие схематично изображено на рисунке 6.

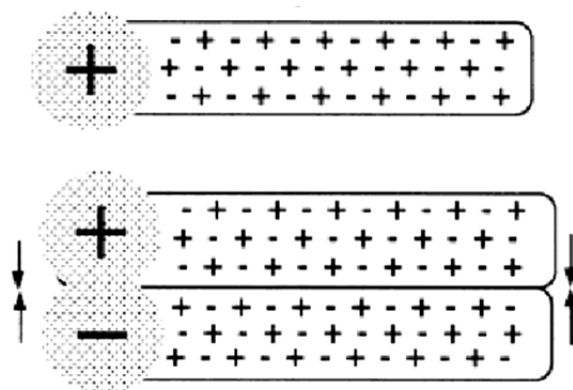


Рис. 6. Схематическое изображение ионных взаимодействий.

Вверху — схематическое изображение иона; внизу — схематическое изображение ионного взаимодействия

Молекула может иметь много «связующих» (интерактивных) узлов трех основных типов: дисперсионные, полярные и ионные. Большие молекулы (например, биополимеры) имеют сотни различных интерактивных узлов, и интерактивный характер в целом будет определяться результирующим эффектом всех узлов. Если доминируют дисперсионные узлы, молекула будет проявлять в основном дисперсионные взаимодействия, и называться гидрофобной. Если в молекуле доминируют диполи и поляризуемые группы, то она будет иметь полярный характер и называться гидрофильной.

### Вопросы и задания

1. Почему не прямые методы были полностью вытеснены из аналитической практики?
2. Опишите сущность и достоинства прямых хроматографических методов разделения энантиомеров.
3. Опишите теорию трехточечного взаимодействия. Схематически продемонстрируйте эту теорию.
4. Опишите проявляемые взаимодействия между разделяемыми энантиомерами и подвижной и неподвижной фазами в ЖХ и ГХ.
5. Опишите природу дисперсионных сил.
6. Опишите природу полярных взаимодействий разного типа: диполь-дипольное, взаимодействие типа «диполь-индуцированный диполь».
7. Опишите природу ионных взаимодействий.

### ХИРАЛЬНАЯ ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В конце 1950-х годов были предприняты попытки разделения хиральных веществ, но использование газовой хроматографии (ГХ) в этих целях не было успешным до середины 1960-х годов, когда была до конца разработана общая методология ГХ. Отсутствия особого интереса к разделению энантиомеров путем ГХ обуславливалось двумя основными причинами: во-первых, важность физиологических свойств хиральных соединений на тот момент не была полностью изучена, во-вторых, было очень сложно добиться селективности разделения таких веществ. Разделение энантиомеров методом ГХ на хиральной неподвижной фазе было впервые осуществлено и описано Гил-Авом и его сотрудниками в 1966 году<sup>6</sup>. На возможность осуществления такого разделения указывали некоторые факты, главным образом то, что в природе это явление в принципе возможно: ферменты избирательны к энантиомерам. Группа Гил-Ава решила создать систему, похожую по свойствам на ферменты, состоящую из производных  $\alpha$ -аминокислот. Также возникала необходимость «усилить» эти свойства, поэтому было принято решение использовать капиллярные колонки.

Высокая эффективность, чувствительность и скорость разделения являются важными преимуществами разделения энантиомеров методом ГХ. Из-за огромной разделительной способности капиллярной ГХ загрязняющие вещества и примеси обычно отделяются от аналитов, и одновременный анализ многокомпонентных смесей энантиомеров, например, всех протеиногенных аминокислот (рис. 7), становится возможным всего за один аналитический прогон. Процесс анализа становится более простым и информативным с применением вспомогательных методов: многомерная ГХ (иногда в сочетании с жидкостной хроматографией), метод газовая хроматография — масс-спектрометрия (ГХ-МС). Использование ГХ-МС помогает зафиксировать следовые количества присутствующих энантиомеров в сложных матрицах. Основное применение разделения энантиомеров методом ГХ связано с точным определением энантиомерного состава полученных в ходе научно-исследовательской работы хиральных соединений, промежуточных продуктов, вспомогательных веществ, метаболитов, прекурсоров, лекарств, пестицидов, фунгицидов, гербицидов, феромонов и ароматизаторов. Энантиоселективная ГХ особенно подходит для хирального анализа, когда невозможна или не желательна дериватизация аналита, например при анализе феромонов и ароматизаторов в виде летучих веществ, определяемых в газовой фазе матрицы образца.

---

<sup>6</sup> См.: He L., Beesley T. E. Applications of enantiomeric gas chromatography: a review // Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. 2005. Vol. 28. Pp. 1075–1114.

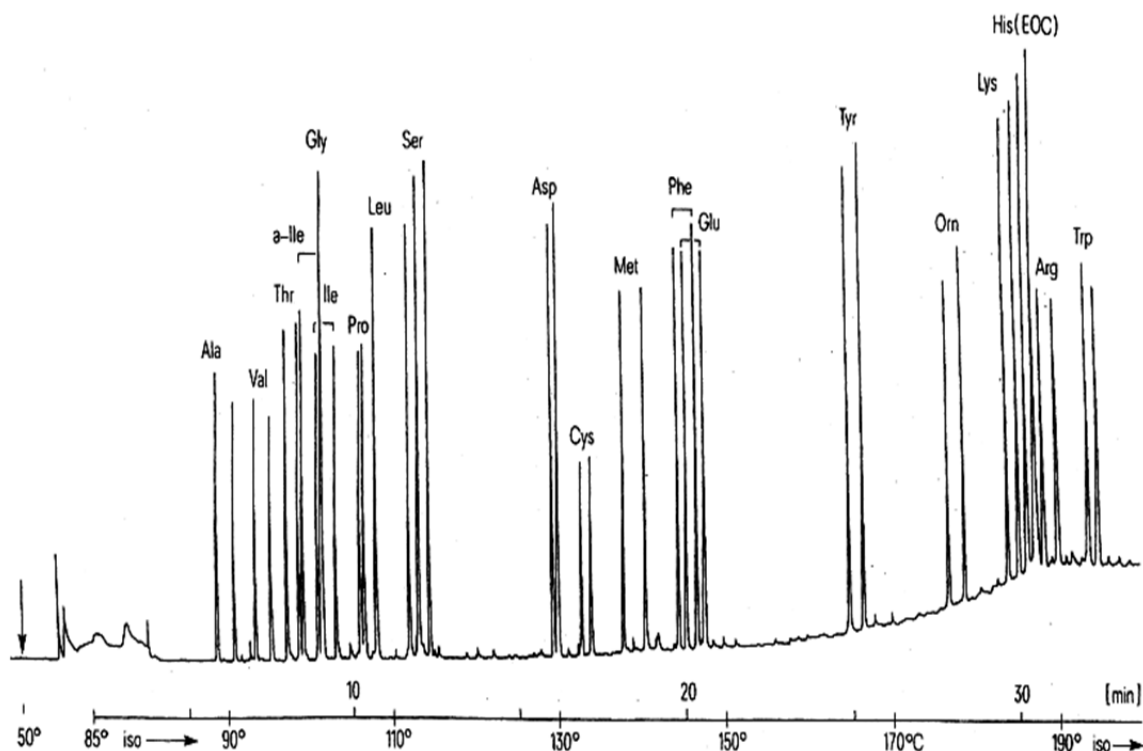


Рис. 7. Хроматограмма смеси энантиомеров всех протеиногенных аминокислот

В отличие от ЖХ в ГХ невозможен выбор растворителей, модификаторов и системы градиентного элюирования. Ограничивают использование ГХ в хиральном анализе и такие факторы, как летучесть и термическая стабильность хирального анализата.

Существует три основных типа хиральных неподвижных фаз (ХНФ) в ГХ. Они различаются по типу взаимодействия между разделяемыми энантиомерами и ХНФ:

- 1) производные аминокислот (разделение энантиомеров происходит за счет различий в образовании водородных связей);
- 2) хиральные координационные соединения металлов (разделение происходит за счет различий в комплексообразовании);
- 3) производные циклодекстринов (разделение посредством образования соединений включения различной устойчивости)<sup>7</sup>.

Стоит отметить, что все три типа ХНФ представляют собой вязкие жидкости, покрывающие внутреннюю поверхность капиллярной колонки. Таким образом, по типу НФ хиральная ГХ является газо-жидкостной хроматографией (ГЖХ).

Первоначально хиральные селекторы использовались в виде чистых веществ или растворов в сквалане или полисилоксане. Впоследствии, при попытке объединить химическую селективность с хроматографической эффективностью, хиральные селекторы были химически связаны с полисилоксанами. Полученные хиральные селекторы на осно-

<sup>7</sup> См.: Zhang J.-H., Xie S.-M., Chen L., Wang B.-J., He P.-G., Yuan L.-M. Homochiral porous organic cage with high selectivity for the separation of racemates in gas chromatography // Analytical Chemistry. 2015. Vol. 87. Pp. 7817–7824.

ве полисилоксанов обладали лучшей температурной стабильностью, эффективностью и устойчивостью. Впервые такая ХНФ была получена в 1977 году М. Фрэнком, Дж. К. Николсоном и Э. Байером (в настоящее время эта ХНФ известна как Chirasil-Val)<sup>8</sup>, позднее идея распространилась на координационные соединения, модифицированные циклодекстрины и краун-эфиры (в настоящее время известны как Chirasil-Metal, Chirasil-Dex, Chirasil-Crown соответственно).

### 3.1. Хиральные неподвижные фазы на основе производных аминокислот

Класс хиральных неподвижных фаз на основе производных аминокислот исторически является первым, так как в 1966 году Гил-Ав и сотрудники установили, что оптические изомеры ряда эфиров *N*-трифторацетил-*D,L*-аминокислоты можно разделять на капиллярной колонке длиной 100 м, покрытой хиральной фазой, а именно *N*-трифторацетил-*L*-изолейцином.

Сущность разделения состоит в различии обратимого образования водородных связей между амидными группами и карбонильными атомами кислорода ХНФ и сорбатов. Позднее были разработаны другие эффективные ХНФ, образующие водородные связи с сорбатом. Наиболее изученные представлены на рисунке 8.

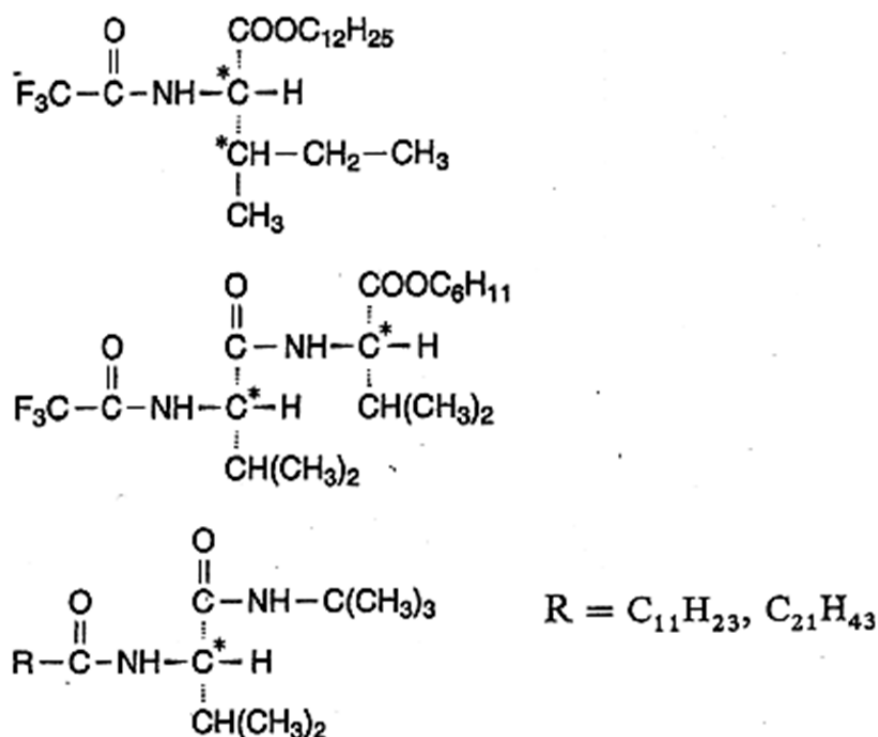


Рис. 8. Структуры наиболее изученных ХНФ, образующих водородные связи с сорбатом

<sup>8</sup> См.: Shellie R., Marriott P. Opportunities for ultra-high resolution analysis of essential oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography: a review. Flavour Fragrance Journal. 2003. Vol. 18. Pp. 179–191.

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 крупных 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, то есть диастереомерные сольваты, образующиеся при растворении рацемического сорбата в ХНФ, должны различаться по энергии. В-третьих, эффективность колонки, то есть число теоретических тарелок, должно быть высоким, что предполагает отсутствие ухудшения процессов массопередачи.

Новый этап развития хиральной ГХ начался в 1977 году, когда впервые ХНФ низкой молекулярной массы диамидного типа (*L*-валин-трет-бутиламид) была через аминокгруппу ковалентно закреплена на силиконовой полимерной подложке (рис. 9), и таким образом была получена ХНФ с самой высокой термостойкостью. В настоящее время синтезирован ряд различных полисилоксанов с хиральными заместителями. Тем не менее полисилоксан-*L*-валин-трет-бутиламид остается наиболее ценной неподвижной фазой (торговая марка "Chirasil-Val").

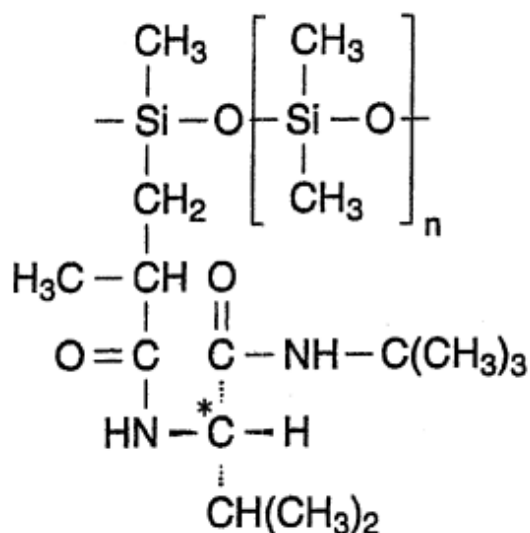


Рис. 9. Структура *L*-валин-трет-бутиламида, закрепленного на полимерной подложке

К соединениям, которые были разделены на Chirasil-Val, относятся диэфиры и дикарбонильные соединения. Например, на Chirasil-Val было осуществлено полное разделение антропоизомеров 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.

### 3.2. Хиральные неподвижные фазы на основе хиральных комплексов металлов

Тип хиральных неподвижных фаз на основе комплексов металлов впервые предложен в 1977 году для разделения энантиомеров 3-метилциклопентена с использованием хиральной фазы, содержащей дикарбонил (I)-3-трифторацетил-(1*R*)-камфору родия в сквалане (рис. 10).

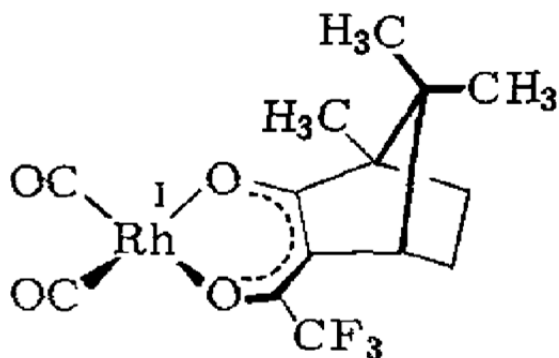


Рис. 10. Дикарбонил (I)-3-трифторацетил-(1*R*)-камфора родия

В опыте использовалась капиллярная колонка высокого разрешения длиной 200 м. Используя данную систему, удалось разделить энантиомеры 3-метилциклопентена в течение 3 ч при температуре 22 °С (рис. 11).

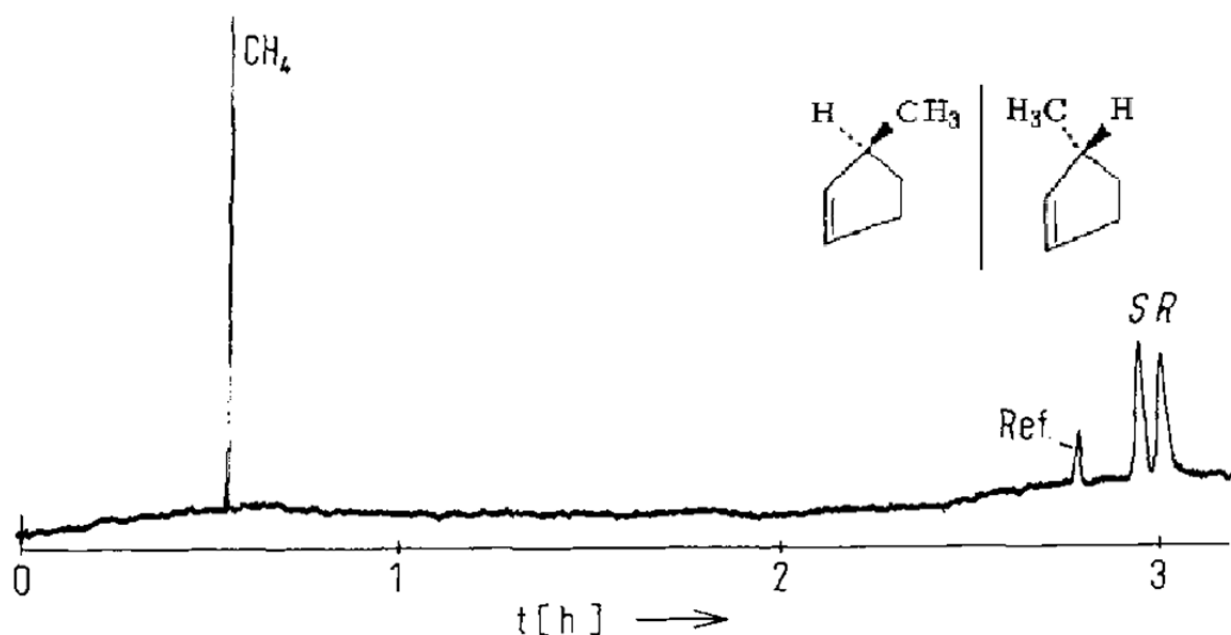


Рис. 11. Хроматограмма 3-метилциклопентена

Применение ХНФ на основе комплексов металлов было единственным способом разделения энантиомеров, неспособных к образованию водородных связей, пока не появились хиральные фазы на основе циклодекстринов и их производных.

Разделение на фазах осуществляется за счет различий в механизмах комплексообразования энантиомеров с металлокомплексами, имеющими различную хиральную структуру. Общая формула основного типа соединений, применяемых в комплексообразующей ГХ в качестве неподвижной фазы, приведена на рисунке 12. При участии двух атомов кислорода хирального  $\beta$ -дикарбонильного лиганда образуется его комплекс с переходным металлом, который и является энантиоселектором. Этот комплекс наносится в виде раствора в сквалане на стенки капиллярной колонки. Термостойкость и низкая летучесть таких соединений позволяет проводить анализ при температурах 20–100 °С.

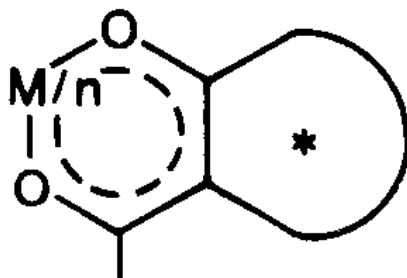


Рис. 12. Общая формула основного типа соединений, применяемых в комплексообразующей ГХ

Удерживание сорбата обусловлено электроноакцепторными свойствами металла, следовательно эти фазы подходят для разделения малополярных соединений, таких как алкены, сложные эфиры, кетоны, тиоэфиры, которые способны донировать электроны  $\pi$ -связей либо неподеленные электронные пары на атом металла-комплексообразователя. Хиральные лиганды, применяемые для создания подобных ХНФ, легко получают из природных оптически активных соединений: камфоры, туйона, ментона, изоментона, карвона и пулегона. В качестве металлокомплексообразователей применяются никель, кобальт, марганец, родий, европий и др. Наиболее изученные ХНФ данного типа представлены на рисунке 13. Фактором, ограничивающим использование комплексных соединений металлов в качестве ХНФ, является их низкий рабочий диапазон температур: 25–120 °С. Именно поэтому ХНФ на основе комплексов металлов были привиты на силоксановую подложку. Одной из самых распространенных привитых фаз на основе комплекса никеля (II) является Chirasil-Nickel (II), структура которой показана на рисунке 14.

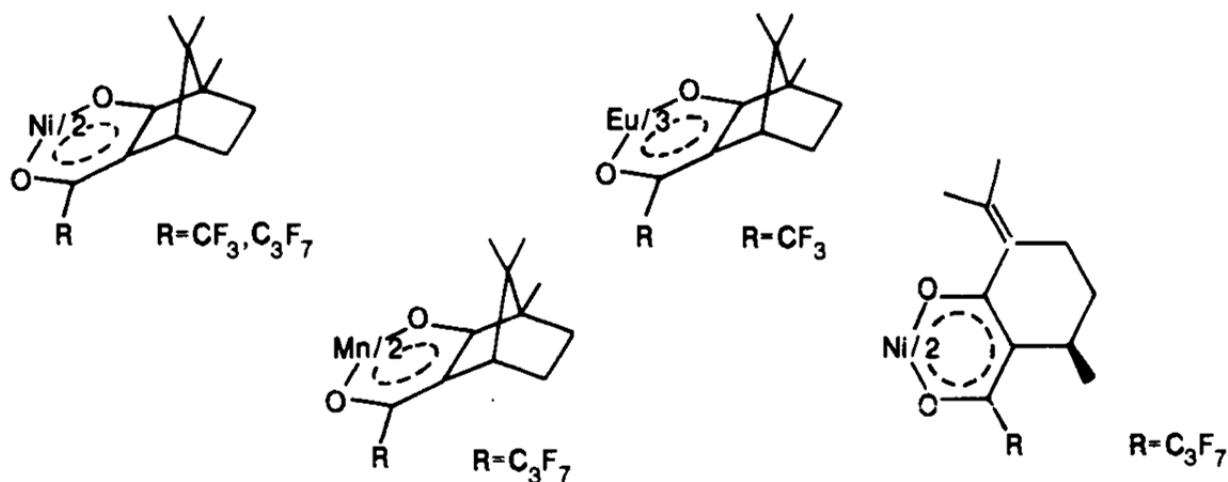


Рис. 13. Наиболее изученные ХНФ на основе хиральных комплексов металлов

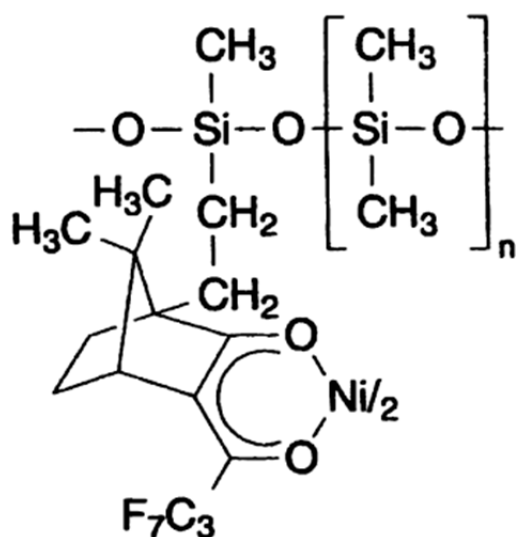


Рис. 14. Структура Chirasil-Nickel (II)

Фаза Chirasil-Nickel (II), как и ее разновидности, используется для разделения энантиомеров таких соединений, как эпоксициклододекан, различные типы оксианов, ментол, розеноксид.

### 3.3. Хиральные неподвижные фазы на основе циклодекстринов

Циклодекстрины — это макроциклические соединения, образованные остатками глюкозы, соединенными вместе  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями. Существует три основных типа циклодекстринов:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , которые состоят из шести, семи и восьми остатков глюкозы соответственно (рис. 15). В настоящее время производные циклодекстринов являются доминирующими неподвижными фазами в хиральной ГХ.



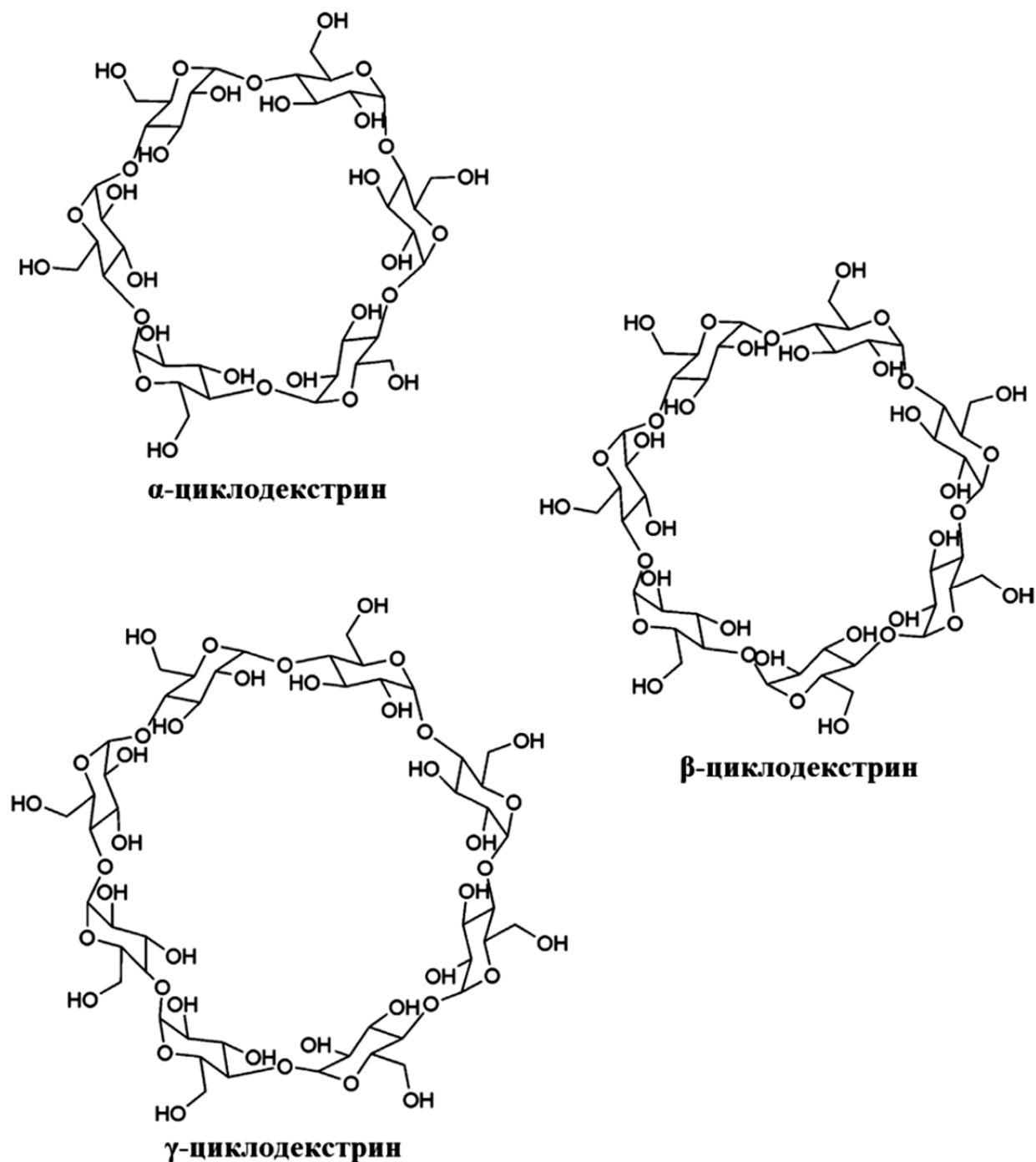


Рис. 15. Типы циклодекстринов

Форма молекул циклодекстринов похожа на полый усеченный конус (рис. 16). Каждый остаток глюкозы несет пять хиральных центров и имеет три гидроксильные группы, две из которых являются вторичными и находятся в широком конце или «устье» циклодекстрина. Третья ОН-группа расположена на узком конце или «дне» усеченного конуса. Водородная связь обеспечивает некоторую структурную жесткость молекул циклодекстринов. Наличие гидроксильных групп на ободках конуса делает их более гидрофильными, а СН-группы внутри полости конуса делают полость относительно неполярной. Полость также содержит гли-

козидные кислородные группы, которые могут выступать в роли донора электронной пары и действовать как слабое основание Льюиса.

$\alpha$ -Циклодекстрин имеет 30 хиральных центров и внутреннюю полость диаметром приблизительно 5,5 Å, благодаря чему в нее могут включаться небольшие соединения, например бензол.

$\beta$ -Циклодекстрин имеет 35 хиральных центров и приближенный внутренний диаметр 6,5 Å, поэтому может включать более крупные соединения, такие как нафталин.  $\gamma$ -Циклодекстрин имеет 40 хиральных центров и приблизительно внутренний диаметр 8,5 Å, за счет чего может включать уже такие соединения, как антрацен.

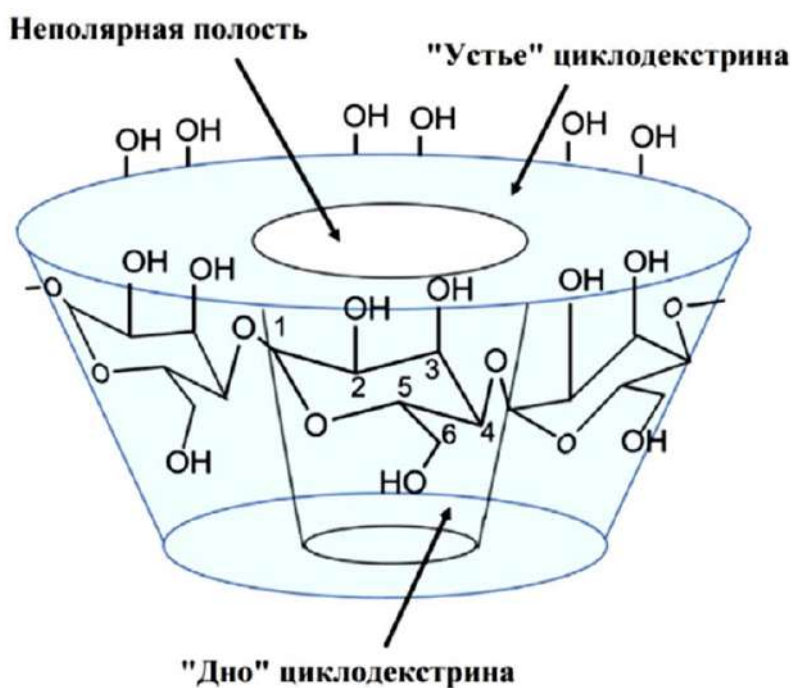


Рис. 16. Форма молекулы циклодекстрина

Нативные циклодекстрины и их простые производные (ацетил, перметил и т. д.) — кристаллические твердые вещества с высокой температурой плавления. Твердая природа делает их непригодными для ГЖХ и покрытия капилляров колонки, поэтому циклодекстрины модифицированы в следующих различных вариациях, чтобы сделать их доступными для ГЖХ: неразбавленные селекторы, разбавленные селекторы, привитые хиральные селекторы.

#### *Неразбавленные селекторы*

Термин «неразбавленные селекторы» относится к нативным циклодекстринам, которые дериватизированы для превращения их в аморфные легкоплавкие соединения так, чтобы они могли быть непосредственно нанесены на капиллярные колонки. Например, 2- и 6-гидроксильные группы циклодекстрина обычно дериватизируют путем этерификации

в пентильные или метильные группы. Группы 2-ОН и 6-ОН в молекулах сахара более реакционноспособны по сравнению с 3-ОН группами. 2-ОН группа является более кислой, тогда как группа 6-ОН стерически более доступна и нуклеофильна. Диалкилированные производные получают этерификацией 2 и 6-ОН групп, в то время как алкилированные производные синтезируются с помощью этерификации всех трех гидроксильных групп. В случае диалкилированных производных группа 3-ОН может быть дериватизирована ацетильной, метокси, трифторацетильной, трет-бутильной, пропионильной или бутирильной группами. О методе неразбавленных, или «аккуратных», селекторов впервые сообщил В. А. Кениг. Различные неразбавленные селекторы перечислены в таблице 2. Дипентилированные или частично пентилированные производные представляют собой смеси гомологов и изомеров, и эта неоднородность приводит к снижению температуры плавления. В случае трипентилированных или частично пентилированных производных гидроксильные группы заменены неполярными «громоздкими» пентильными группами. Стерические взаимодействия препятствуют кристаллизации дериватизированных циклодекстринов и приводят к пониженным температурам плавления и/или аморфным твердым веществам.

### *Разбавленные селекторы*

Дериватизированные циклодекстрины, которые являются твердыми или жидкими при комнатной температуре, могут быть растворены в полисилоксановых неподвижных фазах и нанесены на капиллярные колонки. Метод разбавленных селекторов был впервые разработан В. Шуригом и Л. Новотным в 1988 году<sup>9</sup>. Этот подход выгоден, так как сочетает в себе энантиоселективность циклодекстринов и уникальные свойства полисилоксанов, которые обеспечивают хорошее покрытие капилляра и высокую эффективность колонки. Метод разбавленных селекторов был приспособлен под использование ионных жидкостей в качестве матрицы вместо полисилоксанов. В этом случае селективность энантиомерного разделения зависит от концентрации циклодекстринов, растворенных в матрице растворителя. Экспериментально и теоретически доказано, что селективность не увеличивается линейно с увеличением концентрации циклодекстрина в полисилоксане. Энантиоселективность НФ улучшается при увеличении концентрации циклодекстрина, но при этом уменьшается ее эффективность из-за затрудненного массопереноса. Как правило, оптимальная селективность достигается уже при низких концентрациях циклодекстрина, поэтому дальнейшее ее повышение не требуется, при этом сохраняется хорошая эффективность.

---

<sup>9</sup> См.: Schurig V. Separation of enantiomers by gas chromatography. // Journal of Chromatography A. 2001. Iss. 906. Pp. 275–299.

### Привитые хиральные селекторы

Неподвижные фазы ГХ на основе жидкого циклодекстрина также были получены прививкой дериватизированных циклодекстринов на полисилоксановые остовы<sup>10</sup>. Привитые фазы на основе циклодекстрина иммобилизованы на внутренних стенках капиллярных колонок путем термической обработки (рис. 17). Эти хиральные неподвижные фазы известны как “Chirasil-Dex”. Привитые циклодекстриновые фазы имеют следующие преимущества: 1) по сравнению с разбавленными селекторами (циклодекстрины, растворенные в умеренно полярных полисилоксанах), аполлярные полисилоксаны могут использоваться в качестве основы для прививки циклодекстриновых селекторов, при этом уменьшенная полярность приводит к снижению времени удерживания полярных аналитов; 2) полисилоксановый каркас обеспечивает улучшенную термическую стойкость, время жизни колонки и циклодекстриновой фазы; 3) в случае разбавленных селекторов циклодекстриновые фазы имеют ограниченную растворимость в полисилоксанах, но растворимость не является проблемой в случае привитых фаз.

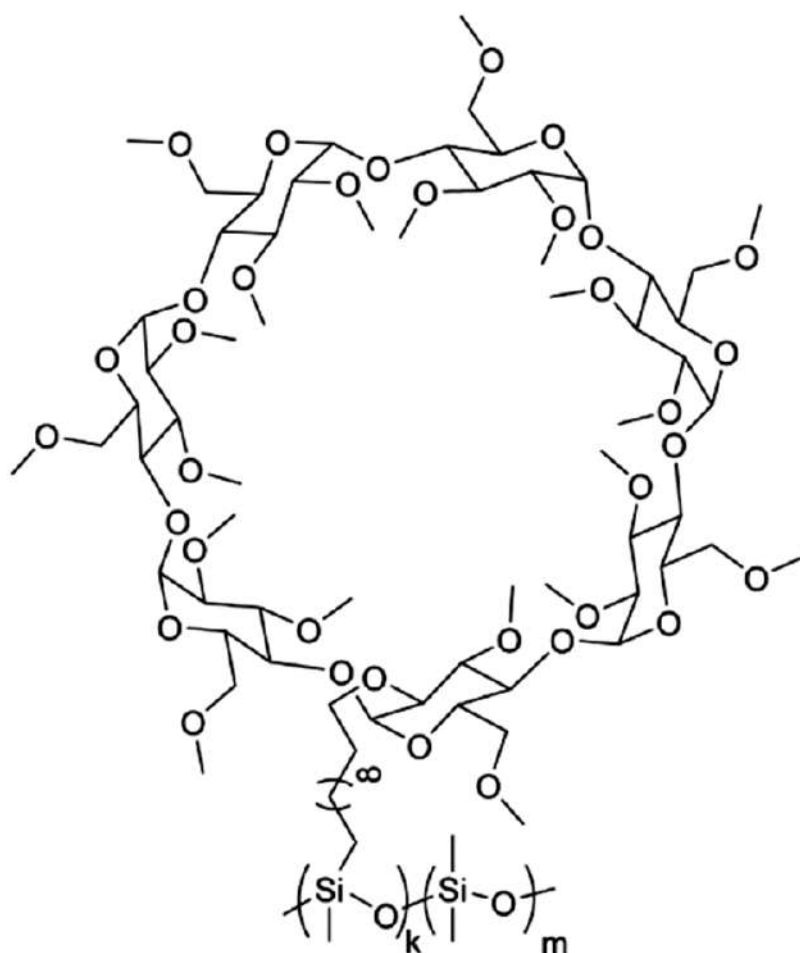


Рис. 17. Структура привитого к силикагелю циклодекстрина

<sup>10</sup> См.: Huang K., Zhang X., Armstrong D. W. Ionic cyclodextrins in ionic liquid matrices as chiral stationary phases for gas chromatography // Journal of Chromatography A. 2010. Iss. 1217. Pp. 5261–5273.

Производные циклодекстринов могут эффективно разделять широкий спектр полярных и неполярных хиральных соединений, следовательно механизм хирального разделения является сложным процессом, включающим в себя различные типы взаимодействий: включение, комплексообразование, водородное связывание, проявление дисперсионных сил, диполь-дипольных и стерических взаимодействий и т. д. В циклодекстриновых фазах разделение и удерживание основаны на процессах включения и на стерических взаимодействиях энантиомеров с полостью циклодекстрина. Стерическая посадка зависит от размера и формы молекулы аналита относительно полости циклодекстрина. Взаимодействие аналитов с заместителями на «ободке» циклодекстринов также играет роль в процессе разделения. Например,  $\gamma$ -циклодекстрины в основном показывают разделение по поверхностным взаимодействиям, так как они содержат наибольшее число ОН-групп, которые могут быть дериватизированы. Вместе с этим дериватизационные заместители оказывают сильное влияние на энантиоселективность циклодекстринов. Различные заместители могут по-разному взаимодействовать с аналитами и тем самым обеспечивать различные возможности энантиомерного разделения. Сравнение 2,6-ди-*O*-пентил и 2,6-ди-*O*-пентил-3-трифторацетильных производных циклодекстринов показали, что последние обладают более широкой энантиоселективностью за счет увеличения роли диполь-дипольных взаимодействий трифторацетильной группы. Заместители также влияют на порядок элюирования аналитов. Так перметил-*O*-((*S*)-2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин и 2,6-ди-*O*-пентил-3-трифторацетил- $\beta$ -циклодекстрин показали комплементарную селективность в отношении энантиомеров некоторых трифторацетилированных аминов, спиртов и моносахаридов. Кроме того, важную роль в разделении играют стерические эффекты функциональных групп. Например, дериватизация группы 6-ОН с помощью объемных заместителей затрудняет включение и снижает хиральную селективность. Влияние полярности циклодекстринов на их аналитические возможности было показано на примере разделения рацемических сахаров с использованием аполярных  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстринов с 2,6-ди-*O*-пентильными заместителями и полярных  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстринов с (*S*)-гидроксипропил-пер-*O*-метильными заместителями.  $\gamma$ -Циклодекстрины с полярной и аполярной дериватизацией были успешны в разделении трифторацетилированных рацемических сахаров. Однако энантиоселективный порядок элюирования был изменен на противоположный в случае (*S*)-гидроксипропил-пер-*O*-метил- $\gamma$ -циклодекстрина.

Основные ХНФ на основе циклодекстринов и их применение рассмотрены в таблице 2.

Основные ХНФ на основе циклодекстринов <sup>11</sup>

Состав ХНФ	Коммерческое название	Температурные условия	Разделяемые соединения
<i>α</i> -циклодекстрин			
2,3,6-три- <i>O</i> -метил- <i>α</i> -циклодекстрин (ковалентно не связанный с полимерной основой)	<i>α</i> -DEX-120	30 °С – 230 °С (изотермический или программированный режимы)	Спирты, диолы, эпоксиды, эфиры, галогенпроизводные углеводов, кетоны
2,3-ди- <i>O</i> -ацетил-6- <i>O</i> -TBDMS- <i>α</i> -циклодекстрин (ковалентно не связанный с полимерной основой)	<i>α</i> -DEX-225	30 °С – 230 °С (изотермический или программированный режимы)	Небольшие молекулы: спирты, альдегиды, эфиры, кетоны
2,6-ди- <i>O</i> -пентил-3-трифторацетил производное <i>α</i> -циклодекстрина	Astec CHIRALDEX A-TA	–10 °С – 180 °С (изотермический или программированный режимы)	Небольшие молекулы: эпоксиды, спирты, аминоспирты, диолы
2,6-ди- <i>O</i> -пентил-3-метоксипроизводное <i>α</i> -циклодекстрина	Astec CHIRALDEX A-DA	–10 °С – 220 °С (изотермический или программированный режимы)	Небольшие молекулы: циклические и ароматические амины, спирты и простые эпоксиды, циклические эфиры
2,3,6-три- <i>O</i> -пентил производное <i>α</i> -циклодекстрина	LIPODEX A	200/220 °С (изотермический режим)	Углеводороды, полиолы, диолы, сложные эфиры, спирты, кетоны
2,6-ди- <i>O</i> -пентил-3- <i>O</i> -ацетил производное <i>α</i> -циклодекстрина	LIPODEX B	200/220 °С (изотермический режим)	Лактоны, диолы, аминоспирты
<i>β</i> -циклодекстрин			
Перметилированный <i>β</i> -циклодекстрин (ковалентно не связанный с полимерной основой)	<i>β</i> -DEX-110 <i>β</i> -DEX-120 Rt- <i>β</i> DEXm HP-Chiral B (в этих фазах различается полимерная основа, на которую нанесен перметилированный <i>β</i> -циклодекстрин)	30 °С – 230 °С (изотермический или программированный режимы)	Кислоты, амины, спирты, эпоксиды, эфиры, кетоны, силаны, терпены
2,3,6-три- <i>O</i> -метил производное <i>β</i> -циклодекстрина	Astec CHIRALDEX B-PM	–10 °С – 220 °С (изотермический или программированный режимы)	Спирты, диолы

<sup>11</sup> См.: Huang K., Armstrong D. W. GC-MS analysis of crocetane, phytane and some of their stereoisomers using cyclodextrin-based stationary phases // Organic Geochemistry. 2009. Vol. 40. Pp. 283– 286 ; Huang K., Zhang X., Armstrong D. W. Ionic cyclodextrins in ionic liquid matrices as chiral stationary phases for gas chromatography.

Состав ХНФ	Коммерческое название	Температурные условия	Разделяемые соединения
<i>β</i> -циклодекстрин			
2,3-ди- <i>O</i> -ацетил-6- <i>O</i> -TBDMS- <i>β</i> -циклодекстрин	<i>β</i> -DEX-225	30 °С – 230 °С (изотермический или программированный режимы)	Небольшие молекулы: спирты, альдегиды, эфиры, кетоны
<i>γ</i> -циклодекстрин			
Перметилированный <i>γ</i> -циклодекстрин (ковалентно не связанный с полимерной основой)	<i>γ</i> -DEX-120	30 °С – 230 °С (изотермический или программированный режимы)	Используется для разделения больших аналитов (карбон, карбоновые кислоты, метамфетамин)
2,6-ди- <i>O</i> -пентил-3-трифторацетил производное <i>γ</i> -циклодекстрина	Astec CHIRALDEX G-TA	–10 °С – 180 °С (изотермический или программированный режимы)	Спирты, диолы, полиолы, углеводороды, лактоны, галогенкарбоновые кислоты, производные фурана и пирана, эпоксиды
2,6-ди- <i>O</i> -пентил-3-метоксипроизводное <i>γ</i> -циклодекстрина	Astec CHIRALDEX G-DA	–10 °С – 220 °С (изотермический или программированный режимы)	Ароматические амины, циклические диолы, некоторые гетероциклы, нафтильные производные

### Вопросы и задания

1. Опишите основные преимущества ГХ в разделении энантиомеров.
2. Выделите основные недостатки ГХ в разделении энантиомеров.
3. Укажите требования, предъявляемые к ХНФ в ГХ.
4. Какие основные типы ХНФ используются в ГХ?
5. В чем сущность ХНФ на основе производных аминокислот? Выделите преимущества и недостатки данного типа ХНФ.
6. Каким образом была решена проблема термостойкости ХНФ на основе производных аминокислот?
7. Опишите сущность ХНФ на основе хиральных комплексов металлов.
8. Опишите строение циклодекстринов и форму их молекул.
9. Расскажите о типах взаимодействия разделяемых энантиомеров с ХНФ на основе циклодекстринов. Выделите преимущества и недостатки данного типа ХНФ.

### ХИРАЛЬНАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Первое, принципиальное, различие между разделениями в ЖХ и ГХ состоит в том, что в ЖХ могут проявляться сильные взаимодействия между сорбатом и подвижной фазой в дополнение к тем, которые проявляются между сорбатом и неподвижной фазой. Взаимодействие с подвижной фазой в ЖХ может быть сильным и даже сильнее, чем те, которые реализуются в системе «сорбат — неподвижная фаза». Это означает, что удерживание и селективность могут быть изменены путем изменения природы и состава не только НФ, но и ПФ. Фактически, изменяя состав ПФ, можно менять силу взаимодействия сорбата с ПФ, наподобие того, как это работает в ГХ при изменении температуры колонки. Отсюда следует, что сильное удерживание сорбата возникает, с одной стороны, из-за сильного взаимодействия с НФ, с другой — из-за слабого или ослабленного взаимодействия с ПФ. Тем не менее ХНФ, которые имеют возможность образовывать соединения включения, проявляют хиральную селективность как при высокой, так и при низкой концентрации модификатора в ПФ. Это делает выбор оптимального состава сложной задачей. В большинстве случаев интервал оптимальных концентраций модификатора в ПФ является небольшим и очень ограниченным.

Существенным преимуществом ЖХ, облегчающим подбор эффективной системы для разделения, является тот факт, что сорбаты не обязательно должны быть летучими. Также положительным моментом является то, что ионные взаимодействия в ЖХ могут использоваться для контроля удерживания, в дополнение к дисперсии и полярным взаимодействиям, проявляющимся в ГХ. Температура используется для контроля удерживания в ЖХ, что в некоторой степени схоже с ГХ.

Второе различие между ГХ и ЖХ заключается в процессе диспергирования (рассеяния) сорбата. В случае ЖХ почти все колонки имеют плотную упаковку (не капилляры), что приводит к дисперсии сорбата в колонке и не характерно для капиллярных колонок, применяемых в ГХ. В колонке с плотной упаковкой молекулы сорбата будут описывать извилистый путь через промежутки между частицами НФ и, очевидно, некоторые из них пройдут более коротким путем, а другие более длинным. Следовательно, некоторые молекулы будут двигаться впереди общего потока молекул, а некоторые — отставать.

Третье различие обусловлено относительно небольшой сжимаемостью жидкой ПФ. В отличие от газообразной ПФ, которая является очень сжимаемой, при измерении удерживающих объемов в ЖХ нет необходимости в коррекции фазового давления, если не используются очень высо-



кие давления, но даже в таких случаях, из-за малой сжимаемости жидкостей, это будет эффектом второго порядка. Влияние давления на взаимодействие сорбата с НФ может быть более значительным в случае, если матрица неподвижной фазы на поверхности кремнезема имеет полимерную структуру и, таким образом, в некоторой степени сама является сжимаемой. Следует отметить, что увеличение давления уменьшает диффузию сорбата и ухудшает процесс массообмена в ПФ. Как следствие, увеличивается дисперсия пика, а эффективность разделения снижается. В хиральной ЖХ очень высокие давления обычно не используются, поэтому влияние давления обычно является эффектом второго порядка. Однако для очень точной, стабильной работы хроматографические условия следует отрегулировать так, чтобы устранить необходимость в очень высоких давлениях.

Наиболее подходящим уравнением для прогнозирования дисперсии сорбата в колонке ЖХ является уравнение Ван-Деемтера, которое было проверено экспериментально. С помощью этого уравнения можно точно описать дисперсию пика в насадочной колонне, особенно при оптимальных скоростях ПФ. Кроме того, так как все колонки в ЖХ должны работать при оптимальной скорости ПФ для максимальной эффективности, уравнение Ван-Деемтера особенно полезно при проектировании колонок и для прогнозирования рабочих параметров.

#### **4.1. Хиральные неподвижные фазы в высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Ключ к успеху разделения энантиомеров лежит в основном в правильном выборе подходящей ХНФ. Следовательно, знания о существующих ХНФ и их свойствах имеют большое значение. Многочисленные хиральные молекулы природного или синтетического происхождения в энантиоочистой форме были предметом изучения с точки зрения хроматографической энантиоселективности и пригодности в качестве хиральных селекторов. В настоящее время более ста ХНФ предлагаются на коммерческой основе и среди них около 20–30 чаще всего используются и могут вместе «справиться» почти со всеми задачами разделения энантиомеров различных классов соединений.

Существует множество различных типов материалов, которые используются в качестве ХНФ, но в основном только пять из них используются широко, являясь ХНФ общего пользования.

Первый тип — ХНФ на основе белков. Эта группа неподвижных фаз была разработана и изучена одной из первых. Обычно эти ХНФ представляют собой природные белки, связанные с кремнеземной матрицей. Поскольку они являются белками, то содержат большое количество хиральных центров одной конфигурации и сильно взаимодействуют с малыми аналитами, проявляя сильную энантиоселективность. В структуре таких ХНФ, помимо специальных интерактивных узлов, проявляющих хиральную избирательность, есть большое количество других узлов,

способствующих общему удерживанию. Эти узлы могут быть значительно дезактивированы добавками к подвижной фазе (например, октиламина), которые снижают общее удерживание и увеличивают хиральную селективность.

Второй тип ХНФ состоит из энантиочистых веществ с относительно небольшой молекулярной массой, ковалентно связанных с силикагелем. Фазы такого типа были впервые разработаны У. Пирклом<sup>12</sup>. Особое преимущество хиральных фаз Пиркла состоит в том, что, поскольку взаимодействующая молекула мала, дополнительные вклады удерживания также невелики, и, таким образом, энантиоселективность становится доминирующим фактором, контролирующим удерживание.

Третий тип основан на полимерах целлюлозы и амилозы, которые были разработаны И. Окамато<sup>13</sup>. Возможность дериватизации целлюлозы и амилозы позволяет вводить различного рода интерактивные группы в структуру ХНФ. Получаемые производные целлюлозы и амилозы наносятся на подложку из силикагеля, ковалентно не связываясь с ней.

Четвертый тип основан на макроциклических гликопептидах (антибиотиках) и впервые представлен Д. В. Армстронгом<sup>14</sup>. Это материалы, которые также содержат большое количество хиральных центров и молекулярные полости, войдя в которые, молекулы растворенного вещества могут взаимодействовать с соседними группами. Пространственное строение сорбата определяет вероятность его «входа» в молекулярную полость и, следовательно, степень его близости с интерактивными группами, которая, в свою очередь, будет определять энергию взаимодействия и величину удерживания.

Пятая группа содержит материалы на основе циклодекстринов, которые контролируют удерживание способом, аналогичным описанному ранее для ГХ.

#### ***4.1.1. Хиральные неподвижные фазы на основе белков***

Существует ряд коммерчески доступных НФ на основе белков, которые используются для разделения широкого спектра хиральных веществ.  $\alpha$ -1-Кислотный гликопротеин (орозомукоид), коммерчески доступный под названием CHIRAL-AGP, является очень стабильным белком и связан с ча-

---

<sup>12</sup> См.: Huang K., Zhang X., Armstrong D. W. Ionic cyclodextrins in ionic liquid matrices as chiral stationary phases for gas chromatography // Journal of Chromatography A. 2010. Iss. 1217. Pp. 5261–5273.

<sup>13</sup> См.: Kewley A., Stephenson A., Chen L., Briggs M. E., Hasell T., Cooper A. I. Porous organic cages for gas chromatography separations // Chemistry of Materials. 2015. Vol. 27. Pp. 3207–3210.

<sup>14</sup> См.: Krupčík J., Gorovenko R., Špánik I., Armstrong D. W., Sandra P. Enantioselective comprehensive two-dimensional gas chromatography of lavender essential oil // Journal of Separation Science. 2016. Vol. 39. Pp. 4765–4772.

стицами силикагеля. Эта НФ обычно используется с простыми бинарными смесями растворителей, как правило, содержащими небольшое количество (1–10 %) 2-пропанола, этанола или ацетонитрила и буферный раствор. Изменяя концентрацию органического растворителя, можно контролировать как абсолютное удерживание энантиомеров, так и хиральную селективность. Пример влияния концентрации органического растворителя на удерживание и селективность продемонстрирован на хроматограмме, показывающей разделение изомеров метопролола при разных концентрациях 2-пропанола в элюенте (рис. 18). Поскольку концентрации органического растворителя относительно низкие, а содержание воды высокое, основными взаимодействиями, обеспечивающими удерживание, являются дисперсионные (гидрофобные). Улучшенная хиральная селективность, обусловленная снижением содержания 2-пропанола, отражается увеличением времени удерживания. Это означает, что один из энантиомеров взаимодействует с НФ сильнее, чем другой, за счет дисперсионных взаимодействий.

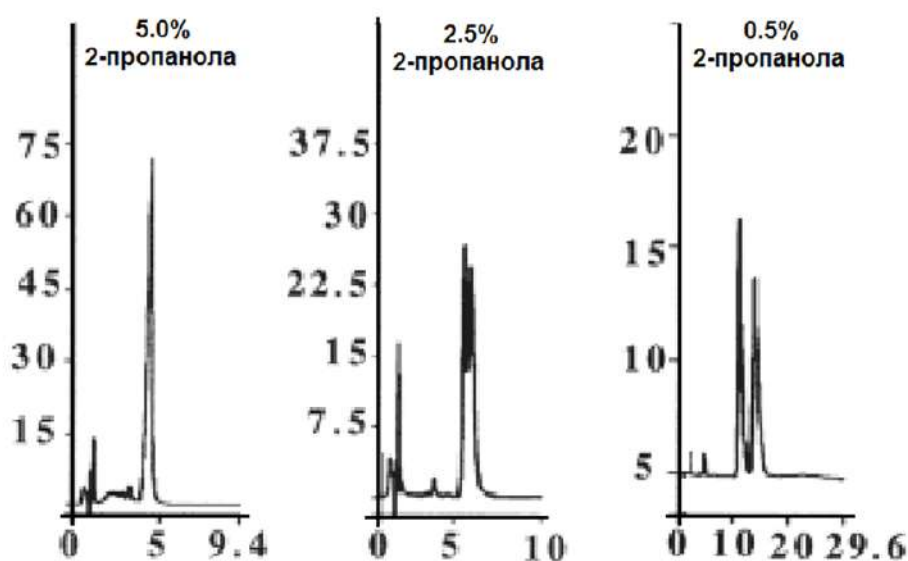


Рис. 18. Хроматограммы метопролола, полученные при разных концентрациях 2-пропанола в элюенте

Неподвижная фаза также содержит группы, которые могут проявлять ионные взаимодействия с растворенным веществом. На разделение энантиомеров также влияет значение pH. Примером этого служит анализ энантиомерного состава 2-феноксипропионовой кислоты при разных значениях pH (хроматограммы на рисунке 19). Абсолютное удерживание и хиральная селективность возрастают при уменьшении pH. Это указывает на то, что энтальпийный вклад в разделение сильно (если не полностью) зависит от ионных взаимодействий. Следует обратить внимание, что разделение достигается менее чем за 5 мин. CHIRAL-AGP обычно используется для разделения энантиомеров, которые несут вторичную и третичную аминогруппы и для веществ, содержащих азот в составе ароматического кольца.

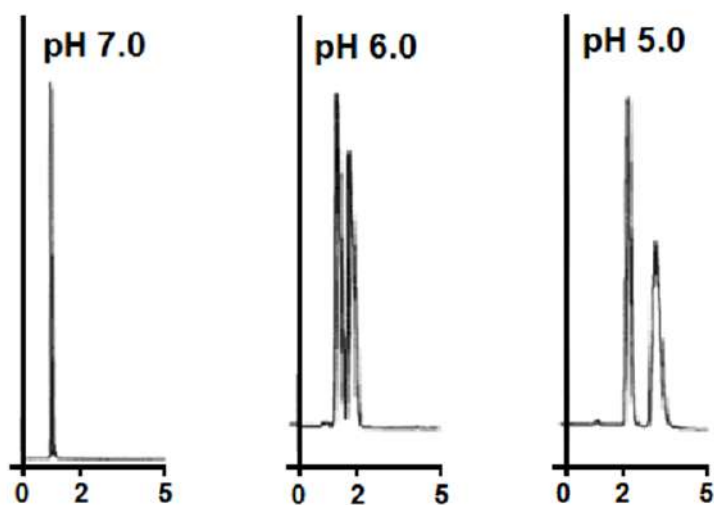


Рис. 19. Разделение 2-феноксипропионовой кислоты при разных значениях pH

Таким же поведением, как и CHIRAL-AGP, обладает овальбумин (рис. 20), который готовится из куриных яичных белков. В общем, рабочие условия овальбумина аналогичны AGP, хотя в некоторых случаях наблюдался обратный порядок элюирования энантиомеров.

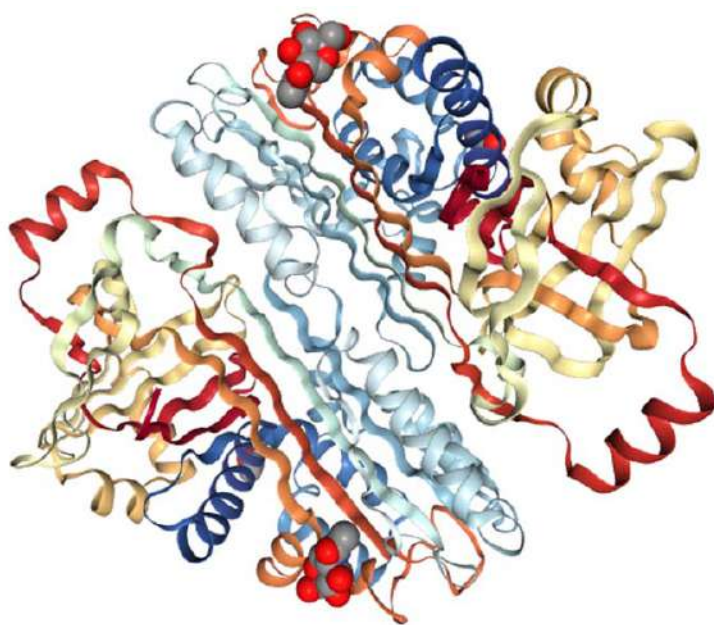


Рис. 20. Пространственная структура овальбумина

Целлобиогидролаза (гидролаза, расщепляющая структурно-упорядоченную часть целлюлозы) также связана с силикагельной матрицей и используется в качестве эффективной НФ. Выпускается под названием CHIRAL-CBH. Этот связанный материал действует как обращенная фаза, удерживая вещества в основном за счет дисперсионных (гидрофобных) взаимодействий. Данная ХНФ популярна для разделения энантиомеров лекарств (используется для анализа норметанефрина и октопамина) и энантиомеров, содержащих первичные аминогруппы. Подвижной фазой обыч-

но служит смесь 2-пропанола или ацетонитрила с фосфатным буфером. Однако целлобиогидролаза — фермент, который легко разрушается ионами металлов, поэтому необходимо добавлять в подвижную фазу хелатирующий агент, такой как этилендиаминтетрацетат, который связывает любые загрязняющие ионы металлов в системе. По аналогии с CHIRAL-AGP удерживание и хиральная селективность могут контролироваться изменением pH ПФ и концентрации органического растворителя в ней.

Другая основанная на белке НФ производится путем связывания человеческого сывороточного альбумина с силикагелевой матрицей. Этот материал также коммерчески доступен, выпускается под названием CHIRAL-HSA.

Рассмотренные НФ на основе белка ведут себя очень похоже: удерживание и энантиоселективность контролируются pH и концентрацией органического растворителя в ПФ. Тем не менее селективность для конкретной энантиомерной пары может сильно отличаться на разных НФ, несмотря на то, что все эти ХНФ — на основе белков.

Пример практического использования белковой НФ для разделения энантиомеров показан на рисунке 21. Метадон, содержащийся в образце сыворотки крови, был разделен с использованием ПФ: ацетонитрил / фосфатный буфер (0,01 М) при pH 6,6 (16/84 об./об.) Колонка имела длину 10 см, внутренний диаметр 4 мм, скорость потока 0,7 мл/мин. ХНФ — CHIRAL-AGP.

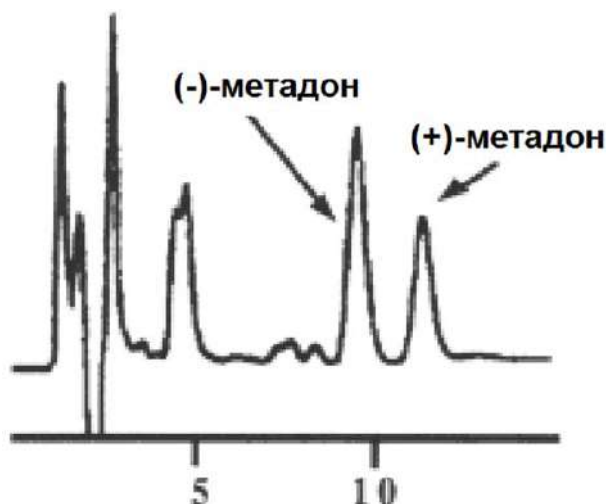


Рис. 21. Хроматограмма плазмы крови  
(определение энантиомеров метадона)

#### 4.1.2. Хиральные неподвижные фазы Пиркла

Хиральные вещества с небольшой молекулярной массой, связанные с силикагелем и обычно называемые фазами Пиркла, имеют ограниченное количество хиральных центров, но большое количество привитых групп. Было исследовано много типов подобных фаз, признанных эффективными для разделения определенных хиральных соединений. Система имеет не-

достатки, являющиеся следствием особенностей пространственного расположения хирального центра и других взаимодействующих частей вокруг него. Относительная короткая связь между хиральным агентом и силикагелем ограничивает приближение некоторых молекул, так что их асимметрический центр не может взаимодействовать с хиральным центром НФ. Однако для некоторых молекул пространственное расположение может быть идеальным. Например, (*R*)- и (*S*)-динитробензоилфенилглицин — типичный пример, когда структура является подходящей для разделения энантиомеров 1-нафтиметиламида ибупрофена, который, вероятно, располагается так, как показано на рисунке 22.

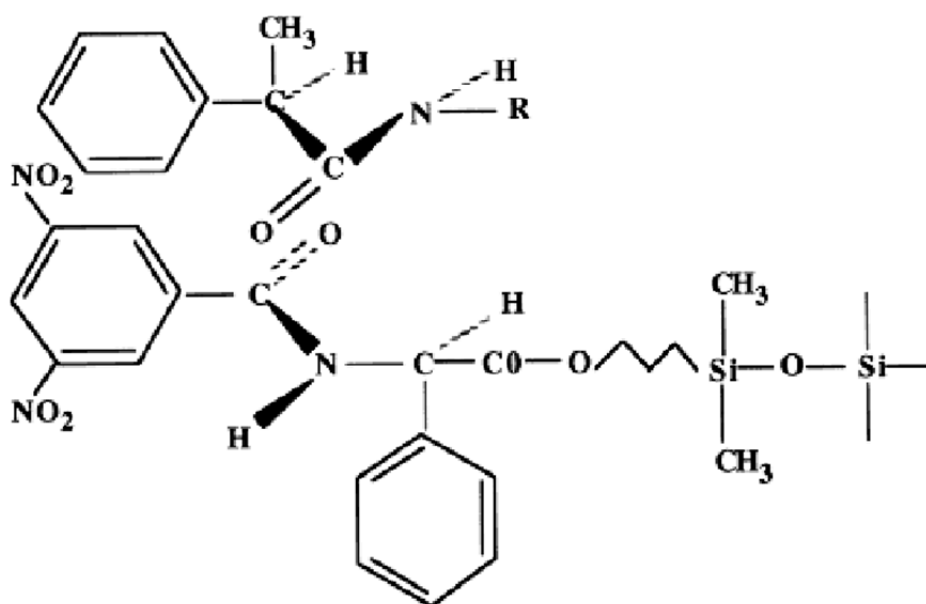


Рис. 22. Пространственное взаимодействие динитробензоилфенилглицина и 1-нафтиметиламида ибупрофена

Пространственное расположение вокруг стереогенного центра указывает на то, что одна конфигурация будет взаимодействовать сильнее, чем ее антипод. Чтобы расширить возможности фаз Пиркла, в структуру были введены полярные и поляризуемые группы. Наиболее популярными из этого типа ХНФ являются (*R,R*) Whelk-O1 и (*S,S*) Whelk-O1, структура которых приведена ниже (рис. 23).

Хиральные неподвижные фазы Whelk-O1 более универсальны и имеют более широкую область применения, чем те, которые описаны ранее. Фазы ковалентно связаны с кремнеземом, и поэтому их можно использовать почти с любым типом растворителя. Фазы Пиркла, как правило, доступны как в (*R*), так и в (*S*)-конфигурациях. ХНФ Whelk-O1 была первоначально разработана для разделения энантиомеров напроксена, но со временем стала широко применяться и для разделения эпосидов, спиртов, диолов, амидов, имидов и карбаматов. Другая, сильно полярная неподвижная фаза Пиркла, синтезированная подобным образом на основе (*R*)-фенилмочевины, показана на рисунке 24.

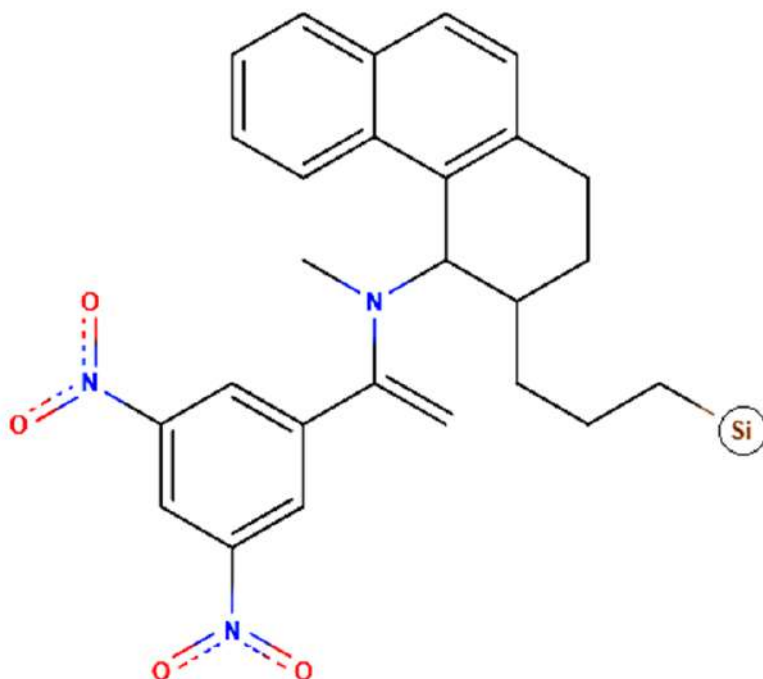


Рис. 23. ХНФ Whelk-O1 (выпускается в  $(S, S)$  и  $(R, R)$  формах)

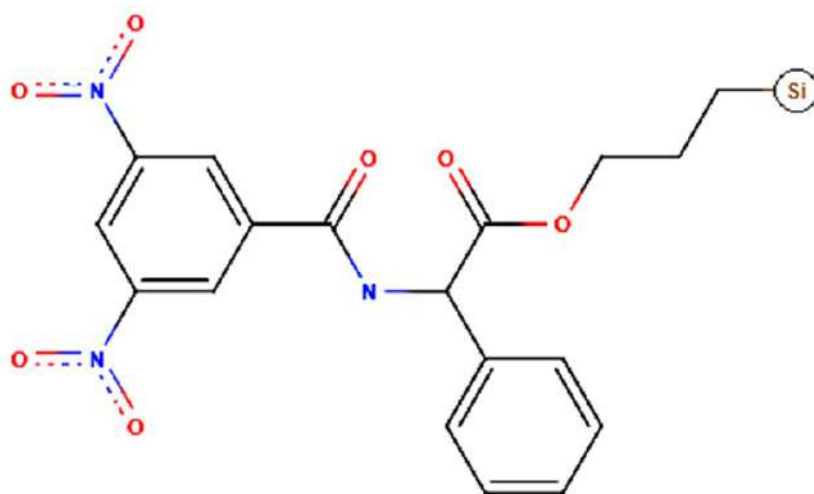


Рис. 24. Структура ХНФ на основе  $(R)$ -фенилмочевины

Хиральные неподвижные фазы на основе  $(R)$ -фенилмочевины также очень универсальна, поскольку может предлагать различные группы для взаимодействия с соседними группами хирального центра аналита. Данная НФ обеспечивает сильные полярные взаимодействия с карбонильной, амидной группами, а также нитрированным ароматическим ядром. На рисунке 25 показано разделение изомеров 2,2,2-трифтор-1-(9-антрил)этанола на НФ на основе  $(R)$ -фенилмочевины, разработанный в нормально фазовом режиме. Колонка имела длину 25 см, диаметр 4,6 мм и была заполнена частицами диоксида кремния диаметром 5 мкм, связанными с НФ. ПФ — гексан / 2-пропанол (1000/15); скорость потока 1,0 мл/мин. На рисунке 25 представлена хроматограмма. Было получено отличное разде-

ление, которое могло быть достигнуто почти исключительно путем дисперсионного взаимодействия с ароматическим кольцом и метильной группой на связанном фрагменте.

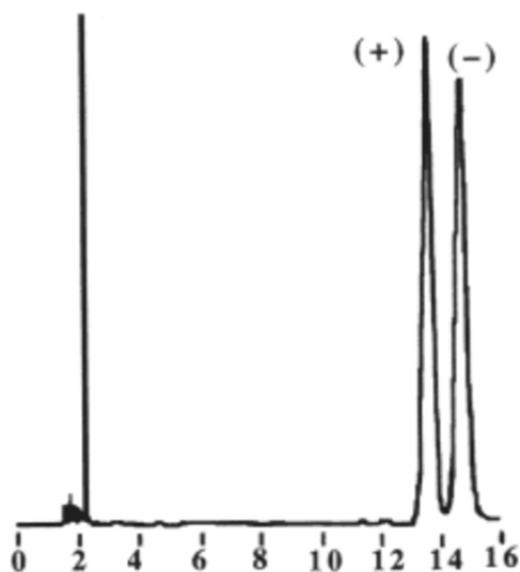


Рис. 25. Хроматограмма 2,2,2-трифтор-1-(9-антрил)этанола (получена на ХНФ на основе (R)-фенилмочевины)

#### 4.1.3. Хиральные неподвижные фазы на основе полисахаридов

Хиральные неподвижные фазы на основе полисахаридов, доступные в настоящее время, нанесены на поверхность крупнопористого силикагеля, но ковалентно с ним не связаны. Существует две большие группы ХНФ на основе полисахаридов: производные целлюлозы и производные амилозы. Основное различие между двумя типами фаз состоит в том, что макромолекула целлюлозы склонна принимать вытянутую стержневую конформацию, в то время как амилоза образует спиральную структуру. Оба полимера содержат большое количество активных хиральных центров и, таким образом, относительно высока вероятность взаимодействия хирального «узла» с анализируемым веществом. Структура целлюлозы показана на рисунке 26.

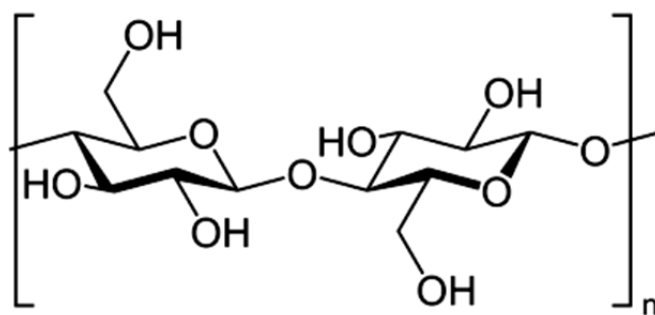


Рис. 26. Строение целлюлозы



Тип ХНФ на основе производных целлюлозы был впервые разработан Окамато<sup>15</sup>. В высокоэффективной жидкостной хроматографии обычно используются две основные группы таких сорбентов: линейка Chiralcel OD (OD, OD-H, OD-RH) и линейка Chiralcel OJ (OJ, OJ-H, OJ-RH) (структура заместителей показана на рисунке 27).

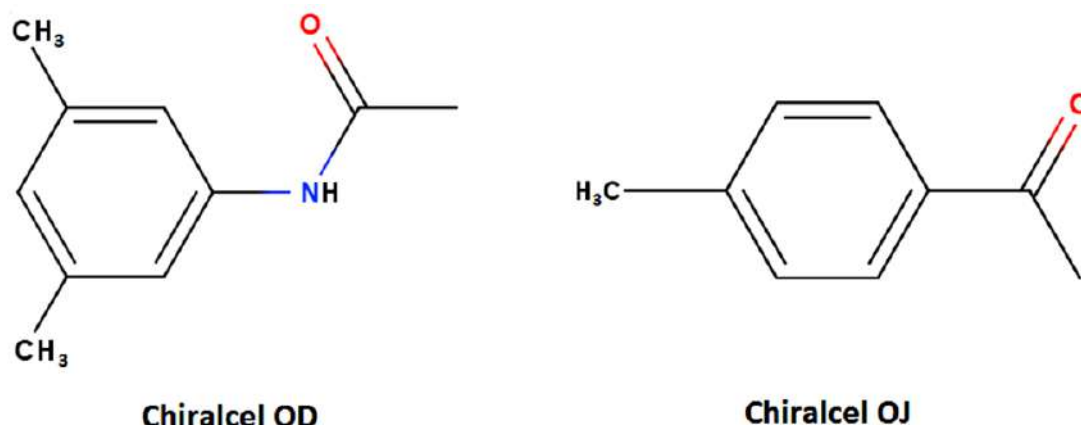


Рис. 27. Структура заместителей в производных целлюлозы, применяемых в качестве ХНФ (линейки Chiralcel OD и Chiralcel OJ)

Обе структуры, помимо полярных и дисперсионных интерактивных сайтов, содержат легко поляризуемые ароматические ядра, которые обеспечивают сильные полярные взаимодействия с любой полярной группой, соответствующим образом расположенной на молекуле удерживаемого вещества.

Структура амилозы немного отличается от структуры целлюлозы (рис. 28).

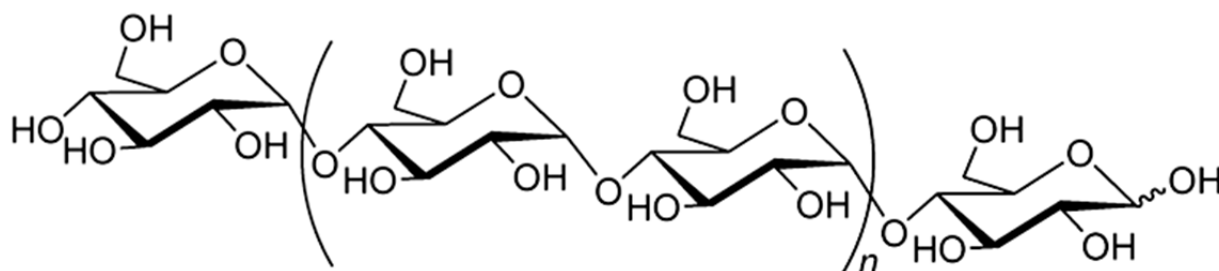


Рис. 28. Структура амилозы

Для амилозы, как и для целлюлозы, было получено производное в виде трис(3,5-диметилфенилкарбамата), но амилоза была дериватизирована трис[(*S*)- $\alpha$ -метилбензилкарбаматом]. ХНФ, основанная на этом производном, выпускается под названием Chiralcel AS. Она имеет как полярные,

<sup>15</sup> См.: Kewley A., Stephenson A., Chen L., Briggs M. E., Hasell T., Cooper A. I. Porous organic cages for gas chromatography separations // Chemistry of Materials. 2015. Vol. 27. Pp. 3207–3210.

поляризуемые и дисперсионные сайты, так и дополнительный хиральный центр, что улучшает хиральную избирательность. В связи с тем что НФ нанесена на силикагель и не связана с ним химически, ограничения накладываются на тип растворителей, линейную скорость подвижной фазы и рабочие температуры, которые могут быть использованы при анализе. Растворители, которые рекомендуются для использования в качестве ПФ, следующие: смеси гептан/спирт, которые указывают на то, что данная ХНФ используется в основном в режиме полярной фазы (доминирующие силы, используемые при удерживании и селективности, являются полярными). Для предотвращения появления «хвостов» у пиков, что происходит при наличии участков с очень высокой активностью, в ПФ добавляется небольшое количество органической кислоты (трифторуксусная кислота) или основания (триэтиламин) (обычно 0,16 %, максимум 1 %), которые могут помочь заблокировать любые активные сайты и улучшить симметрию пика. На практике было обнаружено, что трис(3,5-диметилфенилкарбамат)-производные целлюлозы и амилозы малорастворимы в условиях обращенной фазы, и, как следствие, такие НФ могут быть с осторожностью использованы в этом режиме. Пример разделений в режимах нормальной и обращенной фазы приведен на рисунке 29 (ХНФ — трис(3,5-диметилфенилкарбамат) целлюлозы).

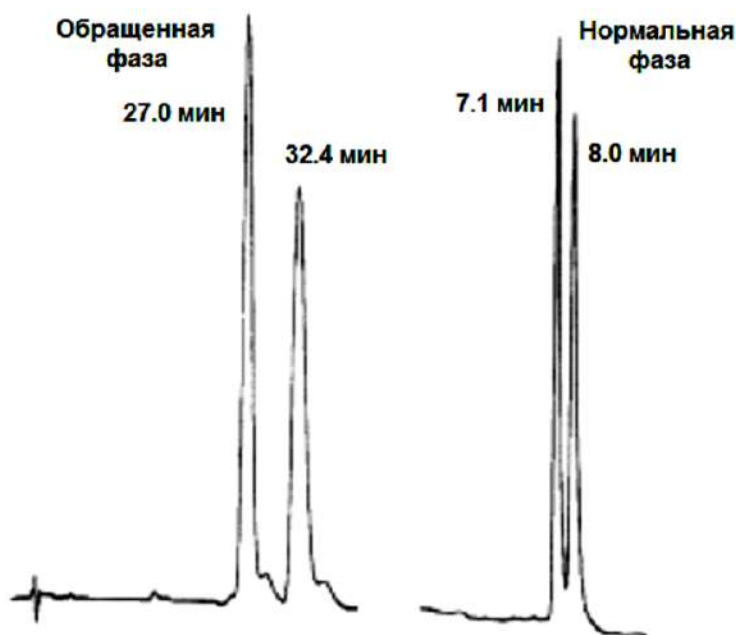


Рис. 29. Хроматограммы, полученные в режимах обращенной и нормальной фазы (ХНФ — трис(3,5-диметилфенилкарбамат) целлюлозы)

ПФ, использованной в режиме обращенной фазы, была смесь метанол/водный буфер в соотношении 65/35 (об./об.). В нормально-фазовом режиме использовалась смесь гексан/этанол в соотношении 95/5 (об./об.). Как и следовало ожидать, разделение в обращенно-фазовом режиме ( $\alpha = 1,20$ ) значительно больше, чем в нормально-фазовом режиме ( $\alpha = 1,13$ ). Это отра-

жает большую дисперсионную интерактивную способность данного типа ХНФ относительно ее полярных возможностей. Однако, следует отметить, что изменение режима разделения часто необратимо. Например, часто можно перейти от нормального режима разделения к режиму обращенной фазы, но, как правило, после изменения невозможно вернуться в нормальный режим, что связано с некоторыми морфологическими изменениями, происходящими в НФ, которые снижают ее хиральную селективность.

#### ***4.1.4. Хиральные неподвижные фазы на основе макроциклических антибиотиков***

Концепция использования макроциклических антибиотиков в качестве ХНФ была впервые представлена Д. В. Армстронгом<sup>16</sup>. Одним из способов изготовления подобных ХНФ является ковалентное связывание антибиотика (один из самых распространенных — ванкомицин, рис. 30) с поверхностью силикагеля.

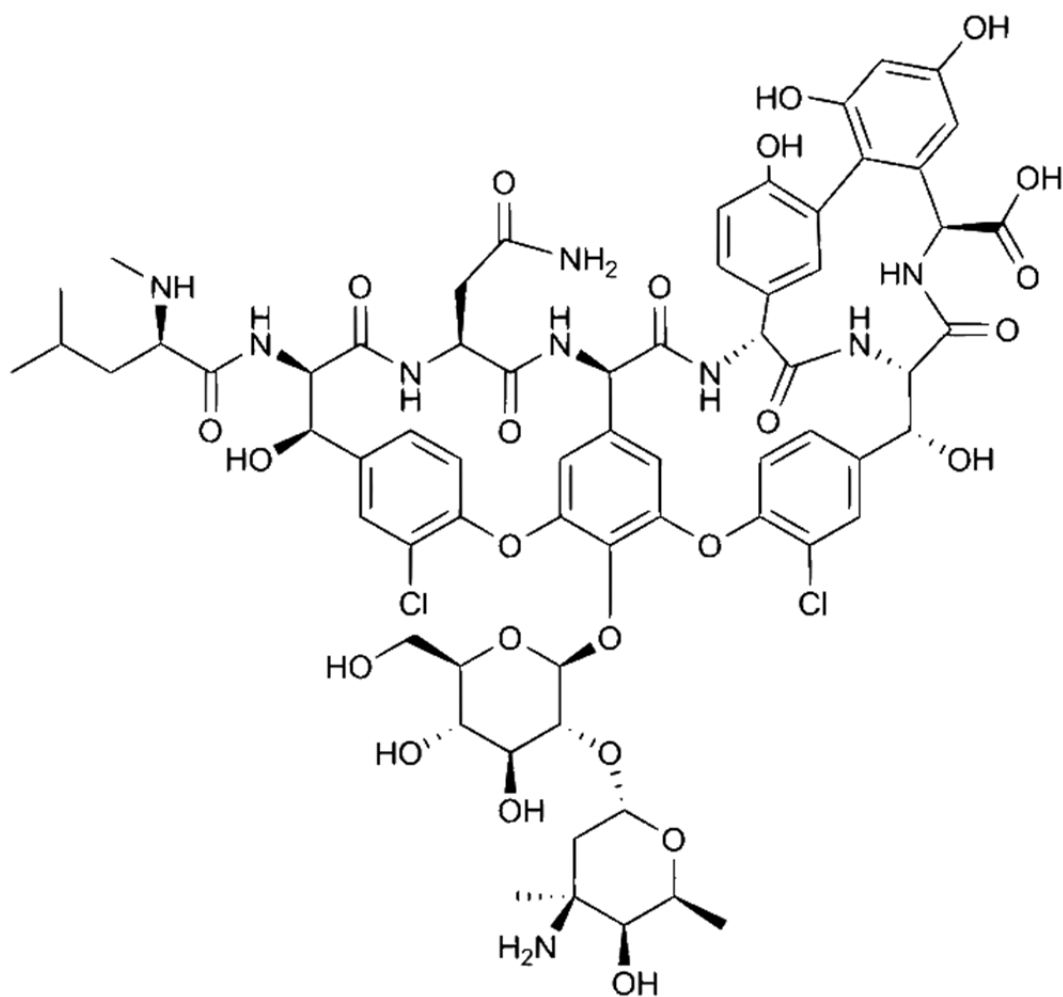


Рис. 30. Структурная формула ванкомицина

<sup>16</sup> См.: Xie S.-M., Zhang X.-H., Zhang Z.-J., Zhang M., Jia J., Yuan L.-M. A 3-D openframework material with intrinsic chiral topology used as a stationary phase in gas chromatography // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2013. Iss. 405. Pp. 3407–3412.

Ванкомицин содержит 18 хиральных центров, окружающих три «кармана», или «полости», которые соединены 5 ароматическими кольцами. Сильные полярные группы находятся вблизи кольцевых структур, что обеспечивает проявление сильных полярных взаимодействий с удерживаемыми веществами. Этот тип неподвижных фаз стабилен в ПФ, содержащих 0–100 % органического растворителя, поэтому позволяет использовать ПФ с высоким содержанием воды (режим обращенной фазы) или органического растворителя (полярно-органический режим), например, весьма эффективными являются сильно полярные смеси ТГФ — вода. В то же время малополярные смеси н-гексан — этанол также обеспечивают хорошую энантиоселективность. Ванкомицин имеет ряд ионизирующих групп, и его можно использовать в диапазоне различных значений pH (4,0–7,0). Различные буферные смеси (ацетат аммония, ацетат триэтиламмония, трифторацетат аммония) могут быть использованы с этой неподвижной фазой. Помимо контроля pH, природа выбранного буфера почти не влияет на хиральную селективность. Это подтверждается хроматограммами, показанными на рисунке 31.

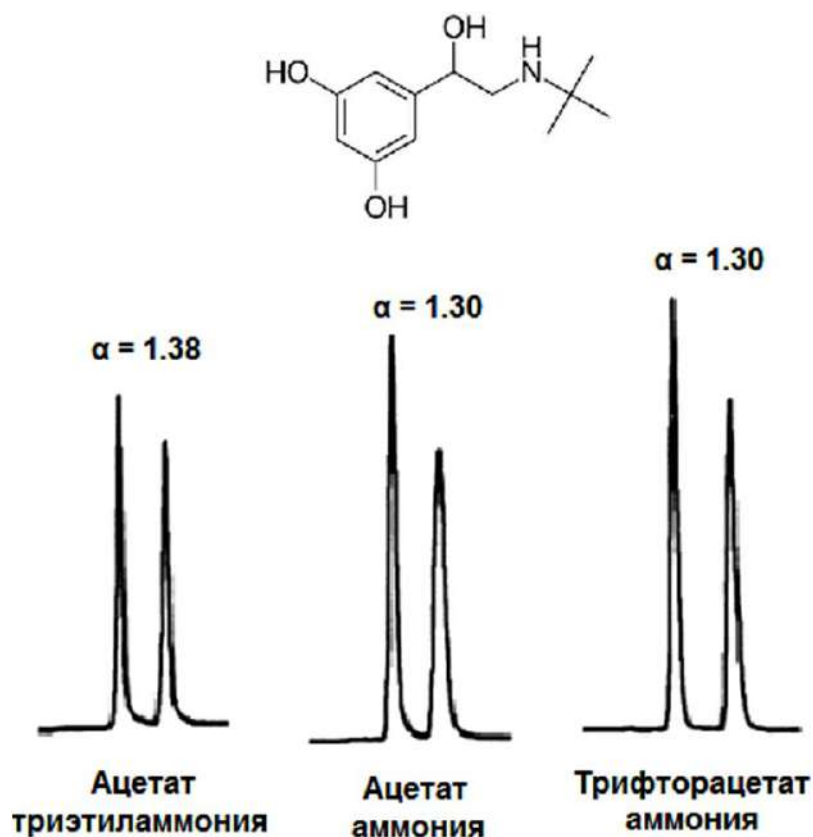


Рис. 31. Разделение энантиомеров тербуталина с использованием ПФ на основе метанола и различных буферных растворов

Одинаковая избирательность проявляется при использовании всех трех буферов, независимо от их химической природы.

Полости в структуре ванкомицина меньше, чем в циклодекстринах, следовательно взаимодействия энантиомеров с хиральным селектором слабее. Это обеспечивает более быстрый обмен разделяемого вещества между фазами и, как результат, более высокую эффективность колонки. Пример использования НФ для разделения энантиомеров 3-метил-5-фенилгидантоина показан на рисунке 32.

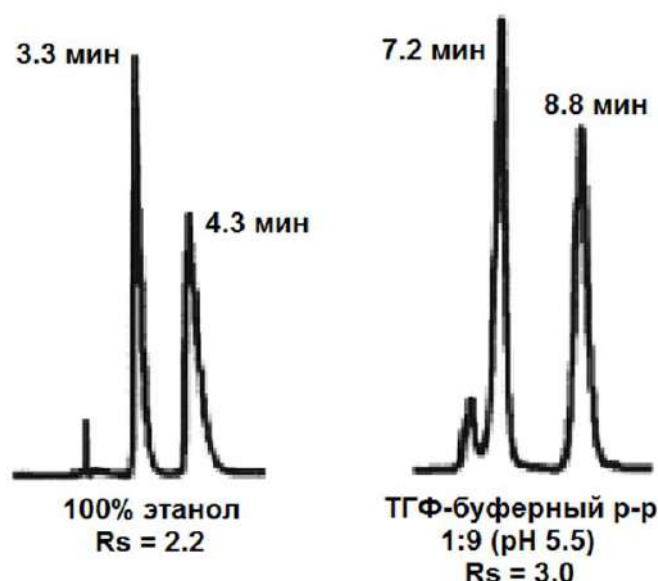


Рис. 32. Разделение энантиомеров 3-метил-5-фенилгидантоина в полярно-органическом и обращенно-фазовом режимах

В первом случае использовался чистый этанол в качестве ПФ, во втором — смесь ТГФ — буферный раствор в соотношении 1:9. Этанол обеспечивает очень сильные дисперсионные взаимодействия в ПФ, которые значительно превосходят любые дисперсионные взаимодействия, связанные с НФ. Отсюда следует, что оставшиеся доминирующие удерживающие силы будут иметь полярный или ионный характер. В случае, когда ПФ является преимущественно вода, наблюдаются очень сильные полярные взаимодействия удерживаемых энантиомеров с ХНФ при очень слабых дисперсионных взаимодействиях, поэтому удерживающие силы НФ в этом случае будут преимущественно дисперсионными по своей природе. Таким образом, регулировкой состава ПФ можно добиться эффективного разделения анализируемых веществ.

Другим макроциклическим антибиотиком, используемым в хиральной хроматографии, является амфотерный гликопептид тейкопланин, который коммерчески доступен под торговым наименованием CHIROBIOTIC T. Этот материал также связан с частицами силикагеля толщиной 5 мкм посредством множества ковалентных связей. Тейкопланин содержит 20 хиральных центров, окружающих четыре молекулярных «кармана», или «полости». Структура тейкопланина показана на рисунке 33.

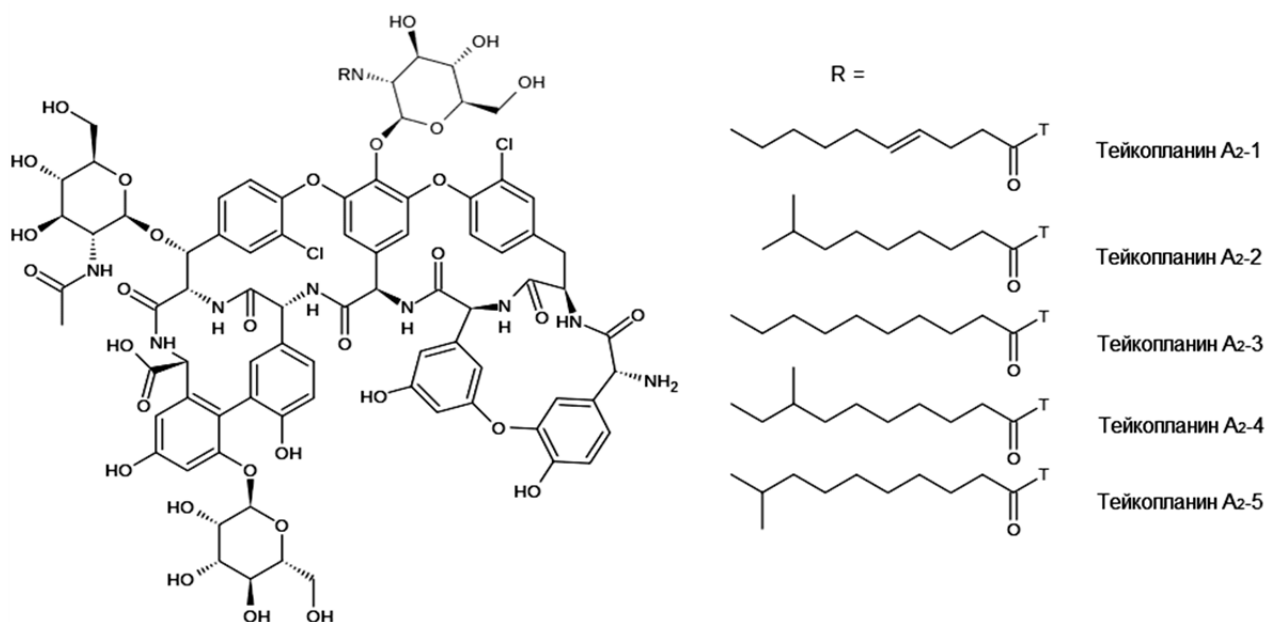


Рис. 33. Структура тейкопланина

Хиральная неподвижная фаза на основе тейкопланина дополняет фазу на основе ванкомицина и может использоваться с теми же типами ПФ. Тейкопанин применяется в режиме обращенной фазы вместе с сильно полярными смесями, такими как ацетонитрил / водный буфер 10/90 об./об., ТГФ / водный буфер 10/90 об./об., этанол/водный буфер 20/80 об./об. Он также может быть использован как полярная НФ с использованием смеси н-гексан/этанол в качестве ПФ. В некоторых случаях рекомендуется контролировать рН, даже когда растворенные вещества не являются ионными. Подходящими буферами являются нитрат аммония и ацетат триэтиламина. Одна из наиболее полезных и эффективных ПФ для использования с макроциклическими неподвижными фазами, тейкопанином, в частности, состоит из 100 частей метанола с добавлением кислоты и основания (уксусной кислоты и триэтиламина) в пределах от 1,0 до 0,1 частей (полярно-органический режим). Такая система растворителей была очень успешно использована для энантиомеров, которые содержат две группы, способные взаимодействовать с НФ. Также обнаружено, что одна из этих групп должна находиться в  $\alpha$ -положении в стереогенном центре. Лучшая концентрация кислотных и основных компонентов, по-видимому, зависит от силы взаимодействия между активными группами и НФ. График зависимости разрешения энантиомеров пропанола и кислотно-основного состава смеси показан на рисунке 34.

У подвижной фазы на основе тейкопланина есть несколько преимуществ: система проста и универсальна, используются относительно недорогие, нетоксичные растворители. Хроматограммы пропанола, полученные при разных концентрациях кислотно-основной смеси, представлены на рисунке 35.

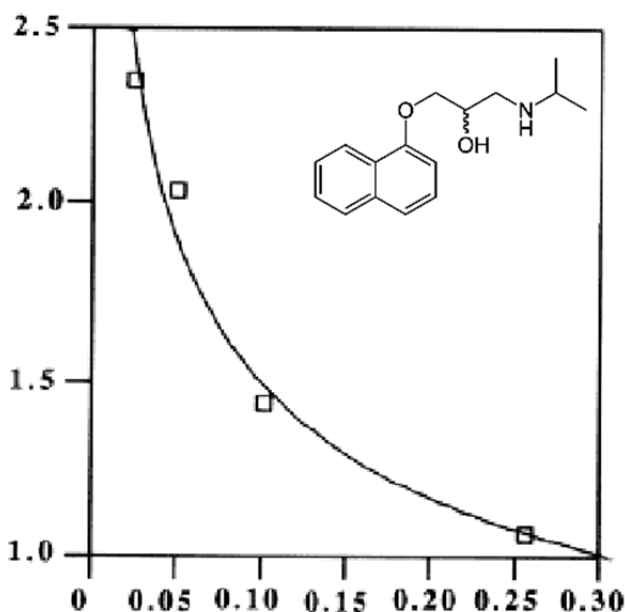


Рис. 34. Зависимость разрешения энантимеров пропанолаола от концентрации кислотно-основной смеси (смесь 1:1)

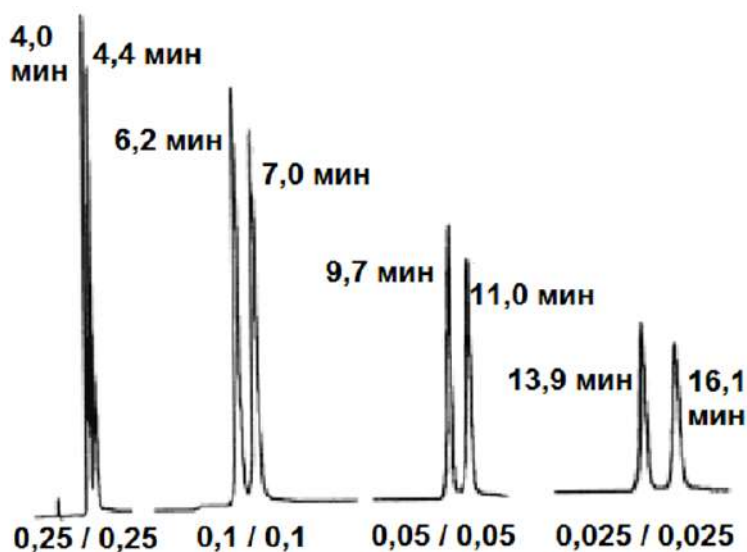


Рис. 35. Хроматограммы пропанолаола, полученные при разных концентрациях кислотно-основной смеси в метаноле

Разделение проводилось на колонке CHIROBIOTIC T длиной 25 см, диаметром 4,6 мм. ПФ был метанол, содержащий уксусную кислоту и триэтиламин в концентрациях, указанных на рисунке. Колонка работала при комнатной температуре и скорости потока 2 мл/мин.

Тейкопланин стабилен при значениях рН от 3,8 до 6,5, хотя его можно использовать в течение ограниченных периодов времени и вне этого диапазона. Подобно ванкомицину, тейкопланин применяется в обращенно-фазовом режиме, при котором удерживание и селективность в значительной степени зависят от дисперсионных (гидрофобных) взаимодействий между растворенным веществом и НФ. Пример использования тейкопланина в обращенно-фазовом режиме показан на рисунке 36.



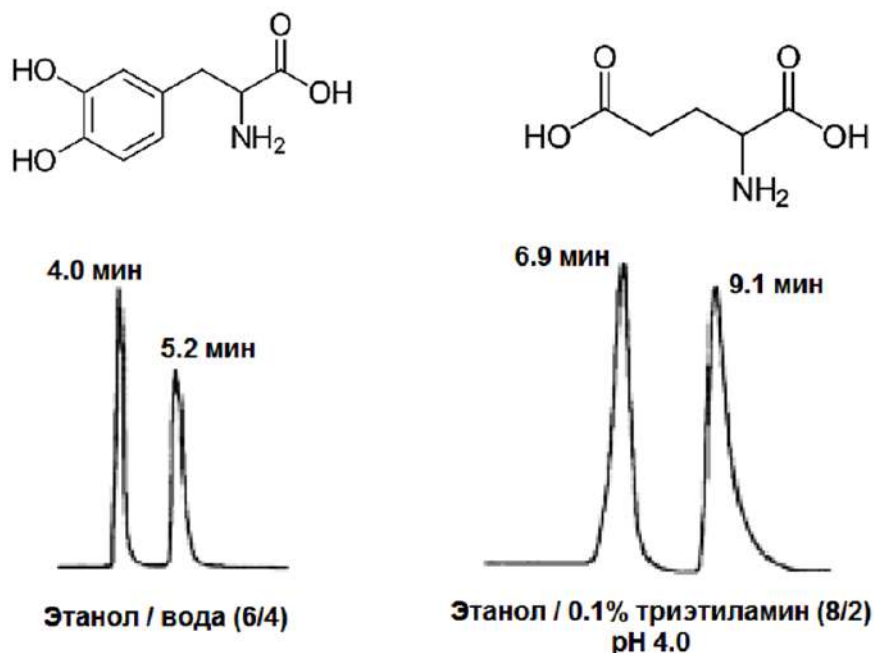


Рис. 36. Примеры использования тейкопланина в обращенно-фазовом режиме

Неподвижная фаза на основе тейкопланина имеет не слишком высокую молекулярную массу (1185 Da), но все же содержит 20 хиральных центров, что обеспечивает относительно высокую вероятность взаимодействия аналита с хиральным центром. Кроме того, ближайшие к хиральным центрам дисперсионные группы обеспечивают сильный энтальпийный вклад в дифференциальную стандартную свободную энергию распределения между двумя энантиомерами. Данную НФ также можно применять в полярном режиме, используя сильно диспергирующую ПФ, например смеси гексан/этанол. Присутствие сильно диспергирующего углеводорода полностью угнетает, любые возможные конкурирующие дисперсионные взаимодействия с НФ и, как следствие, растворенные вещества удерживаются почти исключительно полярными и/или (когда это возможно) ионными взаимодействиями. Два примера использования тейкопланина в полярном режиме показаны на рисунке 37.

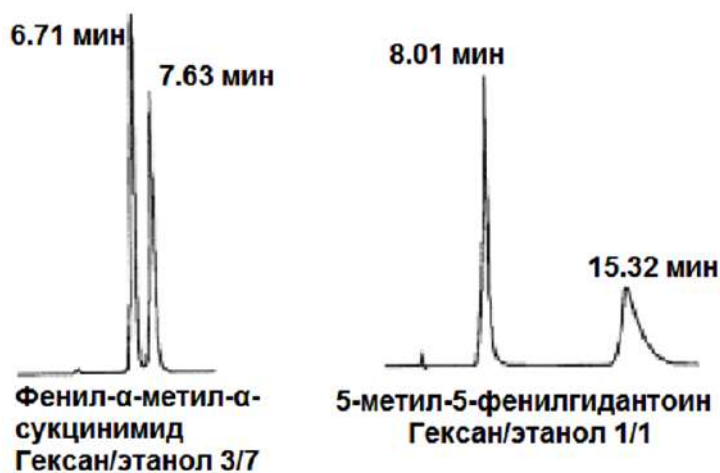


Рис. 37. Использование тейкопланина в полярном режиме



А. Берто с группой исследователей<sup>17</sup> продемонстрировал, что ХПФ тейкопланина может быть использована для разделения очень широкого спектра недериватизированных аминокислот и иминокислот. Они сообщили о разделении 54 соединений, включая все протеиногенные аминокислоты. Водные растворители были использованы в качестве ПФ, буферные системы не использовались. Эта работа над аминокислотами была дополнена работами Питера У. Карра, который разделил больше чем 30 неприродных аминокислот, таких как аналоги фенилаланина и тирозина и структуры, содержащие 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин, тетралин, 1,2,3,4-тетрагидро-2-карболин, циклопентан, циклогексан, циклогексен, бицикло[2,2,1]гептан и гептановые фрагменты. На данный момент тейкоплантин является лучшим хиральным селектором для разделения аминокислотных изомеров.

Другой макролитический гликопептид, который был введен сравнительно недавно и использовался в качестве ХНФ, это гликопептид авопарцин (рис. 38).

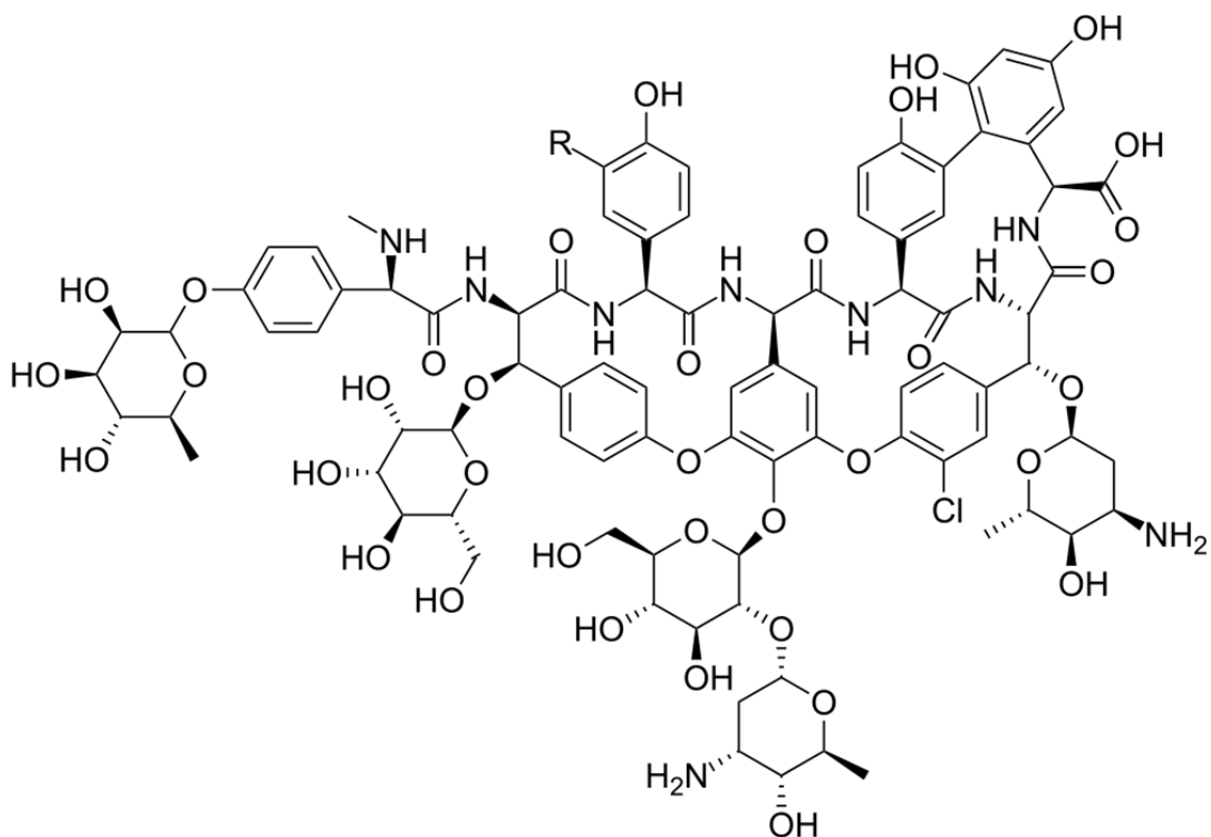


Рис. 38. Структура авопарцина (R=H — а-авопарцин; R=Cl — б-авопарцин)

Неподвижная фаза на основе авопарцина коммерчески доступна под торговым названием CHIROBIOTIC A. Агликоновая часть авопарцина содержит три соединенных полужестких макроциклических кольца (одно

<sup>17</sup> См.: Kuppler R. J., Timmons D. J., Fang Q.-R., Li J.-R., Makal T. A., Young M. D., Yuan D., Zhao D., Zhuang W., Zhou H.-C. Potential applications of metal-organic frameworks // Coordination Chemistry Reviews. 2009. Iss. 253. Pp. 3042–3066.

12-членное и два 16-членных), которые образуют карман, обеспечивающий возможное включение растворенного вещества. Гликопептид содержит семь ароматических колец с четырьмя фенольными группами, четыре углеводные цепи, 16 гидроксильных групп, одну карбоксильную, две первичных аминогруппы, одну вторичную, шесть амидных связей, два атома хлора для б-авопарцина (только один для а-авопарцина) и 32 стереогенных центра. Такая структура обеспечивает большое разнообразие интерактивных возможностей, от слабых и сильных дисперсионных, до полярных взаимодействий, которые охватывают типы от индуцированного дипольного через диполь-дипольное взаимодействие до сильной водородной связи. Помимо этого, возможно проявление ионных взаимодействий. Еще более важно, что с 32 стереогенными центрами вероятность взаимодействия между хиральными центрами аналита и НФ относительно велика. Этот макроциклический антибиотик не был коммерчески доступным в течение длительного времени, поэтому диапазон применения и особые преимущества пока не установлены. Тем не менее, он имеет все необходимые свойства эффективной ХНФ.

#### 4.1.5. Хиральные неподвижные фазы на основе циклодекстринов

Три основных циклодекстрина (см. рис. 15) и их производные, связанные с силикагелем, применяются в ЖХ. Одна или две первичные гидроксильные группы используются для связывания циклодекстрина с диоксидом кремния. Вторичные гидроксильные группы могут быть селективно дериватизированы. Были синтезированы различные производные циклодекстринов, чтобы обеспечить конкретные типы взаимодействия для повышения их хиральной селективности. Данные рентгеноструктурного анализа показали, что структуры  $\beta$  и  $\gamma$  довольно жесткие, тогда как  $\alpha$ -структура проявляет некоторую гибкость. Включение растворенного вещества в структуру циклодекстрина изображено на рисунке 39. Пространственное различие между изомерами может привести к некоторой интерактивной избирательности.

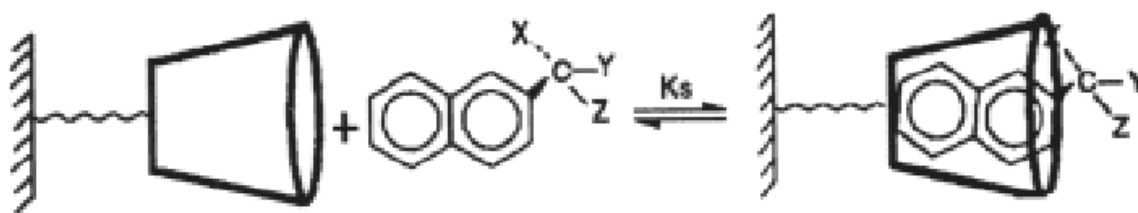


Рис. 39. Включение растворенного вещества в полость циклодекстрина

Существует два основных интерактивных процесса, с помощью которых циклодекстрины могут удерживать растворенные вещества и разделять энантиомеры. Первый процесс подразумевает молекулярное взаимодействие после включения молекулы аналита в полость циклодекстрина. В этом случае должен быть выбран ее надлежащий внутренний диаметр для достижения желаемой селективности. Другой процесс представляет собой обычное взаимодействие растворенного вещества на поверхности НФ. Если молекулы энантиомера относительно малы и включение есть, то все три типа циклодекстринов должны рассматриваться в качестве НФ. Если молекулы энантиомера являются большими (например, от 3 до 5 ароматических колец), и их включение в  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы невозможно, тогда нужно рассматривать только  $\gamma$ -циклодекстрин. Вместе с тем включение может быть запрещено по типам интерактивных групп, которые находятся на самой молекуле растворенного вещества. В общем, если молекула аналита содержит в дисперсионных группах галогены, сульфогруппы, фосфогруппы, включение может быть легко осуществлено. Напротив, молекулы, которые несут амино-, карбонильные или карбоксильные группы, нелегко вводить в полость циклодекстрина. Имеются доказательства, в том числе ЯМР-исследования, подтверждающие концепцию включения растворенного вещества в полость циклодекстрина во время хроматографического развития<sup>18</sup>.

Циклодекстрины могут переносить относительно высокие концентрации буфера и стабильны от pH 3 до pH 14. Однако устойчивость матрицы ограничивается диапазоном pH от 3,0 до 7,0, так как кремнезем растворим при pH 8,0 и выше.

Разделение энантиомеров довольно сложной молекулы показано на рисунке 40. Разделение было достигнуто на  $\beta$ -циклодекстрине, который содержал гидроксипропиловую эфирную группу, присоединенную к полости в двух положениях. Возможное и рациональное объяснение достигнутой хиральной селективности предлагается на рисунке 40. Однако важно понимать, что предлагаемый интерактивный механизм не был доказан, хотя объяснение выглядит вполне правдоподобно. Как и в случае других ХНФ, дисперсионные взаимодействия со структурой циклодекстрина контролируются полярными растворителями, полярные взаимодействия — диспергирующими растворителями, при этом значение pH и тип используемого буфера также влияет на эффективность процесса разделения.

Даже небольшие изменения pH могут быть весьма критичными, а влияние типа буфера на хиральную селективность при определенных обстоятельствах — довольно глубокое. Пример влияния pH и типа буфера изображен на рисунке 41.

---

<sup>18</sup> См.: Qiu H., Padivitage N. L., Frink L. A., Armstrong D. W. Enantiomeric impurities in chiral catalysts, auxiliaries, and synthons used in enantioselective syntheses // *Tetrahedron: Asymmetry*. 2013. Vol. 24. Pp. 1134–1141.

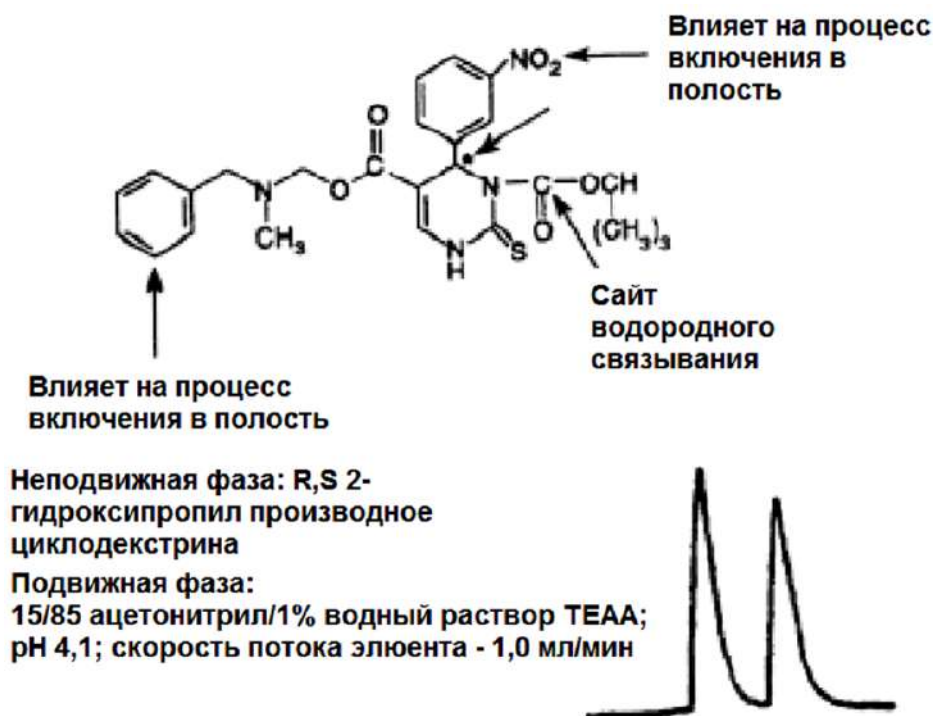


Рис. 40. Пример разделения энантимеров «сложной» молекулы

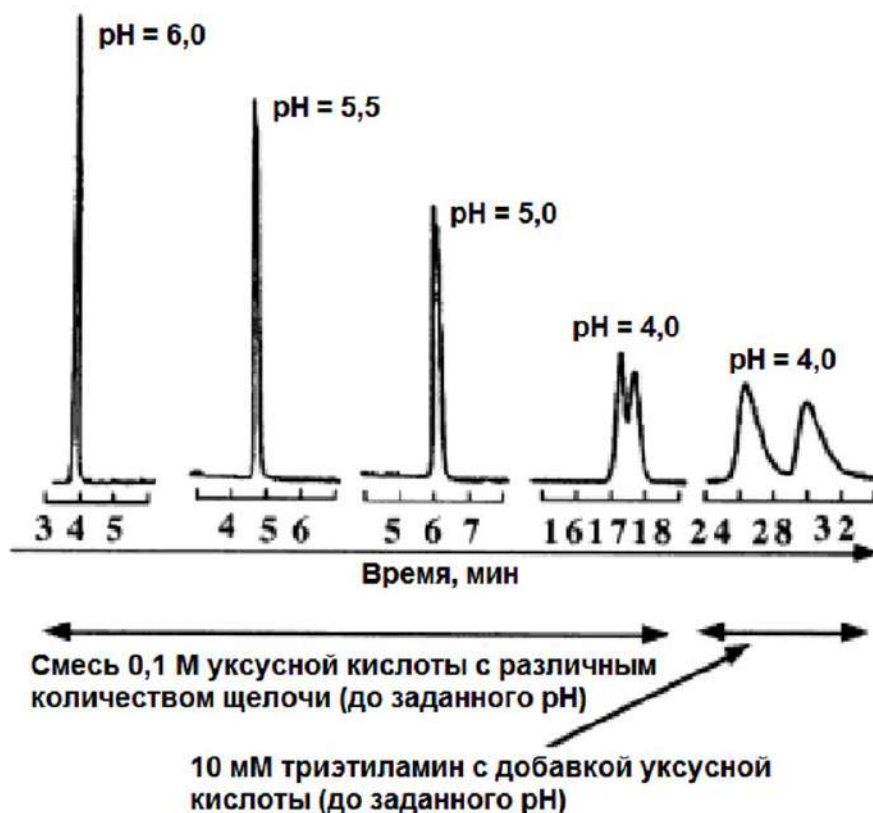


Рис. 41. Пример влияния рН и типа буфера на разделение

Энантиомерная пара представляла собой Dansyl D,L-фенилаланин, разделенный на циклодекстрине при скорости потока 1,5 мл/мин, буферный раствор — уксусная кислота/гидроксид натрия.

Еще один пример влияния различной концентрации буфера на хиральную селективность показан на рисунке 42.

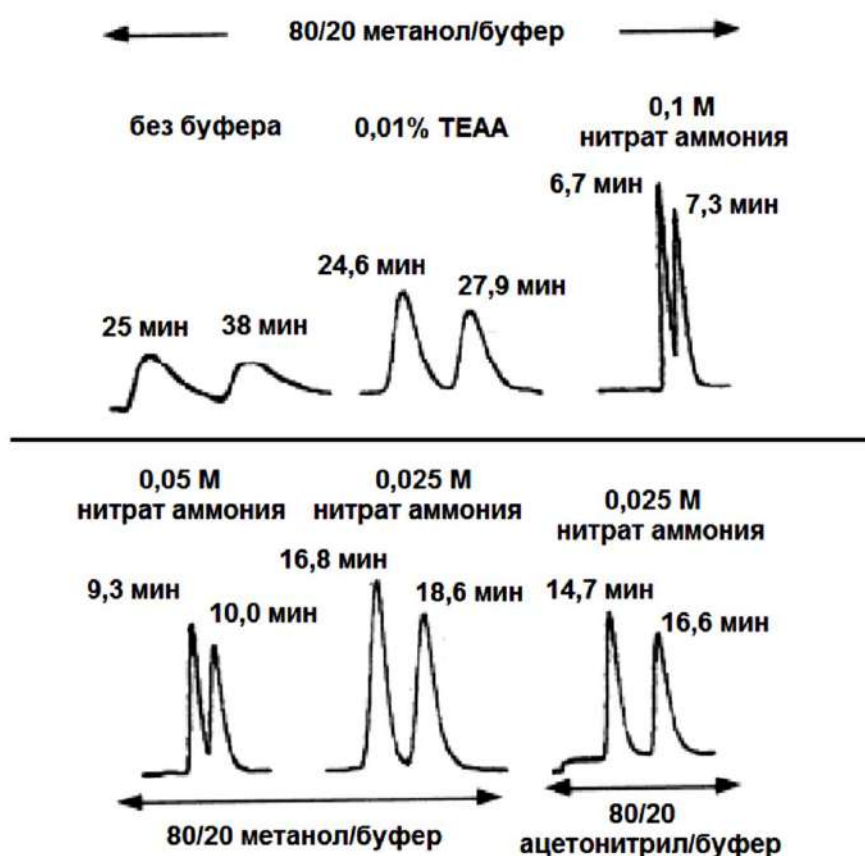


Рис. 42. Влияние различной концентрации буфера на хиральную селективность

Проводилось разделение тех же энантиомеров, что и на рисунке 41, но использовались буферные растворы с разной концентрацией нитрата аммония. Хотя хорошая селективность достигается в присутствии очень низких концентраций нитрата аммония, в отсутствие буфера пики очень широкие, а время анализа длительное. При относительно высокой концентрации нитрата аммония (0,1 М) разделение происходит намного быстрее (кинетика распределения намного быстрее), но по большей части хиральная избирательность теряется. При промежуточной концентрации 0,025 М кинетика остается достаточно быстрой, селективность сохраняется и, таким образом, энантиомеры хорошо разделяются. Интересно отметить, что, если концентрация буфера поддерживается постоянной, а органический растворитель изменяется на ацетонитрил, разрешение мало меняется. Как и с другими типами НФ, используемыми в ЖХ, важна экспериментальная работа, направленная на оптимизацию условий деления. Нужно подобрать оптимальные НФ и растворитель, должны быть определены концентрации растворителя, буфера, а также рН. Если образец, который нужно разделить, является уникальным, то необходимо провести довольно трудоемкий эксперимент.

## Вопросы и задания

1. В чем состоит принципиальное различие между хиральной ГХ и хиральной ЖХ?
2. Какие дополнительные факторы влияют на изменение удерживания и селективности в ЖХ по сравнению с ГХ?
3. Перечислите основные отличия ЖХ от ГХ.
4. Перечислите основные типы ХНФ в ЖХ.
5. В чем сущность разделения энантиомеров на белковых ХНФ?
6. Какие параметры ПФ влияют на селективность разделения энантиомеров на белковых ХНФ? Приведите примеры.
7. В чем сущность разделения энантиомеров на ХНФ Пиркловского типа?
8. Опишите ХНФ на основе полисахаридов.
9. Какой прием используется для предотвращения появления «хвостов» у хроматографических пиков?
10. Опишите сущность ХНФ на основе макроциклических антибиотиков. Укажите особенности строения ванкомицина, тейкопланина и авопарцина.
11. Расскажите о применении ХНФ на основе циклодекстринов в ЖХ.
12. Каково влияние концентрации буфера на хиральную селективность?

### РАБОТА С ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫМ ЖИДКОСТНЫМ ХРОМАТОГРАФОМ

#### *1. Описание высокоэффективного жидкостного хроматографа «Стайер»*

Высокоэффективные жидкостные хроматографы «Стайер» (рис. 43) предназначены для качественного и количественного анализа содержания широкого спектра неорганических и органических веществ в различных объектах. Хроматографы предназначены для оснащения испытательных лабораторий, осуществляющих контроль безопасности и качества продукции и сырья, контроль и мониторинг объектов окружающей среды. Хроматографы используются на предприятиях различных отраслей промышленности, в экспертных и научно-исследовательских лабораториях. К работе с хроматографом допускается обслуживающий персонал, имеющий среднее специальное или высшее образование, изучивший техническую документацию, правила работы с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, правила обеспечения электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019 и правила по организации безопасности труда по ГОСТ 12.0.004.



Рис. 43. Внешний вид изократического жидкостного хроматографа «Стайер»

## **2. Устройство и принцип работы высокоэффективного жидкостного хроматографа «Стайер»**

Принцип работы хроматографа основан на разделении анализируемой пробы в хроматографической колонке в изократическом или градиентном режимах элюирования и последующем измерении содержания компонентов пробы спектрофотометрическим, кондуктометрическим, флуориметрическим, рефрактометрическим, амперометрическим и низкотемпературным испарительным детектором светорассеяния.

В конструкцию хроматографа входят:

- детектор (один либо несколько);
- насос высокого давления (один либо несколько);
- система ввода образца;
- элементы разделения (защитная колонка, одна либо несколько аналитических колонок, система сбора, обработки и хранения хроматографических данных).

В состав хроматографа могут входить также дополнительные устройства:

- термостат колонок;
- дегазатор;
- система постколоночной дериватизации;
- подавитель фоновой электропроводности элюента;
- система экономии растворителя;
- система концентрирования образца.

Хроматограф может быть подключен к персональному компьютеру (ПК) по интерфейсу RS-232. Управление режимами хроматографа и обработка данных осуществляются с ПК при помощи соответствующего программного обеспечения (ПО), например программно-аппаратного комплекса «МультиХром» (далее — МультиХром) и ряда других. Детекторы хроматографов имеют также аналоговые выходы на самописец или интегратор для сбора и регистрации хроматографических данных. Для предприятий атомной и тепловой энергетики выпускается хроматограф ионный «Стайер-А», предназначенный для определения микроколичеств ионов в водных средах и позволяющий выполнять измерения как при прямом вводе образца, так и с предварительным онлайн-концентрированием.

Хроматограф изократический «Стайер» представляет собой модульную хроматографическую систему с одним или несколькими последовательно установленными детекторами и предназначен для анализа широкого спектра органических веществ в изократическом режиме элюирования. Возможна аналитическая комплектация хроматографа с суммарным диапазоном расходов 0,01–9,99 см<sup>3</sup>/мин, препаративная комплектация 0,04–39,96 см<sup>3</sup>/мин, а также микромасштабная 0,005–4,995 см<sup>3</sup>/мин. Хроматограф может поставляться как в стальном (SS316), так и полимерном (PEEK) исполнении. Управление модулями хроматографа осуществляет-



ся с клавиатур модулей, а сбор, обработка и хранение хроматографических данных — с помощью ПК с соответствующим программным обеспечением. Гидравлическая схема изократического хроматографа «Стайер» представлена на рисунке 44.



Рис. 44. Гидравлическая схема изократического хроматографа «Стайер»

\* Дегазатор DG 18 не является обязательным элементом хроматографа, однако позволяет улучшить стабильность работы устройства в целом.

\*\* Хроматограф может комплектоваться как ручной системой ввода образца, например инжектором “Rheodyne 7725i”, так и автоматической системой — автосамплером, например “Basic Stayer”.

\*\*\* Термостат колонок не является обязательным элементом изократического хроматографа. Наличие термостата позволяет повысить стабильность времен удерживания компонентов и реализовать методики, требующие нагрева колонок.

\*\*\*\* Колонка аналитическая выбирается в соответствии с методиками, которые предполагается реализовать на хроматографе. Для увеличения рабочего ресурса колонка комплектуется защитными колонками (предколонками) и держателем для них.

\*\*\*\*\* Хроматограф обычно комплектуется одним детектором. Для расширения области охватываемых хроматографом методик в комплектацию может быть добавлен другой детектор (детекторы). В любом случае этот детектор (детекторы) устанавливается последовательно.

### 3. Включение хроматографа

Включение хроматографа осуществляется путем последовательного включения всех модулей или включения общего выключателя на сетевом фильтре. После включения модулей следует включить компьютер, запустить и настроить программное обеспечение в соответствии с Руководством Пользователя. Далее проводится заполнение гидравлических линий хроматографа. После заполнения насоса/насосов устанавливается суммарный расход в соответствии с методикой выполнения измерений или паспортом на колонку.

Ниже перечислены основные критерии выхода хроматографа на режим:

- полное отсутствие или низкий дрейф базовой линии;
- отсутствие случайных пиков;
- стабильное давление, без резких провалов и скачков на 5 и более бар.

После того как хроматограф удовлетворит критериям выхода на режим, он готов к работе. Если колонка новая, то ее следует промыть объемом ПФ, равным нескольким десяткам ее «мертвых» объемов.

#### ***4. Получение хроматограммы***

*Подготовка образца.* Если образец содержит механические примеси, перед вводом в инжектор хроматографа его следует отфильтровать через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 или 0,45 мкм.

*Загрузка и инъекция образца.* Переключите инжектор в положение «ЗАГРУЗКА» (LOAD). Для загрузки образца в инжектор выберите шприц, объем которого превышает объем петлевого дозатора (петли) не менее чем в три раза. Промойте шприц тем же растворителем, в котором растворен образец. Затем промойте петлю инжектора. Промойте шприц раствором образца, избегая образования воздушных пузырей. Введите образец в петлю. Затем поверните ручку инжектора из положения «ЗАГРУЗКА» (LOAD) в положение «ВВОД» (INJECT), при этом одновременно начнется сбор хроматографических данных (произойдет старт хроматограммы).

*Окончание хроматограммы.* По истечении времени, указанного в настройках хроматограммы, сбор данных прекратится, а хроматограмма сохранится в памяти компьютера. Для получения результатов необходимо провести следующие процедуры:

- разметка хроматограммы (результатом этой процедуры является выделение пиков на хроматограмме);
- идентификация пиков (происходит качественная идентификация пиков и присвоение им имен из таблицы компонентов);
- вычисление концентрации идентифицированных веществ в соответствии с ранее полученной градуировкой;
- генерация отчета с указанием концентраций и/или другой вспомогательной информации по идентифицированным пикам.

#### ***5. Завершение работы***

После завершения последней хроматограммы следует остановить поток подвижной фазы, выключить нагрев термостата колонок и погасить лампу спектрофотометрического детектора. После того как давление в гидравлической линии упадет, следует выключить модули. Для этого можно использовать и общий выключатель, расположенный на сетевом фильтре. В конце следует выключить компьютер.

# ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

### *1. Кондиционирование лаборатории*

В лаборатории, где находится жидкостной хроматограф, не должно быть резких колебаний температуры. Это может стать причиной изменения удерживания, селективности разделения и эффективности. В теплое время года в помещениях, не оснащенных кондиционерами, значительно затрудняется работа с нормально-фазовыми легкокипящими ПФ из-за их постепенного испарения в течение дня, что приводит к изменению соотношения компонентов в составе элюента. При пониженных температурах обнаруживаются затруднения в работе с элюентами, содержащими воду и/или спирты из-за того, что при понижении температуры их вязкость значительно увеличивается. Это может привести к значительному повышению давления в системе. Влияние небольших температурных колебаний можно снизить путем применения термостата на колонке.

### *2. Качество электропитания*

Большинство современных хроматографов оснащено системами стабилизации питания. Несмотря на это, качество электропитания на месте также должно быть высоким. Если качество низкое, то может произойти сбой в работе хроматографа в автоматическом режиме.

### *3. Чистота растворителей*

Приготовление элюентов требует использования особо чистых растворителей. В общем случае предъявляемые к чистоте элюэнта требования зависят от метода элюирования (изократического или градиентного), способа детектирования, чувствительности детектора, а также концентрации анализируемой смеси. В случае УФ-детектирования требования к чистоте элюента повышаются при работе в коротковолновом диапазоне (меньше 230–240 нм). При изократическом элюировании с УФ-детектированием на длинах волн больше 220–240 нм необходимо использовать растворители марки «ос. ч.» и дистиллированную воду. Все реагенты, растворяемые в ПФ, также должны быть достаточно чистыми. При градиентном элюировании необходимо использовать растворители марки «для жидкостной хроматографии» (“for liquid chromatography”) и воду-бидистиллят. При градиентном элюировании (в обращенно-фазовой хроматографии) повышенные требования предъявляются к чистоте водного буфера и воды по причине того, что на начальной стадии элюиро-

вания адсорбент поглощает из ПФ, обогащенной водным буфером, загрязняющие компоненты, которые в дальнейшем элюируются и сильно затрудняют отнесение полезных сигналов анализируемых веществ. Наиболее чистые растворители необходимо применять для проведения групповых определений следовых количеств веществ в режиме градиентного элюирования. Во время проведения работы в градиентном режиме элюирования, а также прецизионных определений в изократическом режиме ПФ может использоваться лишь однократно. При изократическом элюировании, если отсутствуют какие-либо проблемы с чувствительностью, возможно повторное использование отработанного элюента. Система с элюатом, поступающим после прохождения через детектор обратно в емкость с подвижной фазой, носит название «система с рециклом». Она оказывается весьма полезной в случае проведения большого количества рутинных изократических определений на стандартных колонках (250x4.6, 150x4.6) при объемной скорости порядка 1 мл/мин. В таком случае экономится до 300 мл элюента в день.

#### ***4. Дегазация растворителей***

Растворители, используемые в ЖХ для приготовления ПФ, обычно содержат растворенный воздух. При работе с недегазированными элюентами пузырьки воздуха могут проникнуть в различные узлы жидкостной системы: насос, колонку, капилляры, детектор. На хроматограмме появляются высокие периодические шумы, вызванные колебанием давления в системе, что является причиной резкого уменьшения чувствительности. Для удаления воздуха из элюента проводят дегазацию последнего. Как правило, дегазируют только элюенты для обращенно-фазовой ЖХ, так как водно-органические смеси несут наибольшее количество растворенного воздуха. При градиентном элюировании, а также в случае использования флуориметрического детектирования дегазация должна производиться особенно тщательно. Смешивание двух водно-органических смесей различного состава в ходе градиентного элюирования в обращенно-фазовом режиме приводит к интенсивному выделению пузырьков растворенного воздуха. Чувствительность флуориметрического детектирования также уменьшается при высоком содержании растворенного воздуха в подвижной фазе (происходит тушение флуоресценции). Существует три основных способа дегазации подвижных фаз для ЖХ:

- дегазация вакуумом;
- термическая дегазация;
- ультразвуковая дегазация.

#### ***5. Фильтрация подвижной фазы***

Для обеспечения бесперебойной работы насоса ПФ рекомендуется фильтровать с применением мембранного фильтра под вакуумом.

## ***6. Промывка колонки и узлов жидкостной системы***

После работы с водно-органическими ПФ, содержащими соли и кислоты, всю жидкостную систему (включая колонку) необходимо промыть дистиллированной водой с добавлением 5–10 % органического растворителя. Это необходимо для того, чтобы НФ, а также узлы жидкостной системы хроматографа в нерабочее время дополнительно не изнашивались. Непроведение этой процедуры может привести к тому, что после остановки насоса на его деталях и стенках кюветы детектора из элюента осаждаются соли. Это может стать причиной преждевременной поломки движущихся частей насоса. Регулярное отсутствие промывки системы от содержащих соли и кислоты элюентов может привести к сокращению срока службы НФ. Добавление к промывочной воде небольшого количества органического растворителя требуется для исключения биологического загрязнения жидкостной системы.

## ***7. Переход на новую ПФ, которая не смешивается с предыдущей***

Такой переход осуществляется через промежуточный растворитель, неограниченно смешивающийся с обеими ПФ. Как правило, для этого используется ацетон или 2-пропанол. Для перехода с водного элюента на неполярный элюент жидкостную систему следует промыть водой с добавкой органического растворителя, затем снять хроматографическую колонку, промыть систему изопропанолом (ацетоном), промыть систему неполярным элюентом, установить новую колонку. В случае обратного перехода необходимо снять хроматографическую колонку, промыть жидкостную систему изопропанолом (ацетоном), затем водным элюентом, затем установить новую колонку. При переходе от водного элюента к неполярному следует заранее убедиться, что материал уплотнений насоса рассчитан на работу с неполярными растворителями.

## ***8. Фильтрация пробы***

Если анализируемая проба содержит нерастворенную взвесь, то ее необходимо отфильтровывать. Для этого используют мембранный фильтр, соединенный со шприцем. При регулярном анализе проб, содержащих взвеси, входной фильтр на колонке (фрит) может засориться, что становится причиной повышения давления в системе. В таком случае входной фильтр необходимо заменить либо промыть в органическом растворителе с обработкой ультразвуком в течение 10–15 мин. Наиболее оптимальным решением проблемы является применение фильтра перед колонкой. Этот фильтр содержит сменный фрит — такой же, как и на колонке. Замена фрита на фильтре является рутинной операцией, которая проводится достаточно часто.

## ***9. Применение предколонок***

При регулярном анализе проб, содержащих большое количество примесей, альтернативой тщательной пробоподготовки выступает использование предколонок, защищающей основную колонку от загрязнения. Иногда пробоподготовку целесообразно вообще не проводить, а поставить в линию перед основной колонкой ин-лайн фильтр и предколонку. Преимуществами такой схемы являются простота и экспрессность анализов при меньшей затрате труда и реагентов.

## ***10. Консервация хроматографических колонок***

Перед достаточно длительным хранением хроматографические колонки необходимо промыть и заполнить определенным для каждого типа неподвижной фазы растворителем. Так, хроматографические колонки для работы в нормально-фазовых системах обычно заполняются высококипящим углеводородом, например изооктаном. Обращенные фазы промывают водой и заполняют ацетонитрилом, а на небольшой скорости подачи — изопропанолом. Фазы, предназначенные для работы с водными буферами, заполняются водой с небольшой добавкой азида натрия (бактериостатика). Инструкции по хранению колонки могут указываться в ее паспорте.

## ***11. Хранение водных буферов***

Водные буферные растворы могут храниться значительно дольше, если добавить в них азид натрия (бактериостатик).

## ***12. Регулярность проведения калибровки***

Калибровку по стандарту необходимо проводить ежедневно или же каждый раз при приготовлении нового элюента. Калибровка проводится при достижении стационарного состояния хроматографической системы; считываемыми параметрами являются время удерживания пика стандарта, его площадь (при спектрофотометрическом детектировании — на опорной длине волны), спектральные отношения (при применении сканирующего или диодно-матричного спектрофотометрического детектора). В начале работы стандарт может быть проанализирован дважды для того, чтобы подтвердить воспроизводимость времени удерживания.

## ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

## Лабораторная работа № 1

**Определение состава образца,  
содержащего диметил (*E*)-2-(1,3-дифенилаллил)малонат  
и (*E*)-1,3-дифенилаллил ацетат**

**Цель:** определить относительное содержание энантиомеров диметил (*E*)-2-(1,3-дифенилаллил)малоната (**2**), а также определить конверсию исходного каталитического субстрата — рацемического (*E*)-1,3-дифенилаллил ацетата (**1**) (рис. 45) в пробе.

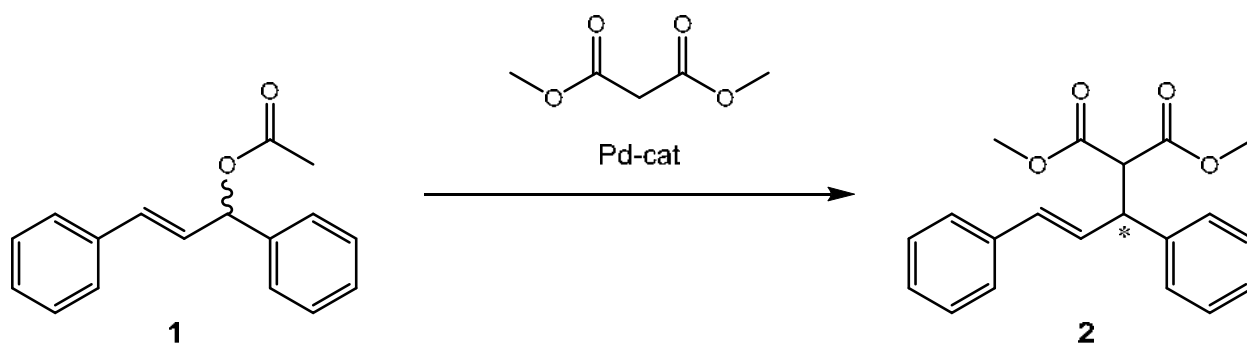


Рис. 45. Реакция алкилирования (*E*)-1,3-дифенилаллил ацетата диметилмалонатом

**Оборудование и реактивы:** н-гексан (абс.), 2-пропанол (абс.), хроматограф изократический «Стайер», хроматографическая колонка с хиральной неподвижной фазой (Kromasil 5-CelluCoat, длина — 250 мм, диаметр — 4,6 мм), шприц для ввода пробы в инжектор хроматографа (объем — 250 мкл), пробирки типа Эппендорф (объем — 2,0 мл), пипетка мерная (объем — 2 мл), пипетатор.

### Ход работы

1. Включить ВЭЖ-хроматограф. Это осуществляется путем последовательного включения всех модулей или общего выключателя на сетевом фильтре. Затем следует включить ПК, запустить и настроить программное обеспечение в соответствии с Руководством Пользователя.

2. Приготовить подвижную фазу (н-гексан / 2-пропанол 99/1 об./об.). Для этого мерным цилиндром отмеряют 99 мл н-гексана, переносят в резервуар для подвижной фазы, затем туда же добавляют 1 мл 2-пропанола (с помощью мерной пипетки), плотно закрывают резервуар и тщательно перемешивают содержимое.

3. Заполнить гидравлические линии хроматографа и хроматографическую колонку подвижной фазой. Для этого откачивают шприцем из гидравлической линии воздух или старую подвижную фазу (через специальное отверстие, обозначенное «промывка линии»); убедившись в отсутствии воздуха в линии, включают подачу элюента в систему, установив скорость потока элюента 1,5 мл/мин, время таймера — 7 мин.

4. После истечения установленного времени (7 мин) включить спектрофотометрический детектор, установив аналитическую длину волны — 254 нм. Сначала детектор проведет автоматическую подготовку к работе (этапы подготовки будут отображаться на дисплее детектора), после чего издаст характерный сигнал, при этом на дисплее появится значение сигнала детектора (0,000 единиц, так как при включении детектора происходит автоматическое обнуление) и значение установленной длины волны (254 нм).

5. Подготовить образец для анализа. Для этого в пробирку типа Эппендорф вносят навеску пробы (около 1 мг), мерной пипеткой вносят в пробирку подвижную фазу (2 мл), закрывают пробирку и тщательно перемешивают до растворения.

6. Открыть программу «Мультихром», установить требуемые условия анализа: скорость потока подвижной фазы — 0,6 мл/мин, аналитическая длина волны — 254 нм (установлена при включении спектрофотометрического детектора). Проверить выход хроматографа на рабочий режим по критериям, приведенным выше.

7. Создать новую хроматограмму. Для этого нажимают на кнопку «Запустить анализ», в открывающееся окно вводят номер образца (порядковый по журналу «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

8. С помощью шприца для ввода проб (объемом 250 мкл) из пробирки с раствором пробы отобрать 50 мкл и ввести в инжектор (при этом он должен быть выставлен в положение «Загрузка») и перевести инжектор в положение «Ввод». В момент перевода инжектора в положение «Ввод» проба попадет в колонку, а хроматограмма автоматически начинает записываться программой.

9. По истечении времени анализа (в данном случае — 30 мин) закрыть хроматограмму, нажав кнопку «Прекратить анализ».

10. Определить энантиомерный избыток ( $ee$ ) каталитического продукта **2**. Для этого выделяют вершины пиков двух энантиомеров вещества **2**, их начало и конец. Открывают отчет по хроматограмме (соответствующая кнопка в программе), где отражаются площади всех выделенных пиков. Рассчитывают относительное содержание энантиомеров в образце, разделив площадь пика соответствующего стереоизомера на сумму площадей пиков обоих антиподов. Из полученных данных относительного содержания энантиомеров рассчитывают энантиомерный избыток ( $ee$ ): из



относительного содержания преобладающего энантиомера вычитают относительное содержание минорного антипода. Идентификацию хроматографических пиков продукта **2** проводят с помощью эталонной хроматогаммы рацемической смеси (рис. 46).

11. Определить конверсию исходного рацемического субстрата **1**. Для этого выделяют вершины пиков двух энантиомеров для веществ **1** и **2**, и их начало и конец. Открывают отчет по хроматограмме. Рассчитывают конверсию субстрата **1** в образце, разделив сумму площадей пиков двух энантиомеров продукта **2** на общую сумму площадей пиков двух энантиомеров для веществ **1** и **2**. Идентификацию хроматографических пиков субстрата **1** проводят с помощью его эталонной хроматогаммы (рис. 47).

12. Остановить подачу подвижной фазы в систему, выключить детектор и весь хроматограф.

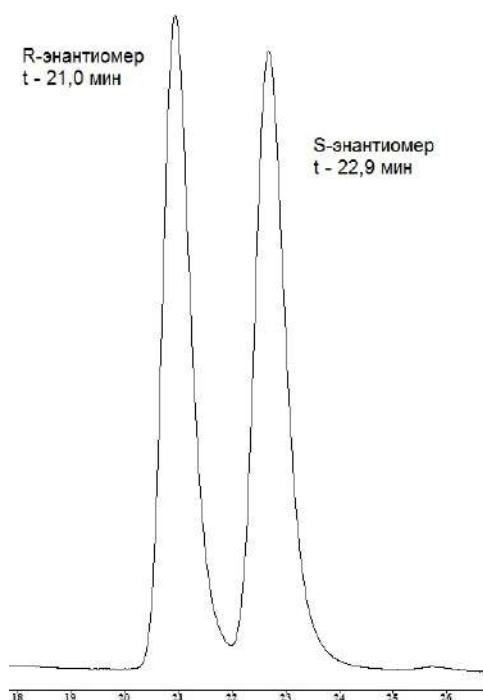


Рис. 46. Хроматограмма  
рацемической смеси диметил  
(*E*)-2-(1,3-дифенилаллил)малоната

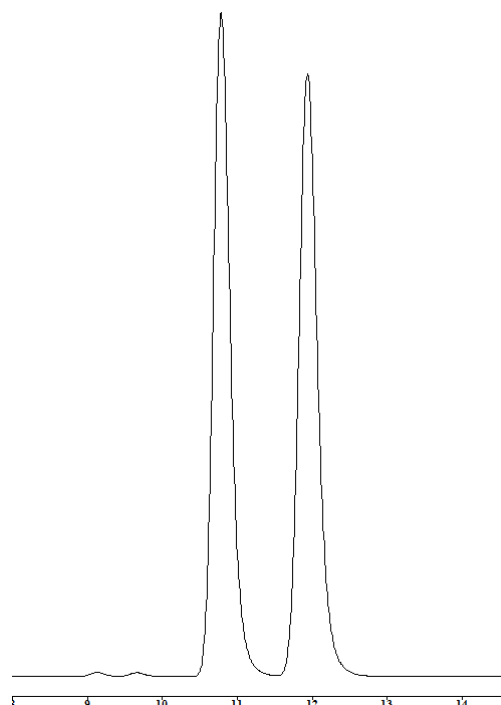


Рис. 47. Хроматограмма  
рацемической смеси  
(*E*)-1,3-дифенилаллил ацетата

## Лабораторная работа № 2

### Определение состава образца, содержащего (*E*)-1-(1,3-дифенилаллил)пирролидина

**Цель:** определить относительное содержание энантиомеров (*E*)-1-(1,3-дифенилаллил)пирролидина (**2**), а также конверсию исходного каталитического субстрата — рацемического (*E*)-1,3-дифенилаллил ацетата (**1**) (рис. 48) в пробе.

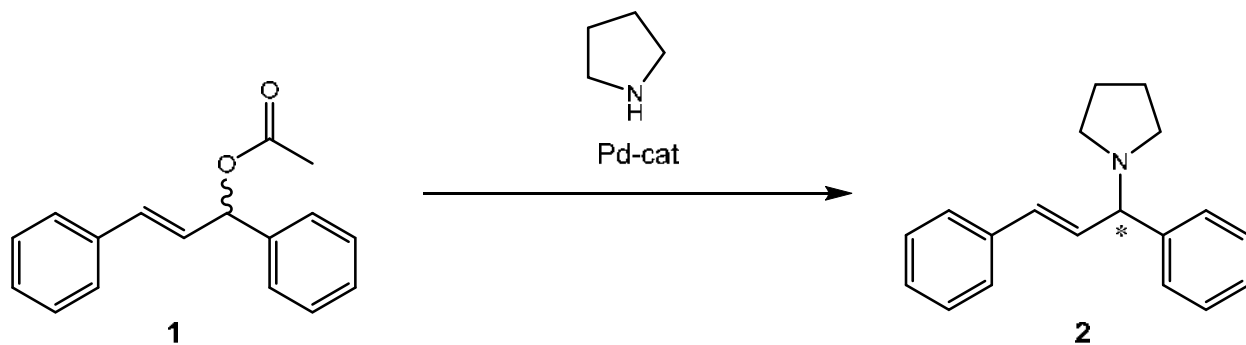


Рис. 48. Аминирование диметил (E)-1,3-дифенилаллил ацетата пирролидином

**Оборудование и реактивы:** н-гексан (абс.), 2-пропанол (абс.), хроматограф изократический «Стайер», хроматографическая колонка с хиральной неподвижной фазой (CHIRALCEL OD-H, длина — 250 мм, диаметр — 4,6 мм), шприц для ввода пробы в инжектор хроматографа (объем — 250 мкл), пробирки типа Эппендорф (объем — 2,0 мл), пипетка мерная (объем — 2 мл), пипетатор.

### Ход работы

1. Включить ВЭЖ-хроматограф путем последовательного включения всех модулей или общего выключателя на сетевом фильтре. Затем следует включить ПК, запустить и настроить программное обеспечение в соответствии с Руководством Пользователя.

2. Приготовить подвижную фазу (н-гексан / 2-пропанол 95/5 об./об.). Для этого мерным цилиндром отмеряют 95 мл н-гексана, переносят в резервуар для подвижной фазы, затем туда же добавляют 5 мл 2-пропанола (с помощью мерной пипетки), плотно закрывают резервуар и тщательно перемешивают содержимое.

3. Заполнить гидравлические линии хроматографа и хроматографическую колонку подвижной фазой. Для этого откачивают шприцем из гидравлической линии воздух или старую подвижную фазу (через специальное отверстие, обозначенное «промывка линии»); убедившись в отсутствии воздуха в линии, включают подачу элюента в систему, установив скорость потока элюента 1,5 мл/мин, время таймера — 7 мин.

4. После истечения установленного времени (7 мин) включить спектрофотометрический детектор, установив аналитическую длину волны — 254 нм. Сначала детектор проведет автоматическую подготовку к работе (этапы подготовки будут отображаться на дисплее детектора), после чего издаст характерный сигнал, при этом на дисплее появится значение сигнала детектора (0,000 единиц, так как при включении детектора происходит автоматическое обнуление) и значение установленной длины волны (254 нм).

5. Подготовить образец для анализа. Для этого в пробирку типа Эппендорф вносят навеску пробы (около 1 мг), мерной пипеткой вносят в пробирку подвижную фазу (2 мл), закрывают пробирку и тщательно перемешивают до растворения.

6. Открыть программу «Мультихром», установить требуемые условия анализа: скорость потока подвижной фазы — 0,4 мл/мин, аналитическая длина волны — 254 нм (установлена при включении спектрофотометрического детектора). Проверить выход хроматографа на рабочий режим по критериям, приведенным выше.

7. Создать новую хроматограмму. Для этого нажимают на кнопку «Запустить анализ», в открывающееся окно вводят номер образца (порядковый по журналу «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

8. С помощью шприца для ввода проб (объем 250 мкл) из пробирки с раствором пробы отобрать 50 мкл и ввести в инжектор (при этом он должен быть выставлен в положение «Загрузка») и перевести инжектор в положение «Ввод». В момент перевода инжектора в положение «Ввод» проба попадет в колонку, а хроматограмма автоматически начинает записываться программой.

9. По истечении времени анализа (в данном случае — 20 мин) закрыть хроматограмму, нажав кнопку «Прекратить анализ».

10. Определить энантиомерный избыток (*ee*) каталитического продукта **2**. Для этого выделяют вершины пиков двух энантиомеров вещества **2**, их начало и конец. Открывают отчет по хроматограмме (соответствующая кнопка в программе), где отражаются площади всех выделенных пиков. Рассчитывают относительное содержание энантиомеров в образце, разделив площадь пика соответствующего стереоизомера на сумму площадей пиков обоих антиподов. Из полученных данных относительного содержания энантиомеров рассчитывают энантиомерный избыток (*ee*): из относительного содержания преобладающего энантиомера вычитают относительное содержание минорного антипода. Идентификацию хроматографических пиков продукта **2** проводят с помощью эталонной хроматограммы рацемической смеси (рис. 49).

11. Определить конверсию исходного рацемического субстрата **1**. Для этого выделяют вершины пиков двух энантиомеров для веществ **1** и **2**, а также их начало и конец. Открывают отчет по хроматограмме. Рассчитывают конверсию субстрата **1** в образце, разделив сумму площадей пиков двух энантиомеров продукта **2** на общую сумму площадей пиков двух энантиомеров для веществ **1** и **2**. Идентификацию хроматографических пиков субстрата **1** проводят с помощью его эталонной хроматограммы (рис. 50).

12. Остановить подачу подвижной фазы в систему, выключить детектор и весь хроматограф.

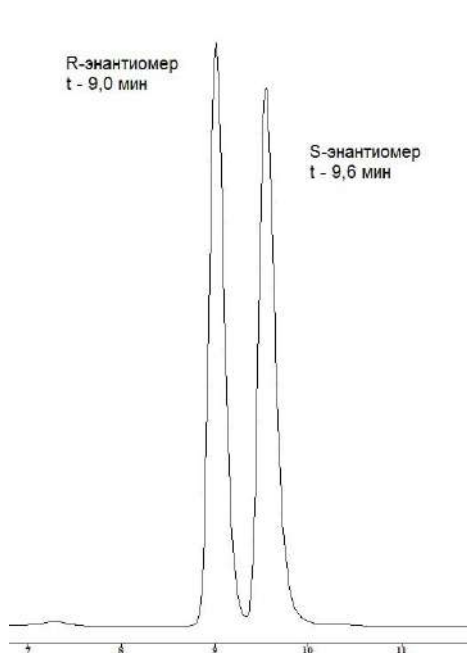


Рис. 49. Хроматограмма  
рацемической смеси  
(*E*)-1-(1,3-дифенилаллил)пирролидина

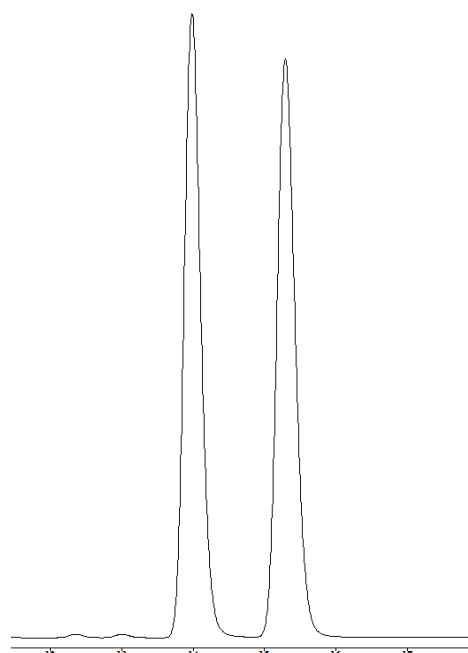


Рис. 50. Хроматограмма  
рацемической смеси  
(*E*)-1,3-дифенилаллил ацетата

### Лабораторная работа № 3

#### Определение состава образца, содержащего этил 1-циннамил- 2-оксоциклогексан-1-карбоксилат

**Цель:** определить относительное содержание энантиомеров этил 1-циннамил-2-оксоциклогексан-1-карбоксилата (**2**), а также конверсию исходного каталитического субстрата — циннамил ацетата (**1**) (рис. 51) в пробе.

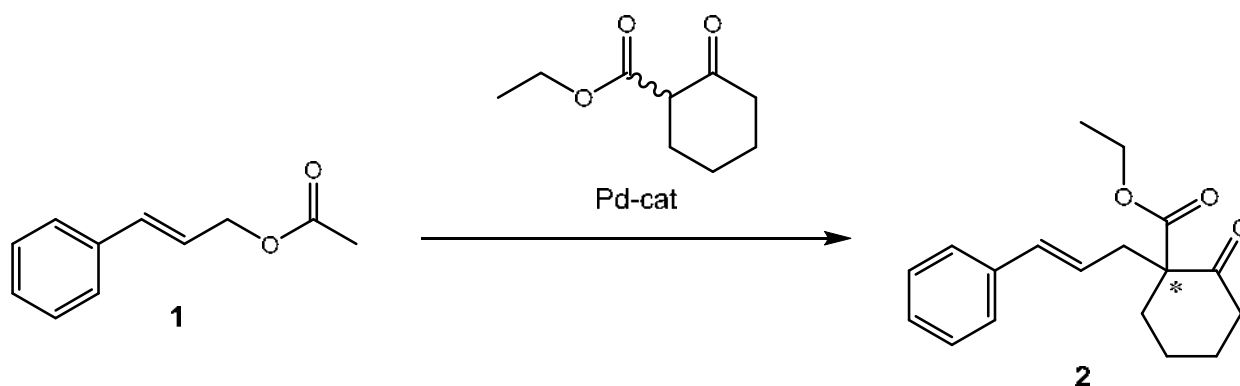


Рис. 51. Алкилирование циннамил ацетата рацемическим  
этил 2-оксоциклогексан-1-карбоксилатом

**Оборудование и реактивы:** н-гексан (абс.), 2-пропанол (абс.), хроматограф изократический «Стайер», хроматографическая колонка с хиральной неподвижной фазой (Kromasil 5-CelluCoat, длина — 250 мм,

диаметр — 4,6 мм), шприц для ввода пробы в инжектор хроматографа (объем — 250 мкл), пробирки типа Эппендорф (объем — 2,0 мл), пипетка мерная (объем — 2 мл), пипетатор.

### *Ход работы*

1. Включить ВЭЖ-хроматограф путем последовательного включения всех модулей или общего выключателя на сетевом фильтре. Затем следует включить ПК, запустить и настроить программное обеспечение в соответствии с Руководством Пользователя.

2. Приготовить подвижную фазу (н-гексан / 2-пропанол 95/5 об./об.). Для этого мерным цилиндром отмеряют 95 мл н-гексана, переносят в резервуар для подвижной фазы, затем туда же добавляют 5 мл 2-пропанола (с помощью мерной пипетки), плотно закрывают резервуар и тщательно перемешивают содержимое.

3. Заполнить гидравлические линии хроматографа и хроматографическую колонку подвижной фазой. Для этого откачивают шприцем из гидравлической линии воздух или старую подвижную фазу (через специальное отверстие, обозначенное «промывка линии»); убедившись в отсутствии воздуха в линии, включают подачу элюента в систему, устанавливают скорость потока элюента 1,5 мл/мин, время таймера — 7 мин.

4. После истечения времени (7 мин) включить спектрофотометрический детектор, установив аналитическую длину волны — 254 нм. Сначала детектор проведет автоматическую подготовку к работе (этапы подготовки будут отображаться на дисплее детектора), после чего издаст характерный сигнал, при этом на дисплее появится значение сигнала детектора (0,000 единиц, так как при включении детектора происходит автоматическое обнуление) и значение установленной длины волны (254 нм).

5. Подготовить образец для анализа. Для этого в пробирку типа Эппендорф вносят навеску пробы (около 1 мг), мерной пипеткой вносят в пробирку подвижную фазу (2 мл), закрывают пробирку и тщательно перемешивают до растворения.

6. Открыть программу «Мультихром», установить требуемые условия анализа: скорость потока подвижной фазы — 0,4 мл/мин, аналитическую длину волны — 254 нм (установлена при включении спектрофотометрического детектора). Проверить выход хроматографа на рабочий режим по критериям, приведенным выше.

7. Создать новую хроматограмму. Для этого нажимают на кнопку «Запустить анализ», в открывающееся окно вводят номер образца (порядковый по журналу «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

8. С помощью шприца для ввода проб (объемом 250 мкл) из пробирки с раствором пробы отобрать 50 мкл и ввести в инжектор (при этом он должен быть выставлен в положение «Загрузка») и перевести инжектор в положение «Ввод». В момент перевода инжектора в положение

«Ввод» проба попадет в колонку, а хроматограмма автоматически начинает записываться программой.

9. По истечении времени анализа (в данном случае — 25 мин) закрыть хроматограмму, нажав кнопку «Прекратить анализ».

10. Определить энантиомерный избыток (*ee*) каталитического продукта **2**. Для этого выделяют вершины пиков двух энантиомеров вещества **2**, их начало и конец. Открывают отчет по хроматограмме (соответствующая кнопка в программе), где отражаются площади всех выделенных пиков. Рассчитывают относительное содержание энантиомеров в образце, разделив площадь пика соответствующего стереоизомера на сумму площадей пиков обоих антиподов. Из полученных данных относительного содержания энантиомеров рассчитывают энантиомерный избыток (*ee*): из относительного содержания преобладающего энантиомера вычитают относительное содержание минорного антипода. Идентификацию хроматографических пиков продукта **2** проводят с помощью эталонной хроматограммы рацемической смеси (рис. 52).

11. Определить конверсию исходного рацемического субстрата **1**. Для этого выделяют вершины пиков двух энантиомеров для веществ **1** и **2**, их начало и конец. Открывают отчет по хроматограмме. Рассчитывают конверсию субстрата **1** в образце, разделив сумму площадей пиков двух энантиомеров продукта **2** на сумму площадей пиков веществ **2** и субстрата **1**. Идентификацию хроматографических пиков субстрата **1** проводят с помощью его эталонной хроматограммы (рис. 53).

12. Остановить подачу подвижной фазы в систему, выключить детектор и весь хроматограф.

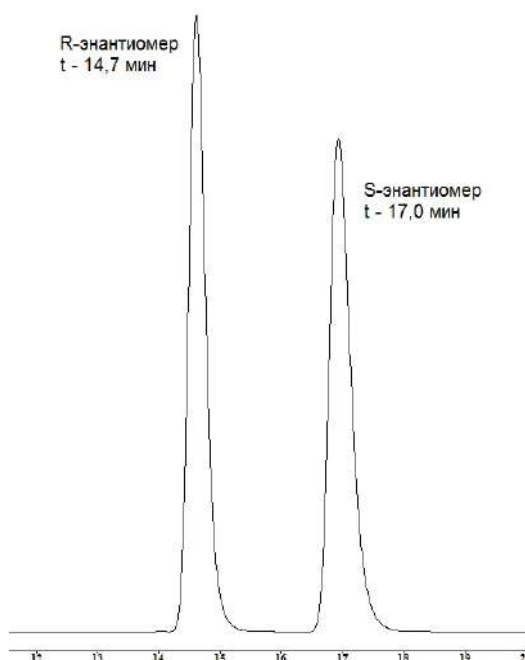


Рис. 52. Хроматограмма рацемической смеси этил 1-циннамил-2-оксоциклогексан-1-карбоксилата

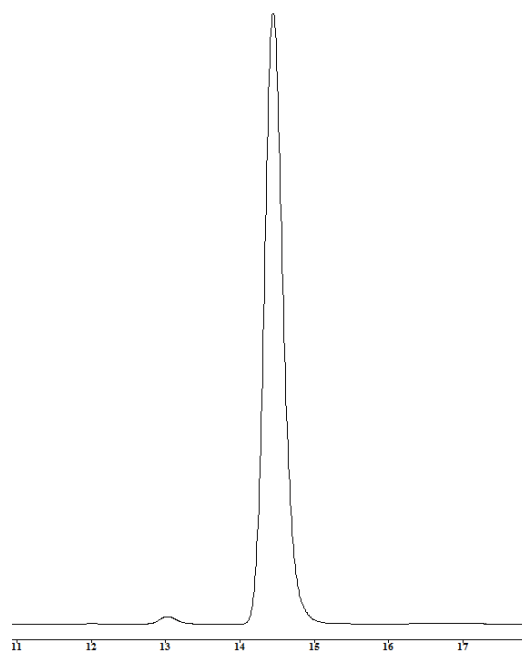


Рис. 53. Хроматограмма циннамил ацетата

## Лабораторная работа № 4

### Определение состава образца, содержащего этил (*E*)-2-ацетамидо-2-ацетил- 5-фенилпент-4-еноат

**Цель:** определить относительное содержание энантиомеров этил (*E*)-2-ацетамидо-2-ацетил-5-фенилпент-4-еноата (**2**), а также конверсию исходного каталитического субстрата — циннамил ацетата (**1**) (рис. 54) в пробе.

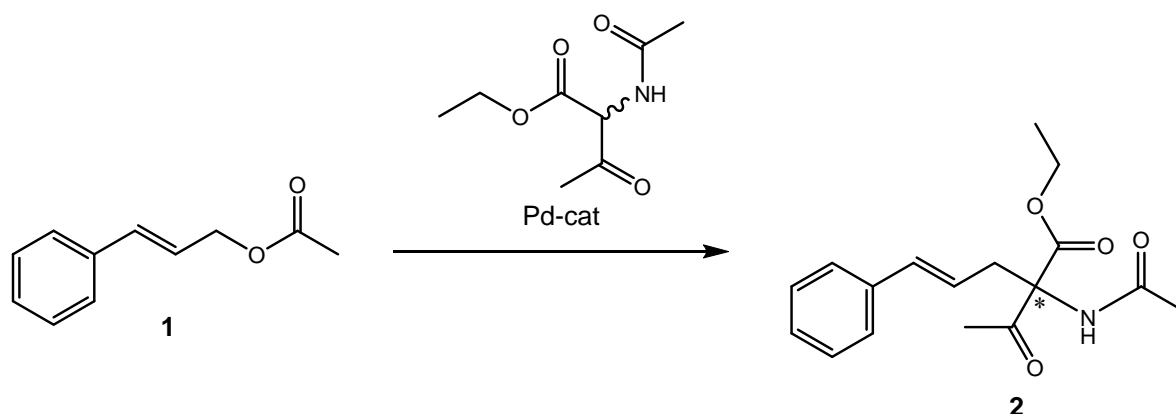


Рис. 54. Алкилирование циннамил ацетата  
рацемическим этил 2-ацетамидо-3-оксобутаноатом

**Оборудование и реактивы:** н-гексан (абс.), 2-пропанол (абс.), хроматограф изократический «Стайер», хроматографическая колонка с хиральной неподвижной фазой (CHIRALCEL OD-H, длина — 250 мм, диаметр — 4,6 мм), шприц для ввода пробы в инжектор хроматографа (объем — 250 мкл), пробирки типа Эппендорф (объем — 2,0 мл), пипетка мерная (объем — 2 мл), пипетатор.

### Ход работы

1. Включить ВЭЖ-хроматограф путем последовательного включения всех модулей или общего выключателя на сетевом фильтре. Затем следует включить ПК, запустить и настроить программное обеспечение в соответствии с Руководством Пользователя.

2. Приготовить подвижную фазу (н-гексан / 2-пропанол 85/15 об./об.). Для этого мерным цилиндром отмеряют 85 мл н-гексана, переносят в резервуар для подвижной фазы, затем туда же добавляют 15 мл 2-пропанола (с помощью мерного цилиндра), плотно закрывают резервуар и тщательно перемешивают содержимое.

3. Заполнить гидравлические линии хроматографа и хроматографическую колонку подвижной фазой. Для этого откачивают шприцем из гидравлической линии воздух или старую подвижную фазу (через специальное отверстие, обозначенное «промывка линии»); убедившись в отсутствии воздуха в линии, включают подачу элюента в систему, установив скорость потока элюента 1,5 мл/мин, время таймера — 7 мин.

4. После истечения установленного времени (7 мин) включить спектрофотометрический детектор, установив аналитическую длину волны — 254 нм. Сначала детектор проведет автоматическую подготовку к работе (этапы подготовки будут отображаться на дисплее детектора), после чего издаст характерный сигнал, при этом на дисплее появится значение сигнала детектора (0,000 единиц, так как при включении детектора происходит автоматическое обнуление) и значение установленной длины волны (254 нм).

5. Подготовить образец для анализа. Для этого в пробирку типа Эппендорф вносят навеску пробы (около 1 мг), мерной пипеткой вносят в пробирку подвижную фазу (2 мл), закрывают пробирку и тщательно перемешивают до растворения.

6. Открыть программу «Мультихром», установить требуемые условия анализа: скорость потока подвижной фазы — 0,8 мл/мин, аналитическую длину волны — 254 нм (установлена при включении спектрофотометрического детектора). Проверить выход хроматографа на рабочий режим по критериям, приведенным выше.

7. Создать новую хроматограмму. Для этого нажимают на кнопку «Запустить анализ», в открывающееся окно вводят номер образца (порядковый по журналу «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

8. С помощью шприца для ввода проб (объемом 250 мкл) из пробирки с раствором пробы отобрать 50 мкл и ввести в инжектор (при этом он должен быть выставлен в положение «Загрузка») и перевести инжектор в положение «Ввод». В момент перевода инжектора в положение «Ввод» проба попадет в колонку, а хроматограмма автоматически начинает записываться программой.

9. По истечении времени анализа (в данном случае — 15 мин) закрыть хроматограмму, нажав кнопку «Прекратить анализ».

10. Определить энантиомерный избыток (*ee*) каталитического продукта **2**. Для этого выделяют вершины пиков двух энантиомеров вещества **2**, их начало и конец. Открывают отчет по хроматограмме (соответствующая кнопка в программе), где отражаются площади всех выделенных пиков. Рассчитывают относительное содержание энантиомеров в образце, разделив площадь пика соответствующего стереоизомера на сумму площадей пиков обоих антиподов. Из полученных данных относительного содержания энантиомеров рассчитывают энантиомерный избыток (*ee*): из относительного содержания преобладающего энантиомера вычитают относительное содержание минорного антипода. Идентификацию хроматографических пиков продукта **2** проводят с помощью эталонной хроматограммы рацемической смеси (рис. 55).

11. Определить конверсию исходного рацемического субстрата **1**. Для этого выделяют вершины пиков двух энантиомеров для веществ **1** и **2**, их начало и конец. Открывают отчет по хроматограмме. Рассчитывают конверсию субстрата **1** в образце, разделив сумму площадей пиков двух энантиомеров продукта **2** на сумму площадей пиков веществ **2**



и субстрата **1**. Идентификацию хроматографических пиков субстрата **1** проводят с помощью его эталонной хроматограммы (рис. 56).

12. Остановить подачу подвижной фазы в систему, выключить детектор и весь хроматограф.

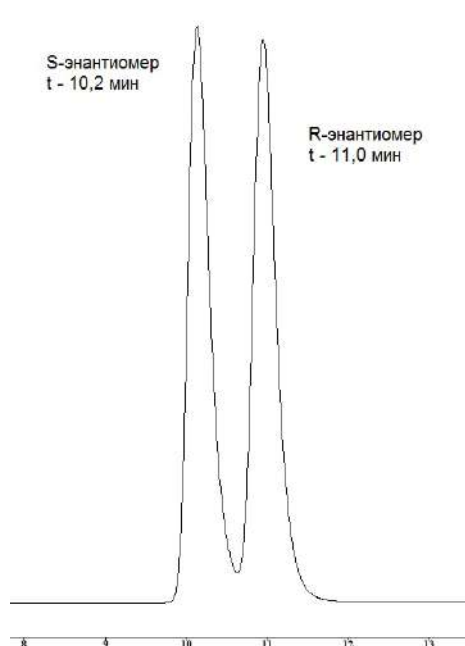


Рис. 55. Хроматограмма рацемической смеси (E)-2-ацетида-2-ацетил-5-фенилпент-4-еноата

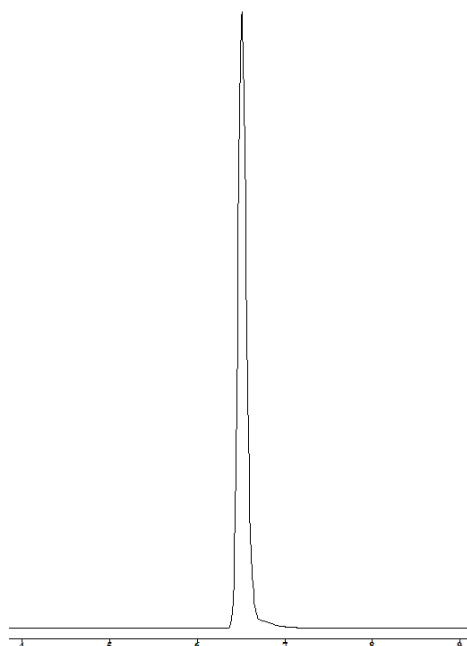


Рис. 56. Хроматограмма циннамил ацетата

## Лабораторная работа № 5

### Определение состава образца, содержащего этил 1-циннамил-2-оксоциклопентан-1-карбоксилат

**Цель:** определить относительное содержание энантиомеров этил 1-циннамил-2-оксоциклопентан-1-карбоксилата (**2**), а также конверсию исходного каталитического субстрата — циннамил ацетата (**1**) (рис. 57) в пробе.

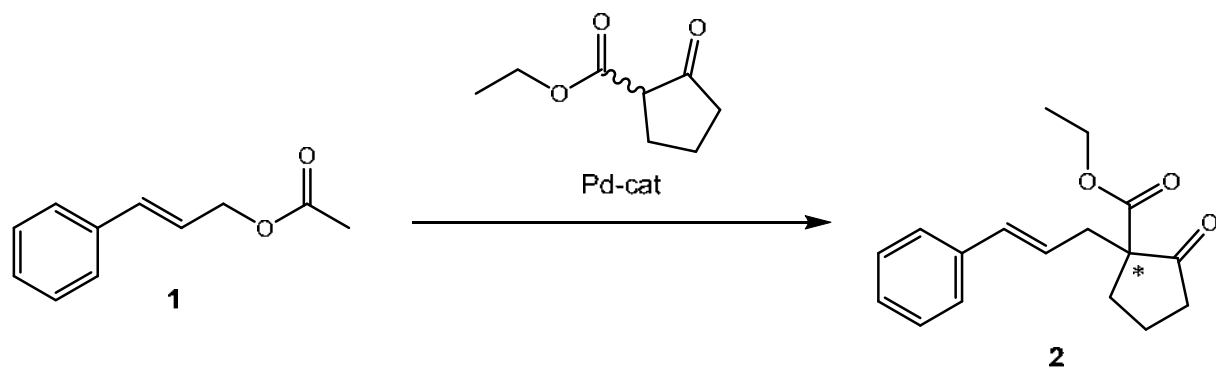


Рис. 57. Алкилирование циннамил ацетата рацемическим этил 2-оксоциклопентан-1-карбоксилатом

**Оборудование и реактивы:** н-гексан (абс.), 2-пропанол (абс.), хроматограф изократический «Стайер», хроматографическая колонка с хиральной неподвижной фазой (CHIRALCEL OD-H, длина — 250 мм, диаметр — 4,6 мм), шприц для ввода пробы в инжектор хроматографа (объем — 250 мкл), пробирки типа Эппендорф (объем — 2,0 мл), пипетка мерная (объем — 2 мл), пипетатор.

### *Ход работы*

1. Включить ВЭЖ-хроматограф путем последовательного включения всех модулей или общего выключателя на сетевом фильтре. Затем следует включить ПК, запустить и настроить программное обеспечение в соответствии с Руководством Пользователя.

2. Приготовить подвижную фазу (н-гексан / 2-пропанол 99/1 об./об.). Для этого мерным цилиндром отмеряют 99 мл н-гексана, переносят в резервуар для подвижной фазы, затем туда же добавляют 1 мл 2-пропанола (с помощью мерной пипетки), плотно закрывают резервуар и тщательно перемешивают содержимое.

3. Заполнить гидравлические линии хроматографа и хроматографическую колонку подвижной фазой. Для этого откачивают шприцем из гидравлической линии воздух или старую подвижную фазу (через специальное отверстие, обозначенное «промывка линии»), убедившись в отсутствии воздуха в линии включают подачу элюента в систему, установив скорость потока элюента 1,5 мл/мин, время таймера — 7 мин.

4. После истечения установленного времени (7 мин) включить спектрофотометрический детектор, установив аналитическую длину волны — 254 нм. Сначала детектор проведет автоматическую подготовку к работе (этапы подготовки будут отображаться на дисплее детектора), после чего издаст характерный сигнал, при этом на дисплее появится значение сигнала детектора (0,000 единиц, так как при включении детектора происходит автоматическое обнуление) и значение установленной длины волны (254 нм).

5. Подготовить образец для анализа. Для этого в пробирку типа Эппендорф вносят навеску пробы (около 1 мг), мерной пипеткой вносят в пробирку подвижную фазу (2 мл), закрывают пробирку и тщательно перемешивают до растворения.

6. Открыть программу «Мультихром», установить требуемые условия анализа: скорость потока подвижной фазы — 0,6 мл/мин, аналитическую длину волны — 254 нм (установлена при включении спектрофотометрического детектора). Проверить выход хроматографа на рабочий режим по критериям, приведенным выше.

7. Создать новую хроматограмму. Для этого нажимают на кнопку «Запустить анализ», в открывающееся окно вводят номер образца (порядковый по журналу «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

8. С помощью шприца для ввода проб (объемом 250 мкл) из пробирки с раствором пробы отобрать 50 мкл и ввести в инжектор (при этом

он должен быть выставлен в положение «Загрузка») и перевести инжектор в положение «Ввод». В момент перевода инжектора в положение «Ввод» проба попадет в колонку, а хроматограмма автоматически начинает записываться программой.

9. По истечении времени анализа (в данном случае — 30 мин) закрыть хроматограмму, нажав кнопку «Прекратить анализ».

10. Определить энантиомерный избыток (*ee*) каталитического продукта **2**. Для этого выделяют вершины пиков двух энантиомеров вещества **2**, их начало и конец. Открывают отчет по хроматограмме (соответствующая кнопка в программе), где отражаются площади всех выделенных пиков. Рассчитывают относительное содержание энантиомеров в образце, разделив площадь пика соответствующего стереоизомера на сумму площадей пиков обоих антиподов. Из полученных данных относительного содержания энантиомеров рассчитывают энантиомерный избыток (*ee*): из относительного содержания преобладающего энантиомера вычитают относительное содержание минорного антипода. Идентификацию хроматографических пиков продукта **2** проводят с помощью эталонной хроматограммы рацемической смеси (рис. 58).

11. Определить конверсию исходного рацемического субстрата **1**. Для этого выделяют вершины пиков двух энантиомеров для веществ **1** и **2**, их начало и конец. Открывают отчет по хроматограмме. Рассчитывают конверсию субстрата **1** в образце, разделив сумму площадей пиков двух энантиомеров продукта **2** на сумму площадей пиков веществ **2** и субстрата **1**. Идентификацию хроматографических пиков субстрата **1** проводят с помощью его эталонной хроматограммы (рис. 59).

12. Остановить подачу подвижной фазы в систему, выключить детектор и весь хроматограф.

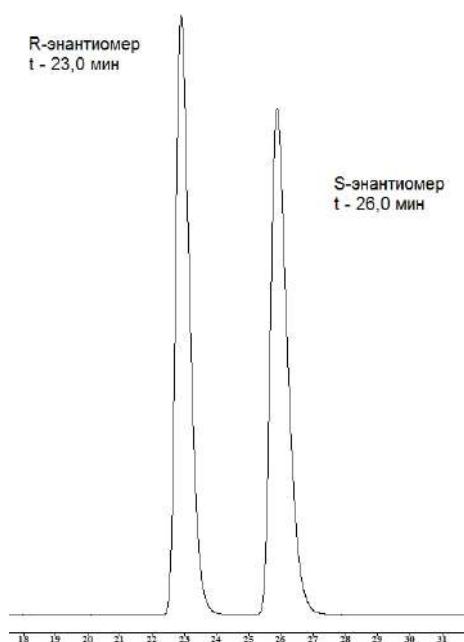


Рис. 58. Хроматограмма рацемической смеси 1-циннамил-2-оксоциклопентан-1-карбоксилата

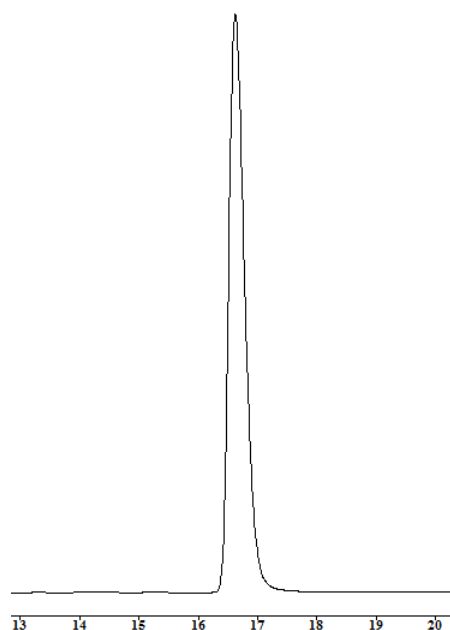


Рис. 59. Хроматограмма циннамил ацетата

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В пособии дан обзор не прямых методов разделения энантиомеров, показаны их недостатки: необходимость использования оптически чистого хирального дериватирующего реагента, необходимость полного отсутствия процессов рацемизации и эпимеризации. Рассмотрена сущность прямого хроматографического разделения энантиомеров на хиральных неподвижных фазах, природа молекулярных взаимодействий между разделяемыми энантиомерами и хиральной неподвижной фазой. Раскрыта тема хиральной газовой хроматографии, основные типы хиральных неподвижных фаз, используемых в газовой хроматографии: производные аминокислот, хиральные координационные соединения металлов, производные циклодекстринов. Изучена хиральная высокоэффективная жидкостная хроматография, неподвижные фазы, используемые в этом методе.

Возрастающий интерес к анализу энантиомерной чистоты во многом обусловлен интенсивно развивающейся областью создания новых лекарственных средств на основе оптически чистых веществ. Современные хроматографические методы, которые способны определять энантиомерный состав, разнообразны, однако аналитическое разделение оптических изомеров остается одной из наиболее сложных задач. Причиной этого является почти абсолютная схожесть энантиомеров в свойствах, а также многообразие геометрических изомеров из-за наличия в молекулах или их агрегатах нескольких источников хиральности. Именно поэтому задача создания новых неподвижных хроматографических фаз, поиск новых хроматографических систем для разделения энантиомеров является исключительно актуальной в современной аналитической химии.

Таким образом, хроматографические методы анализа (в том числе методы хиральной хроматографии) являются важным разделом аналитической химии. Понимание механизмов удерживания и хирального распознавания дает возможность химику-аналитику совершенствовать существующие методики анализа хиральных соединений, а также разрабатывать принципиально новые, более выгодные с точки зрения аналитической химии и потокового анализа. Пособие призвано ознакомить студентов с существующими хиральными неподвижными фазами и их свойствами, механизмами хирального распознавания и способами управления ими.

## СПИСОК МЕЖДУНАРОДНЫХ СОКРАЩЕНИЙ, ПРИНЯТЫХ В ХРОМАТОГРАФИИ

### А

A — amino, амино

Amino — аминофаза

APS — aminopropylsilane, аминопропилированная фаза (аминофаза)

### В

Butyl — бутил

BIO — for bioseparations, для разделения пептидов, белков, нуклеотидов, нуклеиновых кислот

### С

C1, C4, C8, C18, C30 — углеводородные радикалы с соответствующим числом атомов углерода

CN, Cyano — циано, нитрильная фаза

CMC — critical micelle concentration, критическая концентрация мицеллообразования, ККМ

CSP — chiral stationary phase, хиральная неподвижная фаза

### Д

Dansyl — (5-N,N-dimethylaminonaphthylene-1-sulfonyl chloride), дансил (derivatizing reagent на аминогруппу, гидроксильную группу)

Dabsyl — (4-N,N-dimethylaminoazobenzene-4-sulfonyl chloride), дабсил (derivatizing reagent на аминогруппу, гидроксильную группу)

DVB — divinylbenzene, дивинилбензол

DEA — diethylamine, диэтиламин

DEAE — diethylaminoethyl, диэтиламиноэтил

DEAM — diethylaminomethyl, диэтиламинометил

DMAC — dimethylacetamide, диметилацетамид (растворитель)

DMF — dimethylformamide, диметилформамид (растворитель)

DMSO — dimethylsulfoxide, диметилсульфоксид (растворитель)

DNPH — dinitrophenylhydrazine, динитрофенилгидразин, ДНФГ (derivatizing reagent на карбонильную группу)

### Е

EC — electrokinetic chromatography, электрокинетическая хроматография

ECD — electrochemical detection, электрохимическая детекция

ELSD — evaporative light scattering detector, испарительный детектор светорассеяния

E — endcapped, эндкепированный

em — emission, длина волны эмиссии

EPA — Environmental Protection Agency

ex — excitation, длина волны возбуждения

## **F**

FМОК — 9-fluorenylmethylchlorformate, (derivatизирующий реагент для аминокислот)

FLD — fluorescence detector, флуоресцентное детектирование

FPLC — fast protein liquid chromatography, метод жидкостной хроматографии для быстрого разделения белковых соединений

## **G**

GFC — gel filtration chromatography, гель-фильтрационная хроматография

GPC — gel permeation chromatography, гель-пермеационная хроматография

## **H**

НЕТР — height equivalent to a theoretical plate, высота, эквивалентная теоретической тарелке, ВЭТТ

Hexyl — гексил

Hexyl-Phenyl — 1-фенилгексил

HPLC — high performance liquid chromatography, высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭЖХ

HPCE — high performance capillary electrophoresis, высокоэффективный капиллярный электрофорез, ВЭКЭ

НР — hydrophilic polymer, гидрофильный полимер

HFIP — hexafluoroisopropanol, гексафторизопропанол (растворитель для эксклюзионной хроматографии)

НИС — hydrophobic interaction chromatography, гидрофобная хроматография

НІІІС — hydrophilic interaction chromatography, гидрофильная хроматография

## **I**

ІС — ion chromatography, ионная хроматография

ІD — internal diameter, внутренний диаметр

ІЕС — ion-exchange chromatography, ионообменная хроматография

ІЕХ — ion-exclusion chromatography, ион-эксклюзионная хроматография

ІРА — isopropanol, изопропанол (растворитель)

ІР — ion-pair, ион-парный

ІR — infrared, инфракрасный

## **L**

LEC — ligand-exchange chromatography, лигандобменная хроматография

LC — liquid chromatography, жидкостная хроматография

## **M**

MCX — medium cation-exchange, умеренная катионообменная фаза

MAX — medium cation-exchange, умеренная анионообменная фаза

МЕКС — micellar electrokinetic (capillary) chromatography, мицеллярная электрокинетическая (капиллярная) хроматография

MCAC — metal chelate affinity chromatography, металлохелатная афинная хроматография  
MOS — methyloctasilane, метилоктасилан, C8 обращенная фаза  
MS — mass spectrometry, масс-спектрометрическое детектирование  
MTBE — methyl tert-butyl ether, метилтретбутиловый эфир (растворитель)  
MW — molecular weight, молекулярная масса

## N

N — efficiency, эффективность  
NE — non-endcapped, неэндкепированный  
NH<sub>2</sub> — amino, amino, аминофаза  
NMP — N-methyl pyrrolidone, (растворитель для эксклюзионной хроматографии)  
NO<sub>2</sub> — nitro, нитро, нитрофаза  
NP — normal phase, нормально-фазовый

## O

Octyl — октил  
OD — outer diameter, внешний диаметр  
ODS — octadecylsilane, октадецилсилан, ОДС (то же, что C18)  
OPA — o-phthalic aldehyde, о-фталевый альдегид (derivatizing reagent на аминогруппу)

## P

PAH — polyaromatic hydrocarbon, полиароматические углеводороды, ПАУ  
Ph, Phenyl — фенил  
PM — polar modified, модификация полярным реагентом  
PS — polystyrene, полистирол  
PVA — polyvinyl alcohol, поливиниловый спирт  
PVC — polyvinyl chloride, поливинилхлорид  
PHM — polyhydroxymethacrylate, полигидроксиметакрилат  
PMM — polymethylmethacrylate, полиметилметакрилат  
PE — polar-endcapped, полярный эндкеппинг  
PFP — pentafluorophenyl, пentaфторфенил  
PEEK — polyetherether ketone, (полимерный материал, заменитель стали)  
PEG — polyethylene glycol, полиэтиленгликоль  
PEI — polyethyleneimine, полиэтиленимин  
PFA, PTFE — Teflon, тефлон  
PFPA — pentafluoropropionic acid, пentaфторпропионовая кислота (ion-pair reagent, применяемый для анализа недериватизованных аминокислот)  
PITC — phenylisothiocyanate, фенилизотиоцианат, ФИТЦ (derivatizing reagent на аминогруппу)

PRP — polymeric reversed phase, полимерная обращенно-фазовая  
psi — pounds per square inch, единица давления, 1 atm = 14.68 psi  
PTH — phenylthiohydantoin, фенилгидантоин производные (дериватизованные ФИТЦ производные)

## Q

QAA — quaternary alkyl ammonium, четвертичные аминогруппы

## R

RP — reversed phase, обращенно-фазовый  
RI — refractive index, рефрактометрическое детектирование  
RSD — relative standard deviation, среднеквадратическое отклонение, СКО

## S

SCX — strong cation-exchange, сильная катионообменная фаза  
SAX — strong anion-exchange, сильная анионообменная фаза  
Si, Sil — silica, силикагель  
SA — сульфированный  
S-DVB — styrene-divinylbenzene, стирол-дивинилбензол  
SDS — sodium dodecyl sulfonate, додецилсульфонат натрия (ион-парный реагент)  
SEC — size exclusion chromatography, эксклюзионная хроматография  
SFC — supercritical fluid chromatography, сверхкритическая флюидная хроматография  
SFE — supercritical fluid extraction, сверхкритическая флюидная экстракция  
SPE — solid phase extraction, твердофазная экстракция, ТФЭ

## T

TEA — triethylamine, триэтиламин, ТЭА  
TFA — trifluoroacetic acid, трифторуксусная кислота, ТФУ  
THF — tetrahydrofuran, тетрагидрофуран, ТГФ (растворитель)  
TLC — thin-layer chromatography, тонкослойная хроматография, ТСХ

## U

UPLC — ultra-pressure liquid chromatography, жидкостная хроматография сверхвысокого давления  
UV — ultraviolet, детектирование в ультрафиолетовом диапазоне

## W

WCX — weak cation-exchange, слабая катионообменная фаза  
WAX — weak anion-exchange, слабая анионообменная фаза

## Z

Zir — zirconia, окись циркония



## Список рекомендуемых источников

1. Gerhard K. E. Scriba. Chiral Separations : Methods and Protocols. — New Jersey : Humana Press, 2013. — P. 526.
2. Хроматографическое определение энантиомеров : пер. с англ. — М. : Мир, 1991. — 268 с.
3. Химия привитых поверхностных соединений / под ред. Г. В. Лисичкина. — М. : Физматлит, 2003. — 592 с.
4. Schurig V. Separation of enantiomers by gas chromatography // Journal of Chromatography A. — 2001. — Iss. 906. — Pp. 275–299.
5. Xie S.-M., Zhang Z.-J., Wang Z.-Y., Yuan L.-M. Chiral metal-organic frameworks for high-resolution gas chromatographic separations // Journal of the American Chemical Society. — 2011. — Vol. 133. — Pp. 11892–11895.
6. Ding J., Welton T., Armstrong D. W. Chiral ionic liquids as stationary phases in gas chromatography // Analytical Chemistry. — 2004. — Vol. 76. — Pp. 6819–6822.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Chen B., Liang C., Yang J., Contreras D. S., Clancy Y. L., Lobkovsky E. B., Yaghi O. M., Dai S. A microporous metal-organic framework for gas-chromatographic separation of alkanes // *Angewandte Chemie*. — 2006. — N 118. — Pp. 1418–1421.
2. Chen L., Reiss P. S., Chong S. Y., Holden D., Jelfs K. E., Hasell T., Little M. A., Kewley A., Briggs M. E., Stephenson A., Thomas M. K., Armstrong J. A., Bell J., Busto J., Noel R., Liu J., Strachan D. M., Thallapally P. K., Cooper A. I. Separation of rare gases and chiral molecules by selective binding in porous organic cages // *Nature Materials*. — 2014. — Vol. 13. — Pp. 954–960.
3. Ding J., Welton T., Armstrong D. W. Chiral ionic liquids as stationary phases in gas chromatography // *Analytical Chemistry*. — 2004. — Vol. 76. — Pp. 6819–6822.
4. Easson L. H., Stedman E. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: molecular dissymmetry and physiological activity // *Biochemical Journal*. — 1933. — Vol. 27. — Pp. 1257–1266.
5. Gerhard K. E. *Scriba. Chiral Separations: Methods and Protocols*. — New Jersey : Humana Press, 2013. — P. 526.
6. Gu Z. Y., Yan X. P. Metal-organic framework MIL-101 for high-resolution gas-chromatographic separation of xylene isomers and ethylbenzene // *Angewandte Chemie International Edition*. — 2010. — Vol. 49. — Pp. 1477–1480.
7. Gu Z.-Y., Yang C.-X., Chang N., Yan X.-P. Metal-organic frameworks for analytical chemistry: from sample collection to chromatographic separation // *Accounts of Chemical Research*. — 2012. — Vol. 45. — Pp. 734–745.
8. He L., Beesley T. E. Applications of enantiomeric gas chromatography: a review // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. — 2005. — Vol. 28. — Pp. 1075–1114.
9. Huang K., Armstrong D. W. GC-MS analysis of crocetane, phytane and some of their stereoisomers using cyclodextrin-based stationary phases // *Organic Geochemistry*. — 2009. — Vol. 40. — Pp. 283–286.
10. Huang K., Breitbach Z. S. Armstrong D. W. Enantiomeric impurities in chiral synthons, catalysts, and auxiliaries // *Tetrahedron: Asymmetry*. — 2006. — Vol. 17. — Pp. 2821–2832.
11. Huang K., Zhang X., Armstrong D. W. Ionic cyclodextrins in ionic liquid matrices as chiral stationary phases for gas chromatography // *Journal of Chromatography A*. — 2010. — Iss. 1217. — Pp. 5261–5273.
12. Kewley A., Stephenson A., Chen L., Briggs M. E., Hasell T., Cooper A. I. Porous organic cages for gas chromatography separations // *Chemistry of Materials*. — 2015. — Vol. 27. — Pp. 3207–3210.
13. Krupčík J., Gorovenko R., Špánik I., Armstrong D. W., Sandra P. Enantioselective comprehensive two-dimensional gas chromatography of lavender essential oil // *Journal of Separation Science*. — 2016. — Vol. 39. — Pp. 4765–4772.
14. Kuppler R. J., Timmons D. J., Fang Q.-R., Li J.-R., Makal T. A., Young M. D., Yuan D., Zhao D., Zhuang W., Zhou H. -C. Potential applications of metal-organic frameworks // *Coordination Chemistry Reviews*. — 2009. — Iss. 253. — Pp. 3042–3066.
15. Meierhenrich U. J., Cason J. R. L., Szopa C., Sternberg R., Raulin F., Thiemann W. H. P., Goesmann F. Evaluating the robustness of the enantioselective stationary phases on the Rosetta mission against space vacuum vaporization // *Advances in Space Research*. — 2013. — Vol. 52 — Pp. 2080–2084.

16. Pino V., Lantz A. W., Anderson J. L., Berthod A., Armstrong D. W. Theory and use of the pseudophase model in gas-liquid chromatographic enantiomeric separations // *Analytical Chemistry*. — 2006. — Vol. 78. — Pp. 113–119.
17. Qiu H., Padivitage N. L., Frink L. A., Armstrong D. W. Enantiomeric impurities in chiral catalysts, auxiliaries, and synthons used in enantioselective syntheses // *Tetrahedron: Asymmetry*. — 2013. — Vol. 24. — Pp. 1134–1141.
18. Schurig V. Separation of enantiomers by gas chromatography. // *Journal of Chromatography A*. — 2001. — Iss. 906. — Pp. 275–299.
19. Shellie R., Marriott P. Opportunities for ultra-high resolution analysis of essential oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography: a review. *Flavour Fragrance Journal*. — 2003. — Vol. 18. — Pp. 179–191.
20. Waldhier M. C., Almstetter M. F., Nürnberger N., Gruber M. A., Dettmer K., Oefner P. J. Improved enantiomer resolution and quantification of free d-amino acids in serum and urine by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. — 2011. — Iss. 1218. — Pp. 4537–4544.
21. Xie S. M., Yuan L. M. Recent progress of chiral stationary phases for separation of enantiomers in gas chromatography // *Journal of Separation Science*. — 2017. — Vol. 40. — Pp. 124–137.
22. Xie S.-M., Zhang J.-H., Fu N., Wang B.-J., Chen L., Yuan L.-M. A chiral porous organic cage for molecular recognition using gas chromatography // *Analytica Chimica Acta*. — 2016. — Iss. 903. — Pp. 156–163.
23. Xie S.-M., Zhang X.-H., Zhang Z.-J., Yuan L.-M. Porous chiral metal-organic framework InH (D-C10H14O4) 2 with anionic-type diamond network for high-resolution gas chromatographic enantioseparations // *Analytical Letters*. — 2013. — Vol. 46. — Pp. 753–763.
24. Xie S.-M., Zhang X.-H., Zhang Z.-J., Zhang M., Jia J., Yuan L.-M. A 3-D openframework material with intrinsic chiral topology used as a stationary phase in gas chromatography // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2013. — Iss. 405. — Pp. 3407–3412.
25. Xie S.-M., Zhang Z.-J., Wang Z.-Y., Yuan L.-M. Chiral metal-organic frameworks for high-resolution gas chromatographic separations // *Journal of the American Chemical Society*. — 2011. — Vol. 133. — Pp. 11892–11895.
26. Xie S., Wang B., Zhang X., Zhang J., Zhang M., Yuan L. Chiral 3D Open-Framework Material Ni (D-cam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> used as GC stationary phase // *Chirality*. — 2014. — Vol. 26. — Pp. 27–32.
27. Yuan L. M., Zhou Y., Zhang Y. H., Zi M., Chang Y. X., Xu Z. G., Ren C. X. Cellulose derivatives used as chiral stationary phases in capillary gas chromatography // *Analytical Letters*. — 2006. — Vol. 39. — Pp. 173–182.
28. Yuan L., Fu R., Tan N., Ai P., Zhou J., Wu P., Zi M. Separation of the cyclopeptide heterophyllin B by high-speed countercurrent chromatography and its application as a new stationary phase for capillary gas chromatography // *Analytical Letters*. — 2002. — Vol. 35. — Pp. 203–212.
29. Yusuf K., Aqel A., Allothman Z. Metal-organic frameworks in chromatography // *Journal of Chromatography A*. — 2014. — Iss. 1348. — Pp. 1–16.
30. Zhang J.-H., Xie S.-M., Chen L., Wang B.-J., He P.-G., Yuan L.-M. Homochiral porous organic cage with high selectivity for the separation of racemates in gas chromatography // *Analytical Chemistry*. — 2015. — Vol. 87. — Pp. 7817–7824.
31. Zhang J.-H., Xie S.-M., Wang B.-J., He P.-G., Yuan L.-M. Highly selective separation of enantiomers using a chiral porous organic cage // *Journal of Chromatography A*. — 2015. — Iss. 1426. — Pp. 174–182.

32. Zhang X.-H., Xie S.-M., Duan A.-H., Wang B.-J., Yuan L.-M. Separation performance of MOFs Zn (ISN) 2  $2\text{H}_2\text{O}$  as stationary phase for high-resolution GC // *Chromatographia*. — 2013. — Vol. 76. — Pp. 831–836.
33. Zhang Y., Breitbach Z. S., Wang C., Armstrong D. W. The use of cyclofructans as novel chiral selectors for gas chromatography // *Analyst*. — 2010. — Vol. 135. — Pp. 1076–1083.
34. Zhang Y., Armstrong W. D. 4,6-Di-O-pentyl-3-O-trifluoroacetyl/propionyl cyclofructan stationary phases for gas chromatographic enantiomeric separations // *Analyst*. — 2011. — Vol. 136. — Pp. 2931–2940.
35. Zhao L., Ai P., Duan A.-H., Yuan L.-M. Single-walled carbon nanotubes for improved enantioseparations on a chiral ionic liquid stationary phase in GC // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2011. — Iss. 399. — Pp. 143–147.

Учебное издание

**Чучелкин Илья Валерьевич,  
Фирсин Илья Дмитриевич**

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА.  
ХИРАЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ**

Учебное пособие

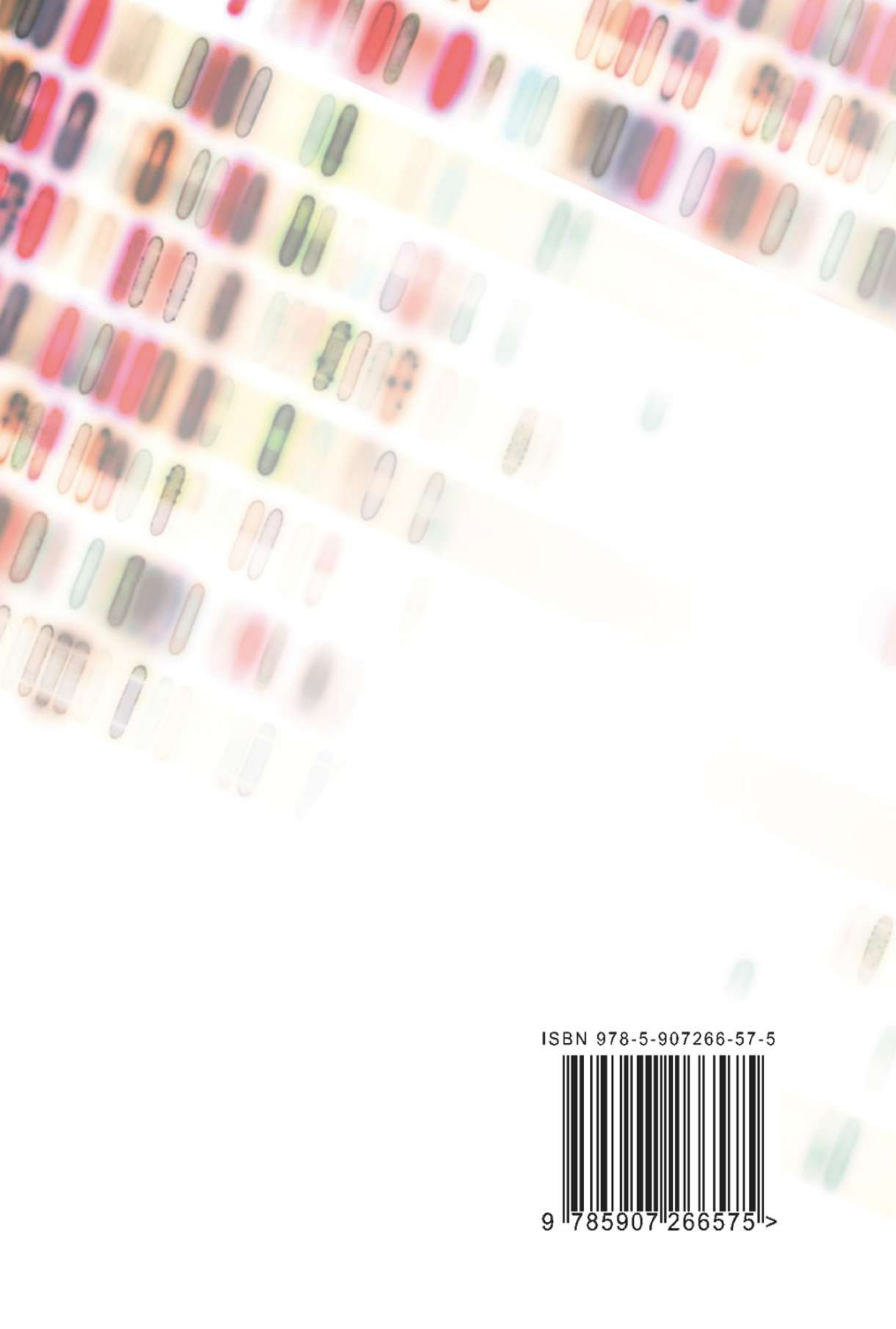
Редактор *К. А. Красовская*  
Технический редактор *Н. В. Кулешова*

Подписано в печать 12.04.2021. Бумага офсетная. Формат 60х84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Гарнитура Times New Roman. Печать трафаретная, цифровая.  
Усл. печ. л. 4,88. Уч.-изд. л. 5,4. Тираж 100 экз. Заказ № 29.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Рязанский государственный университет имени С. А. Есенина»  
390000, г. Рязань, ул. Свободы, 46



Редакционно-издательский центр РГУ имени С. А. Есенина  
390023, г. Рязань, ул. Ленина, 20а



ISBN 978-5-907266-57-5



9 785907 266575 >