

На правах рукописи



Федорова Ирина Александровна

**ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ И СМЕШАННЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ
ЭРЕМОМИЦИНА ДЛЯ ХИРАЛЬНОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ имени М.В. Ломоносова).

Научный руководитель:

Шаповалова Елена Николаевна

кандидат химических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Даванков Вадим Александрович

доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией стереохимии
сорбционных процессов ФГБУН «Институт
элементоорганических соединений им.
А.Н. Несмеянова» Российской академии наук

Лебедева Маргарита Владимировна

кандидат химических наук, руководитель отдела
физико-химических методов анализа
Испытательная лаборатория ООО «ОЛФАРМ»

Ведущая организация:

**ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет»**

Защита состоится 7 июня 2017 г. в 15 ч. 00 мин. в аудитории 446 химического факультета на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 3, химический факультет.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте химического факультета <http://www.chem.msu.ru>. Текст автореферата размещен на сайте ВАК России <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д 501.001.88,
кандидат химических наук



Моногорова О.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Хиральная высокоэффективная жидкостная хроматография (ХВЭЖХ) – один из наиболее распространенных методов разделения энантиомеров хиральных соединений. Синтез новых фармацевтических субстанций, представляющих собой один из изомеров вещества, получение на их основе новых лекарственных препаратов, а также необходимость контроля наличия в таких лекарственных препаратах второго изомера, все эти факторы, предъявляют новые требования к современному хроматографическому разделению изомеров. Для решения этой задачи необходимо более подробное изучение уже известных хиральных неподвижных фаз, а также синтез новых недорогих хиральных сорбентов для решения определенных задач. Поэтому, разработка новых хиральных неподвижных фаз, а также расширение области применения уже известных сорбентов очень *актуальны*.

Один из распространенных типов хиральных неподвижных фаз – силикагель, модифицированный хиральным селектором, в роли которого могут выступать вещества различных классов соединений, в том числе антибиотики, белки, полисахариды и др. Макроциклические антибиотики, наряду с циклодекстринами и полисахаридами, являются одними из наиболее часто используемых хиральных селекторов в ХВЭЖХ. Важно выбрать такой селектор, который позволит разделить энантиомеры заданного класса соединений или одного конкретного соединения, и его закрепление на матрице сорбента не требует сложного и дорогого многостадийного синтеза, а полученный сорбент будет стабилен в широком диапазоне варьируемых условий элюирования.

В газовой хроматографии показано, что улучшить разделение энантиомеров позволяет использование смешанных хиральных неподвижных фаз. Особенностью таких сорбентов является наличие нескольких селекторов, закрепленных на матрице, а их достоинством – более широкая область применения сорбентов благодаря наличию сразу нескольких селекторов, каждый из которых может разделять энантиомеры веществ определенного класса. Вдобавок, селекторы могут быть закреплены на поверхности матрицы разными способами, в зависимости от особенностей структуры самого селектора. Смешанные хиральные неподвижные фазы применимы для решения большего количества задач, по сравнению с сорбентами с одним селектором, что особенно *актуально*, поскольку существующие на данный момент коммерчески доступные хиральные сорбенты дороги и применимы для разделения энантиомеров веществ небольшого числа классов соединений. Стоит отметить, что в литературе есть только несколько работ по применению хиральных сорбентов с несколькими селекторами в ВЭЖХ.

Таким образом, *актуальность* работы определяется потребностью в разработке новых хроматографических хиральных сорбентов, в том числе с несколькими селекторами, для разделения широкого круга оптически активных соединений, а также расширением областей применения уже известных хиральных сорбентов.

Цель работы заключалась в изучении свойств хирального сорбента с эремомицином в качестве селектора, получении на его основе новых смешанных хиральных сорбентов и их применении для разделения энантиомеров различных классов оптически активных веществ.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить возможность разделения энантиомеров веществ различных классов, ранее не изученных на хиральном сорбенте с антибиотиком эремомицином;

- решить ряд фармацевтических задач по определению энантиомерной чистоты лекарственных средств, используя сорбент с эремомицином;
- оценить альтернативный способ иммобилизации эремомицина на силикагель с помощью наночастиц золота;
- разработать и оптимизировать методы синтеза смешанных хиральных сорбентов с эремомицином в качестве одного из хиральных селекторов и белка или другого антибиотика в качестве второй хиральной составляющей на силикагелевой матрице;
- изучить возможность применения полученных смешанных хиральных сорбентов в качестве неподвижной фазы для ВЭЖХ для разделения оптических изомеров различных классов соединений;
- апробировать новые синтезированные смешанные сорбенты при анализе лекарственных средств, в том числе в биологических жидкостях.

Научная новизна работы. Подобраны условия разделения энантиомеров трет-бутоксикарбонил- (БОК), бензоил-, бензилоксикарбонил- (КБЗ) производных аминокислот, производных α -фенилкарбоновых кислот, пиридотиодиазина на хиральном сорбенте на основе силикагеля, модифицированного эремомицином. Предложены методики определения энантиомерной чистоты лекарственного средства пеметрексед и экспериментального препарата на основе N-ацетил-L-глутамината на сорбенте с эремомицином.

Синтезирован смешанный хиральный сорбент на основе силикагеля, модифицированного одновременно эремомицином и ванкомицином. Показана возможность разделения на таком сорбенте энантиомеров β -блокаторов и аминокислот в обращенно-фазовом (ОФ) режиме ВЭЖХ, установлены особенности их удерживания.

Синтезирован смешанный хиральный сорбент на основе силикагеля, модифицированного эремомицином и бычьим сывороточным альбумином (БСА), оригинальность сорбента подтверждена патентом. Показана возможность разделения энантиомеров профенов и производных аминокислот на таком сорбенте в ОФ режиме ВЭЖХ, исследовано влияние состава подвижной фазы на энантиоселективность. Показана возможность разделения энантиомеров кетопрофена на синтезированном смешанном сорбенте в присутствии маркерных белков различной молекулярной массы, а также в искусственно созданных растворах кетопрофена в моче без предварительной пробоподготовки.

Предложен альтернативный способ закрепления эремомицина на силикагеле, модифицированном 3-меркаптопропилтриэтоксисиланом, через спейсер, содержащий наночастицы золота (НЧЗ).

Практическая значимость. В ходе работы расширена область применения хирального сорбента на основе силикагеля, модифицированного эремомицином. Практическую значимость имеют методики разделения энантиомеров БОК-, бензоил-, КБЗ-производных аминокислот, α -фенилкарбоновых кислот, методики определения энантиомерной чистоты лекарственных средств левалбутерол, пеметрексед и экспериментальных субстанций: на основе N-ацетил-L-глутамината и пиридотиодиазина.

В ходе работы синтезированы два новых смешанных хиральных сорбента для ВЭЖХ. Показана возможность разделения энантиомеров аминокислот, β -блокаторов на сорбенте на основе силикагеля, модифицированного одновременно эремомицином и ванкомицином. Показана возможность разделения энантиомеров производных

аминокислот, профенов, бензоина на сорбенте на основе силикагеля, модифицированного эремомицином и бычьим сывороточным альбумином. Практическую значимость имеет методика количественного определения энантиомеров кетопрофена в присутствии маркерных белков в анализируемом растворе.

На защиту выносятся:

- данные по влиянию состава подвижной фазы на удерживание энантиомеров БОК-, бензоил-, КБЗ-производных аминокислот, α -фенилкарбоновых кислот и разделение их энантиомеров на силикагеле, модифицированном эремомицином;
- методики определения энантиомерной чистоты ряда лекарственных средств на сорбенте с эремомицином;
- разработанные способы синтеза новых смешанных хиральных сорбентов для ВЭЖХ: эремомицин/ванкомицин и эремомицин/бычий сывороточный альбумин; способ закрепления эремомицина на силикагеле через наночастицы золота;
- результаты исследования синтезированных сорбентов комплексом физико-химических методов (методы элементного анализа, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), низкотемпературной адсорбции азота, спектроскопии диффузного отражения (ДО), спектрофотометрии, рентгено-флуоресцентного анализа с полным внешним отражением (РФА ПВО));
- данные по влиянию состава подвижной фазы на удерживание аминокислот и β -блокаторов и разделение их энантиомеров на силикагеле, одновременно модифицированном эремомицином и ванкомицином; сравнение энантиоразделения β -блокаторов на смешанном сорбенте и на сорбенте с ванкомицином;
- данные по влиянию состава подвижной фазы на удерживание профенов и производных аминокислот и разделение их энантиомеров на силикагеле, одновременно модифицированном эремомицином и БСА; сравнение энантиоразделения профенов, производных аминокислот, бензоина на смешанном сорбенте и на сорбенте с эремомицином;
- условия разделения кетопрофена в присутствии маркерных белков в анализе или в моче на сорбенте с эремомицином и БСА.

Апробация работы. XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2013" (Москва, 2013), Второй Съезд аналитиков России (Москва, 2013), 30 th International Symposium on Chromatography (Зальцбург, Австрия, 2014), Всероссийская конференция "Теория и практика хроматографии" с международным участием, посвященная памяти проф. М.С. Вигдергауза (Самара, 2015), 2nd Russian conference on medicinal chemistry (Новосибирск, 2015), I Всероссийская конференция с международным участием "Химический анализ и медицина" (Москва, 2015).

Публикации. Основное содержание работы изложено в 12 печатных работах: в 5 статьях, 6 тезисах докладов и 1 патенте.

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключается в постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов непосредственно автором, обработке, анализе и обобщении полученных результатов, написании статей, подготовке докладов и выступлениях на конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав обзора литературы, 1 главы экспериментальной части, 3 глав обсуждения результатов, общих

выводов и списка цитируемой литературы. Материал диссертации изложен на 181 странице машинописного текста, содержит 56 рисунков, 37 таблиц, в списке цитируемой литературы 153 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы систематизированы и обсуждены сведения из научных публикаций, посвященных макроциклическому антибиотику эремомицину и бычьему сывороточному альбумину, применяемых в качестве хиральных селекторов для разделения изомеров оптически активных веществ методами ВЭЖХ и капиллярного электрофореза (КЭ). Описаны основные способы синтеза хиральных сорбентов для ВЭЖХ с этими селекторами. Систематизированы основные классы оптически активных соединений, разделение энантиомеров которых возможно методом ВЭЖХ на хиральных сорбентах с эремомицином и сорбентах с БСА. Особое внимание уделено хиральным сорбентам с несколькими селекторами для разделения изомеров веществ методами ВЭЖХ и газовой хроматографии (ГХ). Показана перспективность использования бинарных хиральных сорбентов в ВЭЖХ для разделения энантиомеров веществ.

Экспериментальная часть

В качестве хиральных селекторов для синтеза сорбентов в работе использовали эремомицина гидрохлорид, ванкомицина гидрохлорид, бычий сывороточный альбумин. В качестве матриц для синтеза сорбентов использовали силикагель Kromasil 100-5-Sil (сферический, размер частиц 5 мкм, площадь поверхности 300 м²/г, размер пор 100 Å, «Ekachemicals», Швеция), аминированный силикагель Диасфер-110-амин (сферический, размер частиц 5 мкм, размер пор 110 Å, ЗАО «БиоХимМак СТ», Россия). Синтез смешанного сорбента с эремомицином и ванкомицином проводили путем модифицирования предварительно эпоксиактивированного силикагеля одновременно двумя антибиотиками. Синтез смешанного сорбента с эремомицином и БСА проводили на основе силикагеля, модифицированного эремомицином, с последующим нанесением БСА и обработкой сорбента глутаровым альдегидом.

Для разделения изомеров лекарственных средств использовали коммерческие колонки: Nautilus-E (250×4 мм, ЗАО «БиоХимМак СТ», Россия), диаметр зерна сорбента – 5 мкм, Chirobiotic TAG (250×4.6 мм, Supelco, Sigma-Aldrich, США), диаметр зерна - 5 мкм.

Исходные растворы стандартных образцов и фармацевтических субстанций: левалбутерола, альбутерола, пеметрекседа, фенотерола гидробромида, L-энантиомера пеметрекседа, гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутамината, пиридоптиадиазина готовили растворением точных навесок в ацетонитриле, метаноле, изопропанолу или воде.

Исходные растворы (0.2 – 1 мг/мл) пиндолола, метопролола, окспренолола, атенолола, альпренолола, надолола, лабетолола, кетопрофена, фенопрофена, ибупрофена, флурбипрофена, индопрофена готовили растворением точных навесок в ацетонитриле или метаноле. Растворы миндальной кислоты, α-метоксифенилпропионовой кислоты, 2-фенилпропионовой кислоты, бензоина готовили растворением точных навесок в воде или в смеси воды и ацетонитрила (ACN).

Исходные растворы аминокислот и производных аминокислот (0.5 – 1 мг/мл): метионина, треонина, триптофана, варфарина, фенилаланина, дигидроксифенилаланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, ацетилглутаминовой кислоты, фенилглицина, бензоил-аланина, бензоил-валина, бензоил-метионина, бензоил-

фенилаланина, бензоил-аргинина, КБЗ-валина, КБЗ-аланина, КБЗ-фенилаланина, КБЗ-метионина, КБЗ-лейцина, КБЗ-норлейцина, КБЗ-аспарагиновой кислоты, КБЗ-аспарагина, КБЗ-триптофана, БОК-валина, БОК-триптофана, БОК-аланина, БОК-серина готовили растворением точных навесок в воде или в смеси воды и ацетонитрила.

В работе использовали жидкостной хроматограф LC-20 Prominence («Shimadzu», Япония) с диодно-матричным детектором SPD-M20A («Shimadzu», Япония). Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LC Solution фирмы «Shimadzu». Скорость подачи элюента составляла 0.5 – 1.5 мл/мин, объем петли дозатора – 20 мкл, ввод пробы осуществляли шприцом объемом 50 мкл. Перед использованием подвижную фазу дегазировали в ультразвуковой ванне «Сапфир 6580» (НПФ «Сапфир», Россия). рН водных растворов измеряли на рН-метре «рН-410» («Аквилон», Россия). Синтезированными сорбентами заполняли стальные колонки размером 100×4.6 мм и 150×4.6 мм при помощи насоса «Knauer K-1900» под давлением 200 – 300 бар суспензионным способом.

Изучение физико-химических свойств синтезированных сорбентов

Для контроля процесса модифицирования силикагеля и оценки некоторых свойств полученных сорбентов в работе использовали следующие физико-химические методы анализа: элементный анализ, сканирующая электронная микроскопия, метод низкотемпературной адсорбции азота, спектроскопия диффузного отражения, спектрофотометрия, рентгено-флуоресцентный анализ с полным внешним отражением.

Установлено, что суммарное содержание антибиотиков на грамм эпоксиактивированного силикагеля на смешанном хиральном сорбенте с эремомицином и ванкомицином близко к содержанию эремомицина на сорбенте только с одним селектором, которое составило 115 мг/г.

Содержание БСА, полученное методом спектрофотометрии, на смешанном сорбенте с эремомицином и БСА составило 68 мг/г, методом РФА ПВО – 36 мг/г. Более селективным является метод РФА ПВО, результаты полученные данным методом более достоверны. Вероятно, закрепление БСА происходит в результате физической адсорбции. О наличии БСА на смешанном сорбенте говорят микрофотографии (рис. 1) и результаты, полученные методом адсорбции азота (табл. 1). Заметно увеличение площади поверхности сорбента с эремомицином и БСА по сравнению с сорбентом только с эремомицином за счет появления объемной молекулы белка на его поверхности.

Одинаковые значения объема и размера пор таких сорбентов подтверждают факт, что молекулы белка не попадают в поры сорбента, а адсорбируются только на его поверхности. Наличие характерных максимумов в спектрах ДО подтверждает модифицирование силикагеля селекторами (рис 1.).

Таблица 1. Исследование поверхности синтезированных хиральных сорбентов методом низкотемпературной адсорбции азота.

Сорбент	Площадь поверхности, м ² /г	Объем пор, см ³ /г	Диаметр пор, Å
Силикагель	300	0.90	100
Силикагель/эремомицин	219	0.42	76
Силикагель/эремомицин-БСА	230	0.43	76

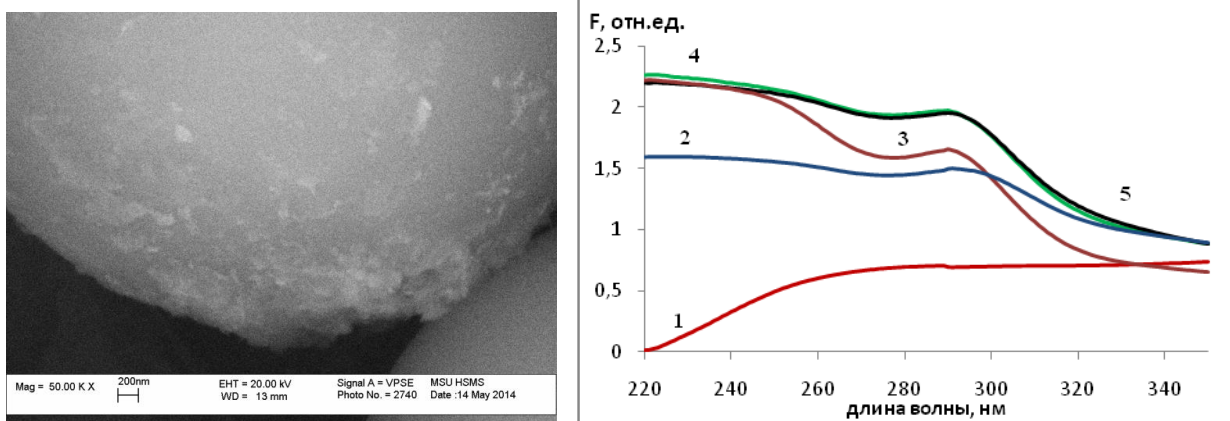


Рис. 1. Микрофотография (СЭМ) силикагеля, модифицированного эремомицином и БСА и спектры ДО синтезированных сорбентов: 1 – силикагель, 2 – силикагель/БСА, 3 – силикагель/эремомицин-ванкомицин, 4 – силикагель/эремомицин, 5 – силикагель/эремомицин-БСА.

Обсуждение результатов

Расширение области применения хирального сорбента с эремомицином

Получено разделение таких классов соединений, как БОК-, бензоил-, КБЗ-производные аминокислот, α -фенилкарбоновых кислот, а также разработаны методики определения энантиомерной чистоты ряда фармпрепаратов и фармсубстанций, среди которых пеметрексед и левалбутерол, а также экспериментальных препаратов гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутамината и пиридотиадиазина.

Разделение оптических изомеров производных аминокислот

Одна из наиболее часто решаемых задач в хиральной хроматографии – разделение производных аминокислот. Ранее на силикагеле, модифицированном эремомицином, изучено энантиоразделение дансильных производных аминокислот. Нами получено разделение энантиомеров бензилоксикарбонил-, бензоил-, трет-бутоксикарбонил-производных аминокислот на сорбенте с эремомицином (экспериментальная колонка 100*4.6 мм) в ОФ режиме ВЭЖХ. Подвижная фаза (ПФ): 50 мМ фосфатный буферный раствор (ФБ) (рН 7.0 или 8.0) в смеси с метанолом или изопропанолом (1 – 30 об. %).

Показано, при усложнении структуры производного исследованных аминокислот (в ряду БОК < бензоил- < КБЗ) происходит увеличение удерживания, разрешения пиков и селективности. При этом, увеличение удерживания и разрешения пиков при переходе от БОК- к бензоил-производным более заметно, чем при переходе от бензоил- к КБЗ-производным. Это согласуется с усложнением структуры заместителя, а именно, с появлением в ней ароматического кольца. Среди всех исследованных производных аминокислот наиболее удерживаемыми в идентичных условиях являются КБЗ-производные, вероятно, наличие в их структуре бензольного кольца и карбонильной группы, позволяет реализовывать наиболее сильное взаимодействие сорбата с эремомицином.

На примере КБЗ-производных изучено влияние природы аминокислоты (табл. 2) на разделение энантиомеров. Удерживание КБЗ-производных увеличивается в ряду (в скобках указаны значения факторов удерживания для первого энантиомера, подвижная фаза: iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 8), 10/90): аспарагиновая кислота (1.18) < валин (1.55) <

аспарагин (1.58) < аланин (1.67) < метионин (1.90) < лейцин (2.36) < норлейцин (2.46) < фенилаланин (4.91). Внутри одного класса производных аминокислот увеличение удерживания энантиомеров на сорбенте происходит по мере усложнения структуры и увеличения молекулы аминокислоты, при этом разрешение пиков энантиомеров увеличивается по мере увеличения гидрофобности производных аминокислот.

Таблица 2. Хроматографические параметры разделения энантиомеров КБЗ-производных аминокислот (0.5 мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомицин при различном содержании органического модификатора в подвижной фазе: iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 8), 0.5 мл/мин.

Вещество	Объемная доля изопропанола, %	k'	R_s	α
КБЗ-DL-валин	10	1.55	2.62	3.91
	20	1.13	1.91	3.92
	30	0.58	1.91	3.60
КБЗ- DL-аланин	10	1.67	3.81	4.17
	20	1.22	3.42	4.01
	30	0.52	1.16	3.29
КБЗ- DL-метионин	10	1.90	2.31	3.15
	20	1.22	1.57	3.30
	30	0.52	1.16	3.29
КБЗ- DL-лейцин	10	2.36	2.81	4.32
	20	1.60	3.11	4.46
	30	0.71	2.51	4.33
КБЗ- DL-норлейцин	10	2.46	3.01	3.99
	20	1.57	2.85	4.30
	30	0.60	2.55	4.22
КБЗ- DL-аспарагиновая кислота	10	1.18	0.39	1.25
	20	1.07	0.10	1.15
	30	0.80	-	-
КБЗ- DL-аспарагин	10	1.58	2.63	2.69
	20	1.29	3.02	2.71
	30	0.83	2.51	2.69
КБЗ- DL-фенилаланин	10	4.91	7.31	7.26
	20	3.78	5.60	7.48
	30	1.46	3.20	7.46

k' – фактор удерживания первого элюируемого компонента

Замена изопропанола в ПФ на метанол приводит к увеличению удерживания производных аминокислот, улучшению хроматографических параметров, при этом резко увеличивается время анализа. Увеличение органического модификатора в подвижной фазе приводит к уменьшению удерживания веществ и разрешения пиков энантиомеров (табл. 2).

Разделение энантиомеров α -фенилкарбоновых кислот

Исследовано разделение энантиомеров миндальной, α -метоксифенилуксусной и α -фенилпропионовой кислот на силикагеле, модифицированном эремомицином (экспериментальная колонка 100*4.6 мм) при их элюировании смесями ацетонитрила (содержание 30 – 40 %) и водного раствора дигидрофосфата калия (50 мМ, рН 4.7). Удерживание кислот на сорбенте с эремомицином увеличивается в ряду: 2-фенилпропионовая кислота < α -метоксифенилуксусная кислота < миндальная кислота,

вероятно, это связано с появлением в структуре кислот полярных групп CH_3O - и OH - в α -метоксифенилуксусной и миндальной кислотах соответственно, взаимодействующих с активными центрами антибиотика. Лучше всего разрешены пики энантиомеров α -метоксифенилуксусной кислоты (рис. 2).

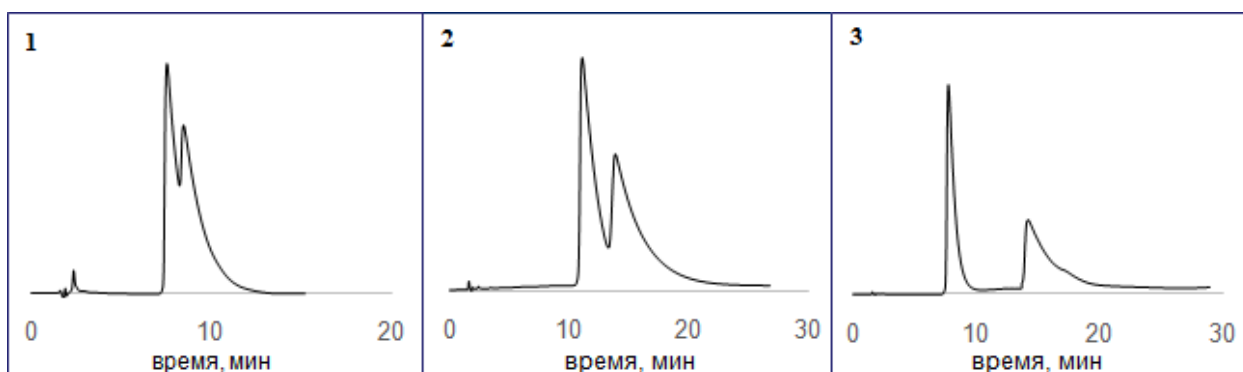


Рис. 2. Хроматограммы α -фенилкарбоновых кислот ($c=0.5$ мг/мл), полученных на сорбенте силикагель/эремомидин: 1 – α -фенилпропионовая кислота, 2 – миндальная кислота, 3 – α -метоксифенилуксусная кислота, ПФ: $\text{ACN}/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (50 мМ, pH 4.7), 30/70, 0.5 мл/мин, 254 нм.

Разделение энантиомеров и определение энантиомерной чистоты лекарственных средств

Эремомидин как хиральный селектор пока не используется для оценки энантиомерной чистоты лекарственных средств из перечня частных статей Фармакопей разных стран, хотя отечественная коммерческая колонка (Nautilus-E, 250*4 мм) доступна и более дешева, чем зарубежные аналоги. Нами разработаны методики разделения энантиомеров для лекарственных средств – пеметрекседа и левалбутерола, которые лучше по некоторым характеристикам, чем описанные в литературных источниках, и для двух экспериментальных препаратов, исследование которых продолжается.

Пеметрексед

Пеметрексед (N-[4-[2-(2-амино-4,7-дигидро-4-оксо-1H-пиррол[2,3-d]пиримидин-5-ил)этил]бензоил]-L-глутаминовая кислота) (рис. 3) - антиметаболит, назначаемый при первичной злокачественной опухоли плевры, а также при немелкоклеточном раке лёгкого. Действующим веществом является L-изомер, содержание D-изомера не должно превышать 0.2 %.

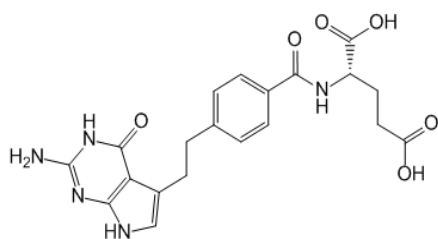


Рис. 3. Структурная формула пеметрекседа.

Исследовано разделение энантиомеров пеметрекседа на сорбенте силикагель/эремомидин (колонка Nautilus-E, 250*4 мм). Разделение энантиомеров проводили в обращенно-фазовом и полярно-органическом (ПО) режимах хроматографии. Для разделения энантиомеров в обращенно-фазовом режиме хроматографии в качестве подвижной фазы использовали смесь раствора дигидрофосфата аммония и органических растворителей – метанол (MeOH), ацетонитрил, в полярно-органическом режиме - органические растворители (метанол, ацетонитрил) с добавками кислот (ледяная уксусная кислота и муравьиная кислота) и оснований (триэтиламин (TEA) и диэтиламин (DEA)).

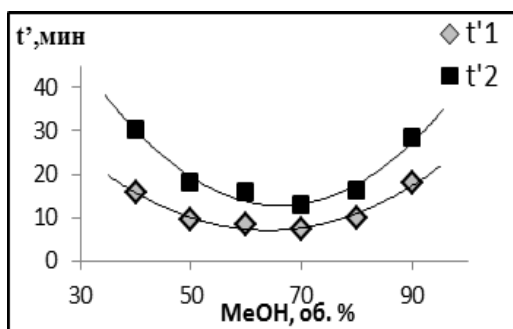


Рис. 4. Влияние содержания MeOH в ПФ (50 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 2.5, 1 мл/мин) на удерживание энантиомеров пеметрекседа ($c=0.2$ мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомицин.

Разделение возможно только в ОФ режиме ВЭЖХ при элюировании ПФ: ФБ/органический растворитель. Зависимость времени удерживания энантиомеров от содержания метанола проходит через минимум, который наблюдается при соотношении: метанол/ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 мМ, pH 2.5), 70/30 (рис. 4).

Разрешение пиков энантиомеров при увеличении содержания метанола в ПФ незначительно увеличивается и всегда больше 2.5. Увеличение pH ФБ от 2.5 до 4.5 приводит к увеличению времен удерживания энантиомеров и разрешения пиков, при этом пики заметно уширяются. Частичная или полная замена метанола на ацетонитрил в составе подвижной фазы приводит к незначительному уменьшению разрешения пиков, но сильно уменьшает удерживание веществ. Полученные закономерности характерны для хиральных сорбентов с макроциклическими антибиотиками. Лучшее энантиоразделение получено в следующих условиях: MeOH/ACN/ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 мМ, pH 2.5), 55/15/30, 1 мл/мин, детектирование при 230 нм. Время анализа составило 10 мин. Минимальная определяемая концентрация составила 0.0005 мг/мл, что соответствует 0.12 % от общего количества пеметрекседа в анализируемом растворе с концентрацией 2 мг/мл.

Проведена оценка энантиомерной чистоты фармацевтической субстанции пеметрексед. Анализ метанольного раствора субстанции пеметрексед, приготовленного в день анализа, показал, что вещество не содержит примеси D-изомера.

Левалбутерол

Левалбутерол применяется для профилактики и купирования бронхоспазма при бронхиальной астме, симптоматического лечения бронхообструктивного синдрома, ночной астмы и предупреждения преждевременных родов, представляет собой R-изомер альбутерола (рис. 5). Содержание S-альбутерола не должно превышать 0.2 %.

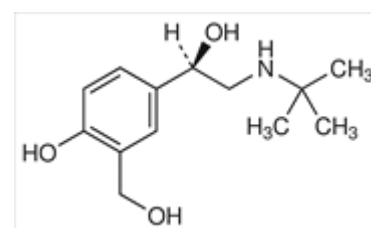


Рис. 5. Структура левалбутерола.

Исследовано разделение энантиомеров альбутерола на коммерческой колонке (Nautilus-E, 250*4 мм), оно возможно только в полярно-органическом режиме ВЭЖХ при элюировании смесями метанола и ацетонитрила с добавками кислот (уксусная кислота, муравьиная кислота, трифторуксусная кислота) и оснований (триэтиламин, трибутиламин (ТВА), диэтиламин). Лучшее разрешение пиков энантиомеров альбутерола на сорбенте, содержащем эремомицин, получили для подвижной фазы: MeOH/ACN/TEA/ CH_3COOH 80/20/0.075/0.025 об. %. Для увеличения значения R_s снизили скорость подачи подвижной фазы с 1 мл/мин до 0.5 мл/мин и достигли разрешения 1.2.

Экспериментальное лекарственное средство X-15 (гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутаминат)

Данный препарат обладает выраженным нейропротекторным действием в сочетании с антиоксидантной, противогипоксической, антиамнестической, противоукачивающей активностью и способностью улучшать когнитивные функции. Возможность частичной рацемизации в растворе препарата при хранении приводит к необходимости контроля содержания D-изомера, содержание которого по требованиям регламента не должно превышать 0.2 %.

Исследовано разделение энантиомеров N-ацетил-D,L-глутаминовой кислоты на сорбенте силикагель/эремомицин (Nautilus-E, 250*4 мм). N-ацетил-D,L-глутаминовая кислота удерживается на колонке заметно сильнее, чем D,L-глутаминовая кислота, что связано с образованием дополнительных водородных связей между кислородом ацетогруппы и амино- и гидроксильными группами в молекуле эремомицина. В процессе подбора условий энантиоразделения варьировали природу и объемную долю органического растворителя (метанола или ацетонитрила), pH и концентрацию фосфатного буферного раствора ПФ. Состав рекомендуемой ПФ: ACN/NaH₂PO₄ (0.10 M, pH 3), 30/70, 1.5 мл/мин, детектирование при 210 нм. Время анализа составило 18 мин, минимальная определяемая концентрация – 0.0005 мг/мл, что соответствует 0.14 % D-формы по отношению к общему количеству кислоты в растворе с концентрацией 2 мг/мл.

Проведена оценка энантиомерной чистоты двух образцов экспериментальной субстанции (рис. 6, а) и раствора субстанции в воде с исходной концентрацией 50 мг/мл, стерилизованного при 120° С (рис. 6, б).

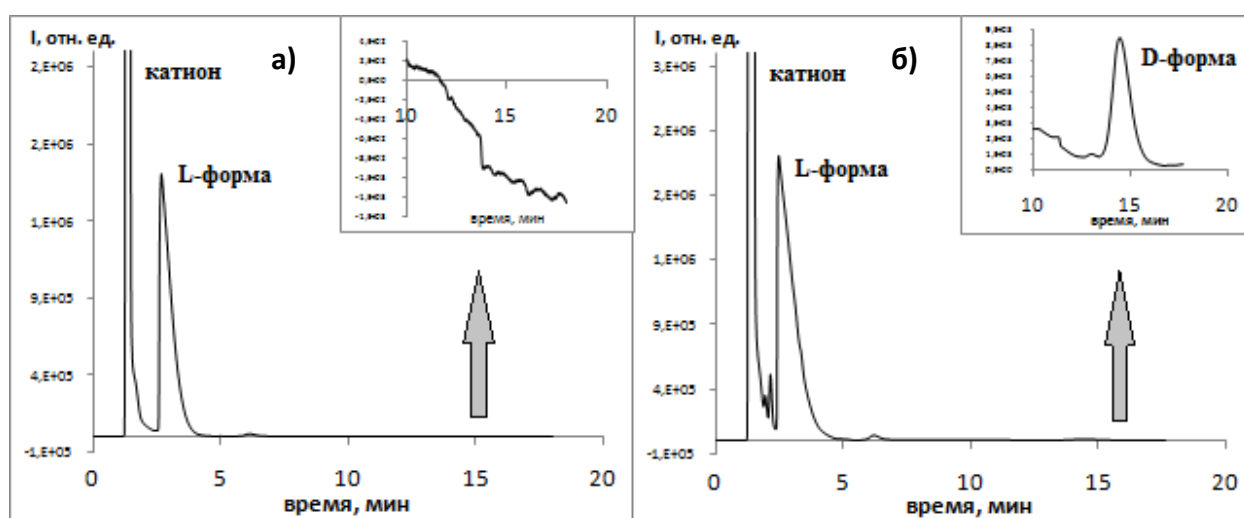


Рис. 6. Общий вид хроматограмм и увеличенный пик D-формы гидроксипиридиния N-ацетил-глутамината ($c=25$ мг/мл), полученные на сорбенте силикагель/эремомицин: а) образец экспериментальной субстанции, б) стерилизованный раствор. ПФ: ACN/NaH₂PO₄ (0.10 M, pH 3), 30/70, 1.5 мл/мин, 210 нм.

Экспериментальная субстанция не содержит примеси D-формы, а в ее растворе после стерилизации происходит частичная рацемизация, концентрация D-изомера составила 0.47 ± 0.04 % ($n=3$, $P=0.95$).

Экспериментальный препарат - пиридоптиадиазин

Пиридоптиадиазин (8-(4-((4-хлоробензил)окси)фенил)-3-(2,4-димето-ксифенил)-6-оксо-2,3,4,6,7,8-гексагидропиридо[2,1-b][1,3,5]тиадиазен-9-карбонитрил) - новый препарат против вируса клещевого энцефалита.

Разделение энантиомеров препарата проводили в ПО и ОФ режимах. В качестве ПФ в ПО режиме использовали органические растворители (метанол, ацетонитрил) с добавками ледяной уксусной кислоты и триэтиламина. Слабое удерживание вещества на сорбенте в данном режиме хроматографии не позволило разделить энантиомеры. Энантиоразделения этого препарата достигли в ОФ режиме хроматографии. В качестве ПФ использовали смеси раствора дигидрофосфата аммония или уксусной кислоты с органическими растворителями (метанол, ацетонитрил и изопропанол). Лучшее разделение энантиомеров пиридотиодиазина ($R_s = 0.73$, $\alpha = 1.4$) получено в следующих условиях: подвижная фаза — MeOH/CH₃COOH (5 мМ, pH 3.5), 70/30, 1 мл/мин, детектирование при 300 нм.

Смешанные хиральные сорбенты на основе эремомицина

Поиск универсального сорбента, который можно использовать для энантиоразделения большинства классов оптических соединений, стимулировал появление, так называемых, смешанных хиральных неподвижных фаз, которые содержат не один, а сразу несколько селекторов. Сочетание селекторов в неподвижной фазе определяется в значительной степени двумя факторами: способностью дополнять энантиоселективные свойства друг друга и схожесть их иммобилизации на матрицу (в нашей работе — силикагель). Поэтому при создании смешанных сорбентов, где первым селектором служит эремомицин, в качестве второго использовали макроциклический антибиотик ванкомицин (он проявляет энантиоселективность к другим классам соединений) и бычий сывороточный альбумин (большая белковая молекула, не проникающая в поры силикагеля). Модифицирование силикагеля для всех этих селекторов проводят в близких условиях.

Смешанный хиральный сорбент — силикагель/эремомицин-ванкомицин

Разделение энантиомеров β -блокаторов. Для элюирования β -блокаторов использовали смесь ацетонитрила, метанола и триэтиламинацетатного буферного раствора (ТЕАА). Объемную долю буферного раствора варьировали от 1 до 5 об. %, концентрацию в интервале 0.01–0.20 об. %, соотношение метанол/ацетонитрил в подвижной фазе — от 10/90 до 20/80.

Увеличение объемной доли метанола в смеси метанол/ацетонитрил от 10 до 20 об. % в ПФ MeOH/ACN : ТЕАА (0.1 %, pH 4.5), (95 : 5) об. %, уменьшает удерживание β -блокаторов на сорбенте, при этом для большинства β -блокаторов селективность разделения и разрешение пиков энантиомеров практически не изменяются, и лишь для более удерживаемых блокаторов (лабетолол, атенолол) эти параметры уменьшаются. Вероятно, природа органического модификатора ПФ влияет на неспецифические взаимодействия, определяющие удерживание веществ на поверхности сорбента, но не сказывается на энантиоселективности.

Увеличение объемной доли ТЕАА в ПФ уменьшает удерживание блокаторов на сорбенте (табл. 3), селективность уменьшается, а большее разрешение пиков энантиомеров в зависимости от структуры блокаторов получено при различной объемной доле ТЕАА. Условия наилучшего разделения для метопролола: MeOH/ACN (20/80) : ТЕАА (0.1 %, pH 4.5), 98 : 2 (рис. 7).

При увеличении концентрации ТЕАА с 0.01 до 0.20 об. % факторы удерживания β -блокаторов уменьшаются. Селективность разделения также уменьшается при

увеличении концентрации ТЕАА до 0.1 об. %, а при дальнейшем увеличении не изменяется.

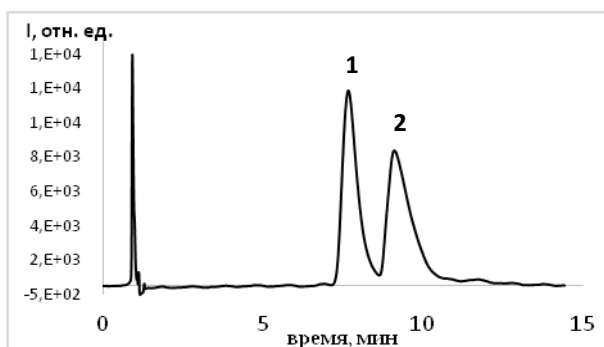


Рис. 7. Хроматограмма энантимеров метопролола (1, 2) ($c=0.3$ мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомидин-ванкомицин. ПФ: MeOH/ACN (20/80) : ТЕАА (0.1 %, pH 4.5), (98 : 2), 1 мл/мин, 280 нм.

Максимальное разрешение пиков энантимеров β -блокаторов получено для концентрации буферного раствора 0.05 – 0.10 об. %. Вероятно, основную роль в энантиораспознавании играют электростатические взаимодействия между карбоксильными группами антибиотиков и протонированными атомами азота в структуре β -блокаторов. Ион триэтиламмония вступает в конкурирующие взаимодействия с карбоксильными группами селектора и влияет на энантиоселективность.

Таблица 3. Влияние содержания ТЕАА в ПФ на разделение энантимеров β -блокаторов ($c=0.3$ мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомидин-ванкомицин. ПФ: MeOH/ACN(20/80) : ТЕАА (0.1%, pH 4.5), скорость потока 1 мл/мин.

Вещество	Объемная доля ТЕАА, %	k'	R_s	α
Метопролол	1	7.71	0.84	1.19
	2	6.83	1.29	1.21
	3	5.06	0.93	1.16
	5	3.08	0.65	1.12
Пиндолол	1	9.71	1.14	1.26
	2	8.17	0.61	1.14
	3	6.12	0.91	1.15
	5	3.33	0.53	1.12
Альпренолол	1	5.41	1.51	1.31
	2	4.40	1.44	1.32
	3	3.87	1.46	1.28
	5	2.66	0.62	1.11
Окспренолол	1	5.55	0.84	1.10
	2	5.43	0.96	1.16
	3	3.87	1.53	1.25
	5	2.61	0.64	1.11
Лабетолол	1	10.94	0.91	1.39
	2	10.29	0.48	1.20
	3	8.72	0.44	1.17
	5	4.94	0.68	1.20
Атенолол	1	21.13	0.52	1.16
	2	18.21	0.49	1.19
	3	12.19	0.57	1.39
	5	7.56	0.26	1.10

k' - фактор удерживания первого элюируемого энантиомера

Разделение энантимеров аминокислот. Элюирование аминокислот проводили смесью органических модификаторов (ацетонитрил, метанол, изопропанол) и растворов уксусной кислоты (УК) или дигидрофосфата калия. Объемную долю органического модификатора варьировали от 0.5 до 10 об. % при использовании дигидрофосфата калия в качестве буферного раствора, и от 1 до 20 об. % при использовании раствора уксусной кислоты.

На примере ПФ состава органический модификатор/раствор уксусной кислоты 3/97 об. % установлено, что роль природы органического модификатора в энантиораспознавании аминокислот незначительна и мало влияет на удерживание веществ на сорбенте, селективность и разрешение пиков энантимеров (рис. 8). В дальнейших исследованиях в качестве органической составляющей подвижной фазы использовали ацетонитрил.

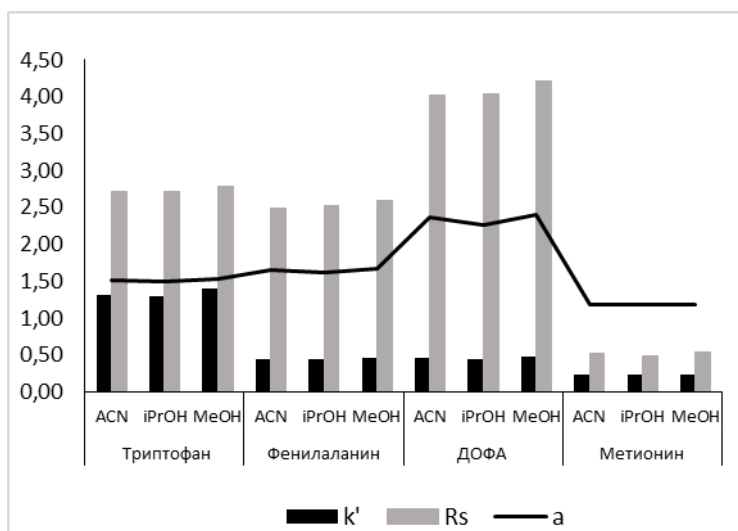


Рис. 8. Влияние природы органического модификатора на разделение энантимеров аминокислот на сорбенте силикагель/эремомицин-ванкомицин. ПФ: органический модификатор/УК (0.1 %), 3/97 об. %, 0.5 мл/мин. k' – фактор удерживания первого энантиомера; R_s – разрешение; α – селективность.

Увеличение концентрации раствора УК от 0.05 до 0.20 % незначительно уменьшает удерживание веществ на сорбенте, при этом разрешение пиков и селективность изменяются мало (табл. 4).

Таблица 4. Влияние концентрации уксусной кислоты в подвижной фазе на разделение энантимеров аминокислот ($c=1$ мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомицин-ванкомицин. Подвижная фаза: АСN/раствор уксусной кислоты, 3/97 об. %, скорость потока 0.5 мл/мин.

Вещество	Конц. раствора уксусной кислоты, об. %	k'	R_s	α
Триптофан	0.05	1.26	2.65	1.48
	0.10	1.32	2.72	1.52
	0.20	1.17	2.65	1.49
Фенилаланин	0.05	0.45	2.40	1.57
	0.10	0.45	2.49	1.66
	0.20	0.41	2.53	1.56
ДОФА	0.05	0.47	3.83	2.22
	0.10	0.47	4.02	2.37
	0.20	0.42	3.81	2.16
Метионин	0.05	0.25	0.50	1.19
	0.10	0.23	0.53	1.19
	0.20	0.22	0.47	1.19

k' – фактор удерживания первого элюируемого энантиомера

При замене в подвижной фазе УК (рН 3.5) на дигидрофосфат калия (рН 4.7) удерживание аминокислот, коэффициент селективности и разрешение пиков энантиомеров растут (рис. 9).

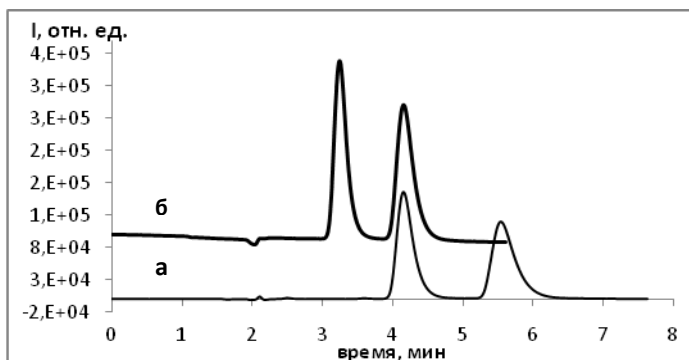


Рис. 9. Хроматограмма энантиомеров триптофана ($c=1$ мг/мл) на сорбенте силикагель/эремомицин-ванкомицин. ПФ: а) АСН/УК (0.1 об. %, рН 3.5), 10/90 об. %, 0.5 мл/мин, 254 нм. б) АСН/ KH_2PO_4 (50 мМ, рН 4.7), 10/90 об. %, 0.5 мл/мин, 254 нм.

При одинаковом содержании ацетонитрила в подвижной фазе (10 об. %) разрешение пиков энантиомеров триптофана увеличивается в 1.1, фенилаланина - в 1.4, ДОФА - в 1.4, а для метионина в 3.5 раза.

При увеличении доли ацетонитрила в подвижной фазе с 1 до 10 об. %, независимо от состава водного компонента, время удерживания аминокислот, селективность и разрешение пиков энантиомеров уменьшаются. Уменьшение этих параметров более заметно, если водный компонент подвижной фазы – раствор дигидрофосфата калия.

Полученные закономерности соответствуют режиму ОФ хроматографии и подтверждают, что в удерживание и разделение энантиомеров сорбатов на силикагеле, модифицированном ванкомицином и эремомицином, вносят вклад и гидрофобные взаимодействия.

Смешанный хиральный сорбент — силикагель /эремомицин - бычий сывороточный альбумин

Разделение энантиомеров профенов. Элюирование проводили в ОФ режиме ВЭЖХ смесями метанола с фосфатным буферным раствором.

Увеличение концентрации ФБ с 20 мМ до 100 мМ приводит к уменьшению удерживания профенов на сорбенте (табл. 5), что объясняется увеличением числа конкурирующих взаимодействий сорбента с фосфат-ионами подвижной фазы по сравнению с его взаимодействиями с аналитами. Такая же зависимость наблюдается и на сорбенте, содержащем только эремомицин. Большое удерживание веществ на сорбенте приводит к большому размыванию пиков, поэтому для дальнейших исследований использовали буферные растворы с концентрацией 0.10 М.

Таблица 5. Хроматографические параметры энантиомеров профенов ($c=0.5$ мг/мл) при различной концентрации буферного раствора, полученные на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА. Подвижная фаза: МеОН/ KH_2PO_4 (рН 4.5), 50/50, 0.5 мл/мин.

Профен	0.02 М				0.04 М				0.10 М			
	k_1'	k_2'	R_s	α	k_1'	k_2'	R_s	α	k_1'	k_2'	R_s	α
Кетопрофен	6.5	9.7	1.74	1.42	5.1	7.4	1.88	1.38	3.6	5.3	1.75	1.38
Ибупрофен	3.9	6.0	1.03	1.42	2.8	4.2	1.25	1.36	1.8	2.7	0.93	1.31
Индпрофен	8.6	14.1	2.14	1.58	4.7	7.5	1.71	1.50	4.3	6.7	1.74	1.46
Фенопрофен	7.1	9.1	0.79	1.24	4.9	6.2	1.08	1.22	3.2	4.0	0.82	1.19
Флурбипрофен	9.8	17.9	1.83	1.74	6.4	11.4	2.05	1.67	4.2	7.4	1.59	1.60

Зависимость селективности и разрешения пиков энантиомеров профенов от рН буферного раствора ПФ для смешанного хирального сорбента с эремомицином и БСА носит тот же характер, что и для сорбента с эремомицином. Зависимость немонотонна, имеет максимум (рис. 10).

Уменьшение рН подвижной фазы от 7.5 до 4.5 приводит к увеличению времени удерживания и разрешения пиков энантиомеров профенов. Дальнейшее снижение рН до 3.5 приводит к резкому снижению времени удерживания, вероятно, из-за изменений в поверхностном заряде сорбента, так как помимо эремомицина на поверхности сорбента присутствует БСА. Как и на сорбенте, содержащем только эремомицин, разделение оптических изомеров профенов на сорбенте с эремомицином и БСА следует осуществлять при значениях рН, близких к pK_a аналита. Для дальнейших исследований использовали фосфатный буферный раствор с рН 4.5.

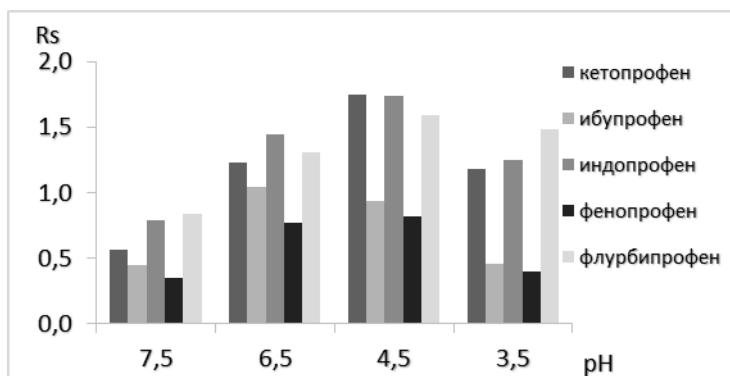


Рис. 10. Зависимость разрешения пиков профенов от рН буферного раствора ПФ на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА. ПФ: MeOH/ФБ (0.10 М) 50/50, 0.5 мл/мин, 220 нм.

Уменьшение доли органического модификатора в подвижной фазе приводит к заметному увеличению удерживания профенов (рис. 11, а), при этом увеличивается разрешение пиков энантиомеров (рис. 11, б), однако для ПФ с менее 50 об. % метанола характерно небольшое уменьшение разрешения пиков по сравнению с фазой, содержащей 50 об. %, что связано с увеличением длительности анализа и, таким образом, увеличением размывания пиков. Для большинства профенов наилучшее разделение достигнуто при 50 – 60 об. % метанола в ПФ.

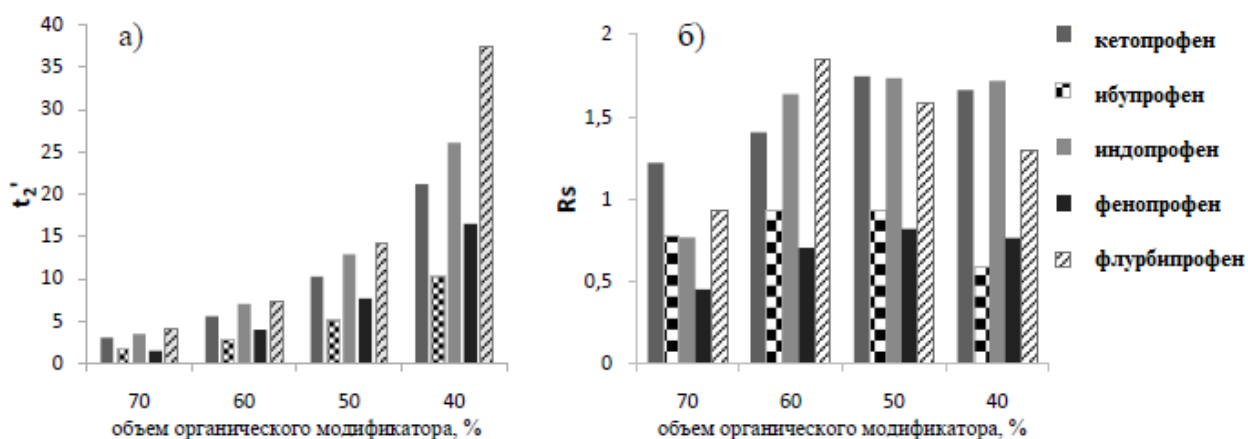


Рис. 11. Зависимость времени удерживания второго элюируемого энантиомера профена (а) и разрешения пиков (б) от объема органического модификатора в подвижной фазе на сорбенте силикагель/эремомицин-БСА. ПФ: MeOH/КН₂РО₄ (0.10 М, рН 4.5), 0.5 мл/мин, 220 нм.

Проведено разделение энантиомеров профенов в одинаковых условиях на сорбенте силикагель/эремомицин (колонка 100*4.6 мм) и сорбенте силикагель/эремомицин-БСА (колонка 100*4.6 мм) при их элюировании ПФ: MeOH/ФБ (100 мМ, рН 6.5), 50/50 об. %, 0.5 мл/мин, детектирование при 220 нм (табл. 6).

Наличие белка на поверхности смешанного сорбента, по сравнению с сорбентом только с эремомицином, приводит к уменьшению удерживания профенов. Это может быть связано с тем, что белок, находясь на поверхности силикагеля, закрывает часть протонированных amino-групп эремомицина, тем самым, уменьшая долю электростатических взаимодействий профена и антибиотика, при этом селективность осталась прежней. В то же самое время разрешение пиков на смешанном сорбенте немного выше, что, вероятно, связано с наличием дополнительных центров распознавания профенов из-за присутствия на поверхности белка.

Таблица 6. Хроматографические параметры энантиоразделения профенов ($c=0.5$ мг/мл), полученные на сорбентах силикагель/эремомицин-БСА и силикагель/эремомицин. ПФ: MeOH/ФБ (100 мМ, рН 6.5), 50/50 об. %, 0.5 мл/мин, 220 нм.

Вещество	Силикагель/ эремомицин-БСА				Силикагель/ эремомицин			
	k_1'	k_2'	R_s	α	k_1'	k_2'	R_s	α
Кетопрофен	1.5	2.4	1.23	1.33	2.2	3.3	0.96	1.34
Ибупрофен	0.9	1.5	1.05	1.31	1.3	2.0	0.54	1.29
Индопрофен	1.6	2.7	1.44	1.43	2.6	4.2	1.11	1.45
Фенопрофен	1.5	2.0	0.77	1.19	2.3	2.8	0.43	1.15
Флурбипрофен	1.7	3.4	1.30	1.64	2.9	5.5	1.36	1.68

Разделение энантиомеров производных аминокислот. Поведение бензоил-, БОК-, КБЗ-производных аминокислот на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-БСА сравнивали с их поведением на сорбенте силикагель/эремомицин. Элюировали соединения смесями iPrOH/ФБ (50 мМ, рН 8), где объемная доля изопропанола составляла 3 и 10 %, а скорость потока 0.5 мл/мин (табл. 7).

Практически для всех изученных производных аминокислот при переходе от сорбента с эремомицином к смешанному сорбенту происходит уменьшение удерживания энантиомеров веществ, разрешения пиков, а селективность практически не изменяется. Следует отметить, что эффективность экспериментальных колонок, заполненных обоими сорбентами близка, большие значения были получены при разделении энантиомеров профенов, и они достигают 2500 т.т./м. Можно предположить, что основную роль в разделении производных аминокислот играет хиральный селектор эремомицин, а БСА, находясь на поверхности, закрывает часть его центров распознавания.

Таблица 7. Хроматографические параметры производных аминокислот ($c=0.5$ мг/мл), полученные на сорбентах силикагель/эремодицин и силикагель/эремодицин-БСА ПФ: $iPrOH/ФБ$ (50 мМ, pH 8), 0.5 мл/мин.

Вещество	$iPrOH$, %	Силикагель/эремодицин				Силикагель/эремодицин-БСА			
		k_1'	k_2'	R_s	α	k_1'	k_2'	R_s	α
Бензоил-метионин	3	2.0	3.8	2.12	1.91	1.9	3.4	1.64	1.81
Бензоил-валин		1.4	2.4	1.56	1.80	1.3	2.2	1.22	1.72
КБЗ-лейцин	10	2.5	10.5	2.81	4.28	2.1	8.7	3.03	4.13
КБЗ-аспарагиновая		1.1	1.4	0.12	1.23	0.8	1.0	0.12	1.28
КБЗ-аспарагин		1.6	4.4	2.63	2.67	1.4	3.8	2.41	2.66
КБЗ-норлейцин		2.5	10.1	3.00	3.96	2.2	8.5	3.05	3.83
КБЗ-аланин		1.7	7.1	3.81	4.12	1.4	5.9	3.46	4.14
КБЗ-валин		1.6	6.3	2.62	3.86	1.4	5.2	1.96	3.75
БОК-триптофан		7.0	20.3	2.24	2.92	8.0	20.1	1.76	2.50
БОК-серин		1.2	1.9	0.77	1.55	1.1	1.7	0.73	1.55

Разделение энантиомеров профенов на смешанном сорбенте силикагель/эремодицин-БСА в присутствии белков в анализируемом растворе

Основное отличие сорбента с эремодицином и БСА от сорбента с эремодицином заключается в том, что на смешанном сорбенте БСА в качестве аналита не удерживается (рис. 12, а), а на сорбенте с эремодицином необратимо сорбируется, делая его непригодным для дальнейшего использования (рис. 12, б).

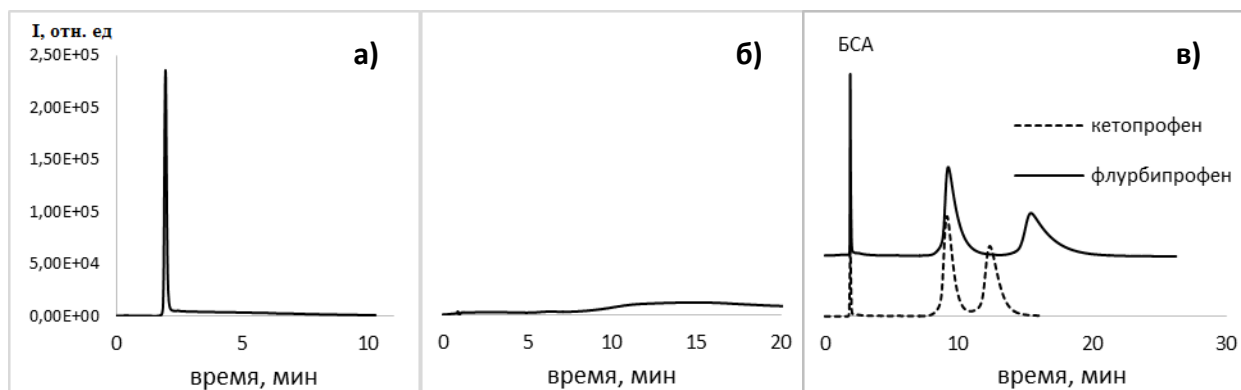


Рис. 12. Хроматограммы раствора БСА ($c=5$ мг/мл) на сорбентах силикагель/эремодицин-БСА (а), силикагель/эремодицин (б) и хроматограммы кетопрофена и флурбипрофена ($c=1$ мг/мл) в присутствии БСА в анализе на сорбенте силикагель/эремодицин-БСА (в). ПФ: $MeOH/KH_2PO_4$ (40 мМ, pH 4.5), 60/40, 0.5 мл/мин, 280 нм.

Такое преимущество смешанного сорбента использовали для проверки гипотезы о возможности энантиоразделения веществ в присутствии белка в анализируемом растворе. К анализируемым растворам профенов добавляли раствор БСА в воде (рис. 12, в). Пик БСА элюируется рано и не мешает разделению энантиомеров профенов на бинарном сорбенте.

Помимо БСА на сорбенте с эремодицином и БСА не удерживается и не мешает разделению энантиомеров профенов целый ряд маркерных белков с молекулярной массой

в диапазоне 13.7–669 кДа (рис. 13), что позволяет прогнозировать отсутствие удерживания на смешанном сорбенте и других белков, содержащихся в биологических жидкостях.

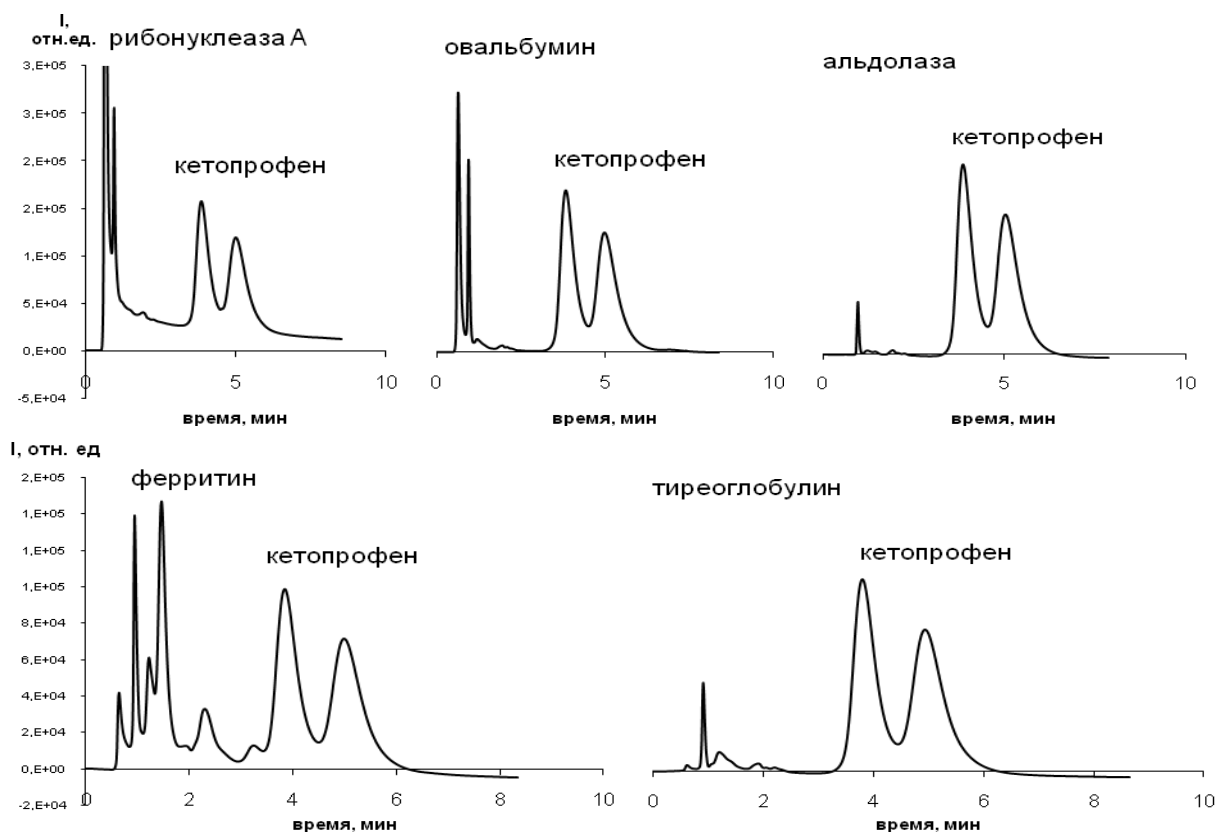


Рис. 13. Хроматограммы растворов кетопрофена с маркерными белками, полученные на бинарном сорбенте силикагель/эремомидин-БСА. ПФ: MeOH/KH₂PO₄ (100 мМ, pH 4.5), 50/50, 1 мл/мин, 210 нм.

Применение смешанного хирального сорбента силикагель/эремомидин-БСА для разделения энантиомеров профенов в моче

Результаты анализа кетопрофена в присутствии маркерных белков различной молекулярной массы на бинарном хиральном сорбенте с эремомидином и БСА дают право предполагать возможность беспрепятственного определения кетопрофена и в биологических жидкостях, в частности, в наиболее простой – моче.

На рис. 14 показаны хроматограммы смеси моча : вода (1:4) в присутствии и в отсутствие в ней кетопрофена.

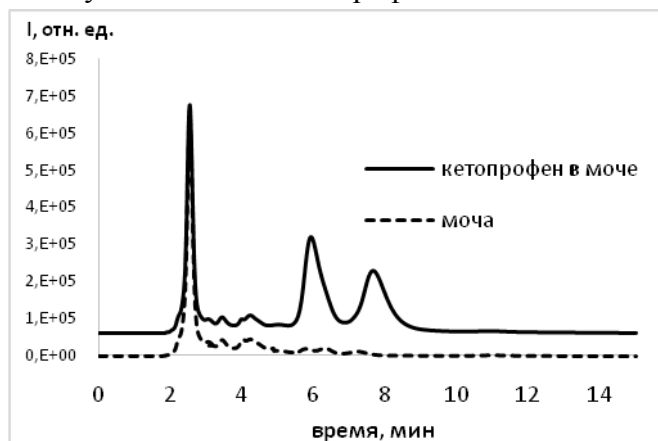


Рис. 14. Хроматограммы мочи и раствора кетопрофена в моче (0.4 мг/мл), полученные на сорбенте силикагель/эремомидин-БСА. ПФ: MeOH/KH₂PO₄ (100 мМ, pH 4.5), 60/40, 0.5 мл/мин, 254 нм.

Показано, что градуировочная зависимость площади пиков энантиомеров кетопрофена от его содержания в моче линейна, минимальная определяемая концентрация каждого из энантиомеров составила 14.2 мкг/мл, предел обнаружения – 8.5 мкг/мл. Найденное по градуировочной зависимости значение концентрации кетопрофена в модельном растворе мочи с добавкой кетопрофена 0.067 мг/мл составило 0.07 ± 0.01 ($n=3$, $P=0.95$).

Альтернативный способ закрепления эремомицина на силикагеле через наночастицы золота

По аналогии с работой (Полякова (Елфимова) Я.А. Новые наногибридные материалы на основе наночастиц золота для ВЭЖХ. // Дисс. канд. хим. наук. Москва. 2013. 190 с.) предложен способ закрепления эремомицина на силикагеле через наночастицы золота. Силикагель предварительно функционализировали 3-меркаптопропилтриметоксисиланом и обрабатывали последовательно НЧЗ, стабилизированными цитрат-ионами, меркаптопропионовой кислотой (МПК) и эремомицином. Получали сорбент $\text{SiO}_2\text{-S-Au-S-C(O)-NH-эремомицин}$.

Поверхность такого сорбента, судя по микрофотографиям и картам распределения (рис. 15, а – в) покрыта золотом, при этом имеются небольшое количество золотых агрегатов на поверхности. Судя по рис. 15 (б, в), атомы золота и серы равномерно распределены на сорбенте. В спектре ДО (рис. 15, г) наблюдается явно выраженный максимум при 540 нм, характерный для НЧЗ.

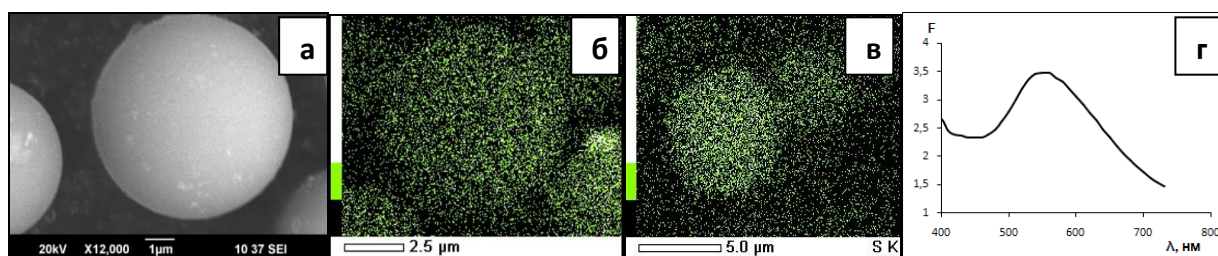


Рис. 15. Микрофотография СЭМ (а), карты распределения золота (б) и серы (в), спектр ДО (г) сорбента $\text{SiO}_2\text{-S-Au-S-C(O)-NH-эремомицин}$.

Сорбент $\text{SiO}_2\text{-S-Au-S-C(O)-NH-эремомицин}$ исследовали на примере различных классов соединений таких как, профены, β -блокаторы, дансильные производные аминокислот в ОФ и ПО режимах. К сожалению, эти вещества слабо удерживаются на колонке, разделить их энантимеры не удалось. Особое поведение проявила фармацевтическая субстанция — (1R)-2-[[(1R)-2-(4-гидроксифенил)-1-метил-этил]амино]-1-(3,5-дигидроксифенил)этанола гидробромид (Фенотерола гидробромид) — действующее вещество препаратов для лечения бронхиальной астмы (рис. 16).

На синтезированном сорбенте удалось добиться разделения (RR) и (SS)-энантиомеров фенотерола в ОФ режиме ВЭЖХ с использованием в качестве элюента смесей метанола и 0.5 об. % раствора фосфорной кислоты (рис. 17). Интересно отметить, что на сорбенте с эремомицином, закрепленным на эпокси-силикагеле, эти энантимеры не разделяются. Можно предположить, что в разделение изомеров вносят вклад взаимодействия между НЧЗ и аналитом.

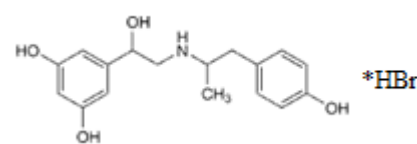


Рис. 16. Структура фенотерола гидробромид.

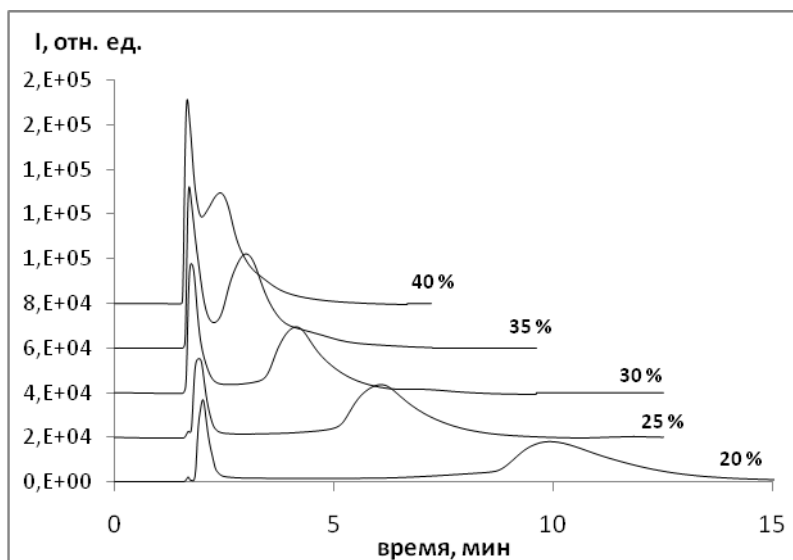


Рис. 17. Разделение оптических изомеров фенолового гидробромида (0.3 мг/мл) на сорбенте $\text{SiO}_2\text{-S-Au-S-C(O)-NH-эремомоцин}$. Подвижная фаза: $\text{MeOH}/\text{H}_3\text{PO}_4$ (0.5 об.%, pH 3.8). Содержание метанола (%) указано на хроматограмме. Скорость потока 0.5 мл/мин. $\lambda = 280$ нм.

ВЫВОДЫ

1. Проведено систематическое изучение удерживания и разделения энантиомеров бензилоксикарбонил- (R_s до 7.3), бензоил- (R_s до 6.6), трет-бутоксикарбонил- (R_s до 4.0) производных аминокислот на сорбенте с эремомоцином в условиях ОФ ВЭЖХ. Увеличение удерживания, разрешения пиков и селективности происходит по мере усложнения структуры производного в ряду трет-бутоксикарбонил- < бензоил- < бензилоксикарбонил-, внутри одного типа производных - по мере усложнения структуры и увеличения молекулы аминокислоты.

2. Предложены методики определения энантиомерной чистоты ряда лекарственных средств (пеметрексед, экспериментальный препарат X-15 гидроксипиридиния N-ацетил-L-глутаминат), на сорбенте с эремомоцином. Определена возможность разделения энантиомеров левалбутерола ($R_s=1.2$) и экспериментального препарата пиридотиодиазин на сорбенте с эремомоцином ($R_s=0.7$).

3. Разработаны новые смешанные хиральные сорбенты: силикагель, модифицированный одновременно антибиотиками эремомоцином и ванкомицином и силикагель, модифицированный эремомоцином и бычьим сывороточным альбумином. Модифицирование поверхности подтверждено рядом методов: элементного анализа, сканирующей электронной микроскопии, низкотемпературной адсорбции азота, спектроскопии диффузного отражения, спектрофотометрии, рентгено-флуоресцентного анализа с полным внешним отражением. Предполагается, что макроциклические антибиотики закреплены на поверхности силикагеля ковалентно, а бычий сывороточный альбумин в результате физической адсорбции.

4. Выбраны условия разделения энантиомеров класса β -блокаторов (R_s до 1.5) и аминокислот (R_s до 5.8) в обращенно-фазовом режиме на смешанном сорбенте силикагель/эремомоцин-ванкомицин. Выявлены особенности удерживания, из которых следует, что за разделение энантиомеров β -блокаторов отвечает ванкомицин, за разделение энантиомеров аминокислот – эремомоцин.

5. Исследовано влияние состава подвижной фазы на разделение различных по природе соединений и выбраны условия разделения профенов (R_s до 2.1), бензилоксикарбонил- (R_s до 3.5), бензоил- (R_s до 1.6), трет-бутоксикарбонил- (R_s до 1.8) производных аминокислот, бензоина (R_s до 3.3), на смешанном сорбенте

силикагель/эремомицин-бычий сывороточный альбумин. Удерживание веществ на смешанном сорбенте меньше по сравнению с силикагелем, модифицированным эремомицином, но разрешение энантиомеров профенов выше, и только на нем разделяются с высоким разрешением изомеры бензоина.

6. Показано, что на смешанном сорбенте силикагель/эремомицин-БСА в отличие от сорбента силикагель/эремомицин не удерживаются маркерные белки (рибонуклеаза А, овальбумин, бычий сывороточный альбумин, альдолаза, ферритин, тиреоглобулин) с диапазоном молекулярных масс 13.7 – 669 кДа, и их наличие в биологических жидкостях не мешает энантиоразделению профенов на сорбенте в условиях ОФ ВЭЖХ.

7. Предложена методика определения энантиомеров кетопрофена в модельных растворах мочи на сорбенте с эремомицином и бычьим сывороточным альбумином с пределом обнаружения 8.5 мкг/мл для каждого из изомеров без предварительной пробоподготовки.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Шпигун О.А., Шаповалова Е.Н., Староверов С.М., Федорова И.А. Сорбент для разделения оптических изомеров веществ и их анализа в биологических жидкостях методом ВЭЖХ и способ его получения. // Патент № 2592893 (заявка № 2014152938, приоритет изобретения 26.12.2014, зарегистрировано 06.07.2016, срок действия истекает 26.12.2034).
2. Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Староверов С.М., Шпигун О.А. Разделение энантиомеров производных аминокислот на силикагеле, модифицированном макроциклическим антибиотиком эремомицином. // Сорбц. хромат. процессы. 2015. Т. 15. № 6, С. 769 – 775.
3. Fedorova I.A., Shapovalova E.N., Shpigun O.A., Staroverov S.M. Bovine serum albumin adsorbed on eremomycin and grafted on silica as new mixed-binary chiral sorbent for improved enantioseparation of drugs. // J. Food Drug Anal. 2016. V. 24. P. 848 – 854.
4. Шаповалова Е.Н., Федорова И.А., Припорова А.А., Ананьева И.А., Шпигун О.А. Определение энантиомерной чистоты пеметрекседа на сорбентах с иммобилизованными макроциклическими антибиотиками. // Аналитика и контроль. 2016. Т. 20. № 2. С. 168 – 174.
5. Шаповалова Е.Н., Федорова И.А., Припорова А.А., Ананьева И.А., Шпигун О.А. Определение энантиомерной чистоты альбутерола на сорбентах, модифицированных макроциклическими антибиотиками. // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2: Химия. 2017. Т. 58. № 1. С. 20 – 27.
6. Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А. Разделение энантиомеров β -блокаторов и аминокислот на смешанном хиральном сорбенте, модифицированном макроциклическими антибиотиками эремомицином и ванкомицином. // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 1. С. 57 – 64.
7. Федорова И.А. Новый сорбент для ВЭЖХ на основе силикагеля, модифицированного наночастицами золота и макроциклическим антибиотиком эремомицином. // Тезисы докладов XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов-2013”. Москва, 8 – 13 апреля 2013. Электронный носитель.
8. Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Мажуга А.Г., Рудаковская П.Г., Шпигун О.А. Использование силикагеля, модифицированного наночастицами золота и

макроциклическим антибиотиком эремомицином, для разделения изомеров фармпрепаратов // Тезисы докладов Второго Съезда аналитиков России. Москва, 23 – 27 сентября 2013. № 489. С. 440. Электронный носитель.

9. Fedorova I., Shapovalova E., Shpigun O. Mixed chiral sorbent based on silica gel modified by macrocyclic antibiotic eremomycin and bovine serum albumin // Materials of 30th International symposium on chromatography, Salzburg, Austria, September 14 – 18, 2014. USB Mass Storage Device.

10. Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А. Использование силикагеля, модифицированного макроциклическим антибиотиком эремомицином, для разделения энантиомеров производных фенилуксусной кислоты. // Тезисы докладов Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» памяти профессора М.С. Вигдергауза. Самара, 24 – 30 мая 2015, С. 204.

11. Shapovalova E.N., Fedorova I.A., Priporova A.A., Ananieva I.A., Shpigun O.A. Determination of the enantiomeric purity pemetrexed and levalbuterol on the macrocyclic glycopeptide bonded phase. // Materials of 2nd Russian conference on medicinal chemistry. Новосибирск, 5 – 10 июля 2015, С. 269.

12. Федорова И.А., Шаповалова Е.Н., Шаранов П.Ю., Алов Н.В., Шпигун О.А. Хиральный сорбент на основе силикагеля, модифицированного бычьим сывороточным альбумином: синтез и хроматографические свойства. // Сборник тезисов I Всероссийской конференции с международным участием "Химический анализ и медицина". Москва, 8 – 13 ноября 2015. С. 105.

Автор выражает искреннюю благодарность д.х.н. Староверову С.М. (ЗАО «БиоХимМакСТ») за консультации по тематике работы и синтезу сорбентов; д.х.н., проф. Шпигуну Олегу Алексеевичу за консультации по тематике работы; д.х.н. Мажуге А.Г., к.х.н. Рудаковской П.Г. за помощь в синтезе сорбента с наночастицами золота; к.х.н. Савилову С.В., с.н.с. В.В. Аняри за помощь в проведении микроскопических исследований; к.ф.-м.н., в.н.с. Алову Н.В., асп. Шаранову П. Ю. за помощь в проведении анализа РФА ПВО; Российскому научному фонду за финансовую поддержку проведенных исследований (гранты № 12-03-00405, № 15-03-05979).