

ЛИГАНДОБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Ligand Exchange Chromatography

Authors

VADIM A. DAVANKOV

Institute of Organo-Element Compounds
Academy of Sciences of the U. S. S. R.
Moscow, U. S. S. R.

JAMES D. NAVRATIL

Professor
University of New South Wales
Kensington, New South Wales
Australia

HAROLD F. WALTON

Department of Chemistry
University of Colorado
Boulder, Colorado
U. S. A.

В.А.Даванков, Дж.Навратил, Х.Уолтон

ЛИГАНДОБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Перевод с английского
канд. хим. наук А. С. БОЧКОВА

под редакцией
профессора В. А. ДАВАНКОВА

CRC Press, Inc.
Boca Raton, Florida



Москва «Мир» 1989

ББК 24.4
Д17
УДК 543.544

Даванков В. А., Навратил Дж., Уолтон Х.

Д17 Лигандообменная хроматография: Пер. с англ. — М.:
Мир, 1990. — 294 с., ил.
ISBN 5-03-001034-3

В книге, написанной совместно советским (В. А. Даванков) и американскими учеными, впервые в мировой научной литературе обобщены принципы и достижения лигандообменной хроматографии, которая сделала реальным разделение оптических изомеров аминокислот и многих других физиологически активных соединений. Являясь новым принципом разделения, лигандообменная хроматография, однако, может применяться в классических жидкостном, газовом и тонкослойном вариантах.

Предназначена для специалистов, работающих в области биоорганической и органической химии, биотехнологии, химии пищевых веществ, нефтехимии, охраны окружающей среды.

1707000000-054
Д 041(01)-90 71-89

ББК 24.4

Редакция литературы по химии

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Рождение новой теоретической концепции в современном естествознании, как правило, одновременно означает и возникновение нового экспериментального метода, призванного проверить и развить эту концепцию. Такой прорыв на качественно новый уровень познания — заслуга наиболее одаренных одиночек, каким был Фридрих Гельферих в создании концепции и метода лигандообменной хроматографии.

Первых приверженцев нового метода всегда ожидают радость новых открытий, успех развития новой концепции и разработки перспективных областей практического применения нового метода.

Через какое-то время созревает необходимость обобщения накопленных знаний и систематизации полученных результатов. Предлагаемая читателю книга является первой попыткой подведения итогов почти 25-летнего пути развития лигандообменной хроматографии. Она написана коллективом авторов, проделавших этот путь и посвятивших значительную часть своих исследований развитию нового метода.

В соответствии со спецификой американского издательства, заказавшего данную книгу, она должна одновременно служить по возможности и более полным библиографическим справочником работ, опубликованных в области лигандообменной хроматографии.

Надеюсь, что наша книга окажется полезной широкому кругу советских исследователей, работающих не только в области хроматографии, но и в таких разделах науки и техники, как органическая и физическая химия, стереохимия, химия координационных соединений, биохимия и биотехнология, охрана окружающей среды.

В. Даванков

ISBN 5-03-001034-3 (русск.)
ISBN 0-8498-6775-1 (англ.)

© 1988 by CRC Press, Inc.
© перевод на русский язык, «Мир», 1989

ВВЕДЕНИЕ. ИСТОРИЯ, ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ, ТЕРМИНОЛОГИЯ

Х. Уолтон, В. А. Даванков

ПРЕДИСЛОВИЕ

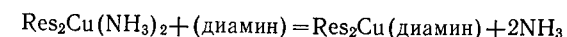
Около 20 лет назад был предложен новый хроматографический метод — лигандообменная хроматография (ЛОХ). Этот метод основан на образовании лабильных координационных связей между лигандами и катионом металла с возникновением координационных соединений или комплексов.

ЛОХ в ее жидкостном и газовом вариантах позволила решить ряд сложнейших задач разделения, очистки и анализа различных веществ, недоступных для других видов хроматографии. Высшим достижением этого метода явилось разделение оптических изомеров; позднее был разработан ряд перспективных вариантов ЛОХ.

Предлагаемая книга включает систематический всесторонний обзор информации по хроматографическим процессам, основанным на образовании координационных соединений. В книге не только описаны успехи, достигнутые в теории и практике ЛОХ, но и по возможности указаны потенциальные направления ее развития.

Ни один из методов химического разделения не может сравниться с хроматографией по универсальности и широте использования. С помощью хроматографии можно разделить нейтральные молекулы и ионы, изотопы, малые и большие молекулы, природные и синтетические макромолекулы, частицы латексов по их размерам и даже живые клетки. Хроматографические разделения основаны на различиях в распределении веществ между неподвижной и подвижной фазами. Подвижной фазой могут быть газ, жидкость или газ в сверхкритическом состоянии. Хроматография является многоступенчатым процессом, поэтому даже незначительные различия в средстве к неподвижной фазе могут привести к хорошему разделению. Природа взаимодействий, определяющих коэффициенты межфазного распределения веществ, может быть различной; это могут быть дисперсионные силы, π -связи, электростатические силы, взаимодействия с переносом заряда, водородные связи, координационные взаимодействия металл — лиганд. Последний тип взаимодействия лежит в основе лигандообменной хроматографии.

Термин «лигандообменная хроматография» (ЛОХ) был введен в 1961 г. в коротком сообщении Гельфериха, озаглавленном «Лигандный обмен: новый метод разделения» [1]; более подробное его определение дано в двух статьях, посвященных механизму ЛОХ [2, 3]. Гельфериху необходимо было выделить 1,3-диамин (1,3-диамино-2-гидроксипропан) из разбавленного водного раствора, содержащего также аммиак. Для решения этой задачи он заполнил стеклянную колонку катионообменной смолой, насыщенной голубым комплексом двухвалентной меди с аммиаком (в основном $\text{Cu}(\text{NH}_3)_2^{2+}$), а затем через эту колонку пропустил исследуемый раствор. В верхней части колонки появлялась интенсивная синяя полоса, расширявшаяся книзу при движении раствора. Появление окраски было обусловлено образованием медного комплекса диамина. Каждая молекула диамина замещала две молекулы аммиака:



где Res — функциональная группа катионообменной смолы, в данном случае — карбоксильная группа.

После того как интенсивная синяя окраска распространилась на всю колонку, Гельферих пропустил через колонку незначительное количество концентрированного раствора аммиака, чтобы вытеснить адсорбированный диамин; при этом записанная выше реакция шла в обратном направлении, что приводило колонку в исходное состояние. Реакция была эффективной, поскольку две молекулы аммиака замещали одну молекулу диамина, чему благоприятствуют высокие концентрации. (Аналогично происходит удаление солей из жесткой воды: один ион кальция в разбавленном растворе замещает два иона натрия из твердого ионообменника, затем колонку регенерируют концентрированным раствором хлорида натрия.) Медь практически не вымывалась из смолы, ее покидали только лиганды: аммиак и диамин менялись местами. Именно отсюда произошло название «лигандный обмен».

Лигандный обмен можно осуществить с любыми аминами, впрочем, как и с любыми другими веществами, способными образовать лабильные комплексы с ионами меди. Для проведения лигандного обмена можно использовать ионы любого металла, с которым разделяемые соединения образуют лабильные координационные комплексы. Этот процесс применим и в аналитической элюиционной хроматографии. Так, например, если ввести смесь аминов в колонку с ионообменником, заряженным ионами металла, а затем пропустить через нее раствор аммиака, то амины будут перемещаться по колонке с различными скоростями: амины, образующие более стабильные комплексы, останутся позади, а амины, входящие в состав менее прочных комплексов, уйдут вперед (рис. 1.1). Порядок селективности определяется природой иона металлов, ионообменника и элюента. Гельферих писал: «Этот метод объединяет две области химии — ионный обмен и координационную химию, только совместное применение которых позволяет решить любую задачу».

Гельферих отмечал, что метод лигандного обмена можно применять и при разделении методом газожидкостной хроматографии. Например, при анализе смеси летучих аминов газ-носитель должен содержать аммиак. В настоящее время лигандный обмен мало используется в газовой хроматографии, хотя давно отработаны методики газохроматографического разделения олефинов на неподвижных фазах, содержащих ионы одновалентного серебра. Эта тема более подробно обсуждается в гл. 7.

По терминологии координационной химии лиганд — нейтральная молекула или анион, связанный с ионом металла координационной связью. Путем обобщения неподеленной

электронной пары донорного атома лиганда центральный катион металла достраивает свою электронную оболочку до структуры, аналогичной электронной оболочке атома инертного (благородного) газа. Если связь металл—лиганд лабильна, т. е. легко образуется и разрушается, один лиганд может замещать другой. Поскольку вода также выступает в роли лиганда, в случае водных растворов необходимо учитывать координирование молекул воды.

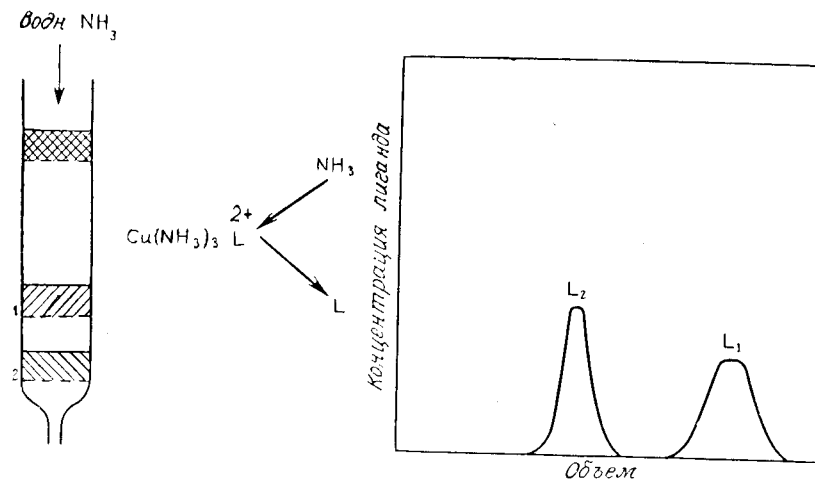


Рис. 1.1. Схематическое представление лигандообменной хроматографии.

Лигандом может быть и отрицательный ион. Одним из наиболее важных применений ЛОХ является разделение аминокислот, которые координируются в виде депротонированного однозарядного аниона. Остаточный заряд комплексного иона должен оставаться положительным, иначе металл будет вымываться из колонки.

Преыдушие рассуждения основывались на том, что в ЛОХ лиганды подвижны, а ионы металла остаются неподвижными. Это утверждение соответствует идеализированной модели. На самом деле ионы металла могут покинуть ионообменную смолу и перемещаться вдоль колонки, поскольку они находятся в ионообменном равновесии с катионами подвижной фазы. Даже разбавленный раствор аммиака содержит ионы аммония. Для того чтобы свести к минимуму вытеснение ионов металла, нужно подобрать такой ионообменник, функциональные группы которого образовывали бы координационные связи с ионами металла, как, например, карбоксилатные или иминодиацетат-

В первых экспериментах Даванков и Рогожин заполняли стеклянную колонку диаметром 9 мм и длиной 50 см полученным ими полимером (12 г) с размером частиц 30—50 мкм, промывали его водой и вводили 0,5 г водного раствора рацемического D-пролина. Затем снова пропускали воду и разбавленный раствор аммиака. Первая фракция, вышедшая из колонки, содержала исключительно L-пролин. D-Пролин элюировали 1 М раствором аммиака. Таким образом, было получено по 0,25 г L- и D-пролина 100%-ной оптической чистоты [5—7]. Вместе с аминокислотами аммиаком вытеснялось небольшое количество меди, которую легко отделяли на небольшой дополнительной колонке, заполненной полимером с привитыми пролиновыми группами, не заряженными ионами металла. Дополнительную колонку устанавливали на выходе основной колонки. Таким способом были выделены L- и D-пролин в чистом виде без примеси меди.

Эти результаты послужили стимулом для многочисленных исследований, проведенных различными научными группами (подробно они описаны в гл. 5). Первоначально основное внимание уделялось синтезу и использованию хиральных (оптически активных) полимеров. С помощью таких полимеров удалось добиться высокой селективности; кроме того, они хорошо рекомендовали себя для препаративных целей, но зоны разделяемых компонентов были широкими и процесс протекал медленно. Впоследствии были получены силикагели с привитыми оптически активными соединениями, а также обращенно-фазовые сорбенты, покрытые оптически активными аминокислотами, к которым были привиты углеводородные цепочки. Во всех случаях неподвижную фазу насыщали ионами меди. Другим, уже упоминавшимся, направлением было использование ахиральных матриц, в том числе катионообменных смол и стандартных силикагельных обращенно-фазовых сорбентов, в сочетании с элюентом, к которому добавляли хиральный расщепляющий агент. Таким путем удалось ускорить лигандный обмен и получить более узкие хроматографические зоны, однако хиральный элюент больше подходит для аналитических, чем для препаративных целей. Во всех случаях в роли хирального разделяющего агента использовали комплекс металла, чаще всего двухвалентной меди, иногда двухвалентных цинка и никеля с хиральными аминокислотами — L-пролином, L-гидроксипролином или L-фенилаланином.

Функция иона металла заключается в сближении двух молекул аминокислот при их строго фиксированной ориентации. Одна молекула (L-пролин) является оптически активным разделяющим агентом, а другая молекула представляет собой D- или L-форму расщепляемой аминокислоты. Каждая из мо-

лекул занимает определенное положение благодаря двум координационным связям с медью. Третья связь, необходимая для хирального расщепления, образуется вследствие обменных взаимодействий или стерических затруднений между боковыми углеводородными цепями двух молекул. В результате свободные энергии образования L-Si-L и L-Si-D диастереоизомеров могут отличаться на 2—3 кДж, что вполне достаточно для осуществления хроматографического разделения.

Настало время дать определение лигандообменной хроматографии. Первоначально было сделано допущение, что лиганды обмениваются в координационной сфере ионов металлов, находящихся в неподвижной фазе. Далее, было показано, что ионы металла могут также находиться в подвижной фазе, хотя и нет причин, по которым бы они не могли находиться исключительно в подвижной фазе. Таким образом, можно сформулировать следующее рабочее определение лигандообменной хроматографии: «Лигандообменная хроматография — это процесс, в котором комплексообразующие соединения разделяются в результате образования и последующего разрыва лабильных координационных связей с центральным атомом металла, влияющих на их распределение между подвижной и неподвижной фазами. Разделение лигандов происходит вследствие обмена их мест у атома металла. Обмен может происходить как в неподвижной, так и в подвижной фазе».

В дополнение к этому определению необходимо помнить, что вода является лигандом и может занимать места других лигандов, причем в лигандообменной хроматографии практически всегда используют растворы, содержащие воду.

Тсуджи [8] был первым (1960 г.), кто использовал комплексообразование для химических разделений. Он сорбировал гидразид изоникотиновой кислоты на катионообменной смоле, заряженной ионами различных металлов. Наиболее сильная сорбция наблюдалась для меди(II); были испытаны также и другие катионы, записанные далее в порядке убывания силы сорбции: никель(II), ртуть(II), кобальт(II), кадмий(II), цинк, железо(II), свинец(II), марганец(II) и алюминий. Затем сорбированное соединение элюировали с насадки концентрированным водным раствором аммиака. Были использованы статический прерывный метод и колоночный метод. Тсуджи тем не менее не назвал использованный им способ лигандным обменом.

Один из последних вариантов лигандного обмена «аффинную хроматографию на хелатах металлов» предложил Порат [9] в качестве «нового подхода к фракционированию белков». Для того чтобы сорбировать и десорбировать белки без их денатурации, неподвижная фаза должна быть гидрофильной, а функ-

циональные группы легко доступны для больших молекул. Порат и сотрудники применяли агарозу, к которой были привиты длинные боковые гидрофильные цепочки с концевыми иминодиацетатными группами, удерживающими ионы металла, обычно меди (II) или цинка (II). Содержащие гистидин или цистеин белки удерживаются особенно сильно. Сорбированные белки можно селективно удалить пропусканием через колонку водного буферного раствора, причем ионы металла остаются на сорбенте. Описанный метод является разновидностью лигандообменной хроматографии, хотя авторы его так и не называли; более детально этот вопрос обсуждается в гл. 4.

Еще одна разновидность лигандообменной хроматографии основана на «внешнесферной координации», т. е. взаимодействии между стабильным координационным комплексом и другим ионом противоположного заряда (вариант образования ионной пары).

Следует еще раз подчеркнуть, что лишь слабые межмолекулярные взаимодействия могут служить основой для хроматографического разделения. Только образование лабильных координационных соединений следует относить к ЛОХ. Можно привести многочисленные примеры хроматографического разделения стабильных, кинетически инертных комплексов кобальта (III), хрома (III), платины (II) и (IV) и ионов некоторых других металлов, не относящиеся к лигандообменной хроматографии. Эти комплексы можно разделить по ионообменному механизму или с помощью обращенно-фазовой хроматографии, но при таких разделениях не происходит обмена лигандов во внутренней координационной сфере ионов металлов.

Помимо внутренней координационной сферы упомянутые выше комплексы имеют высокоупорядоченную сольватную оболочку, которую можно рассматривать как вторую, внешнюю координационную сферу. Лиганды, входящие в ее состав, связаны сравнительно слабо и могут легко замещаться при хроматографировании. И действительно, несколько интересных разделений было проведено с использованием лигандного обмена во внешней координационной сфере инертных комплексов, что будет рассмотрено в гл. 5, разд. VI.

Одну из попыток применения внешнесферной координации для лигандообменной хроматографии предприняли Каргер и сотр. [10] в 1978 г., хотя комплексный ион в их опытах был лабильным, а не инертным. В качестве подвижной фазы они использовали раствор комплекса цинка с гидрофобным триамином $C_{12}H_{25}N(CH_2CH_2NH_2)_2$ в смеси растворителей ацетонитрил — вода. Молекулы ацетонитрила составляют с комплексом цинка полностью насыщенную координационную сферу, но, тем не менее, этот полностью координированный катион обра-

зует ионную пару с анионами сульфамидных лекарственных препаратов, обуславливая их хроматографическое разделение. В качестве неподвижной фазы авторы использовали силикагель с привитыми C_8 -группами. Затем были проведены другие исследования, в том числе с применением асимметричных оптически активных триаминов и разделением оптических изомеров дансил-аминокислот [11, 12].

В этой системе взаимодействия в подвижной фазе могут преобладать, хотя существует высокая вероятность того, что некоторые гидрофобные комплексные катионы сорбируются неподвижной фазой, образуя, так же как и в подвижной фазе, ионную пару. В следующей главе будут приведены многочисленные примеры взаимодействий в подвижной фазе, образования ионных пар, внешнесферного координирования.

Литература

1. Helfferich F., Ligand exchange. A novel separation technique, *Nature (London)*, **189**, 1001 (1961).
2. Helfferich F., Ligand exchange. I. Equilibria, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3237 (1962).
3. Helfferich F., Ligand exchange. II. Separation of ligands having different coordinative valencies, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3242 (1962).
4. Рогожин С. В., Даванков В. А. Хроматографический метод расщепления рацематов оптически активных соединений. Авт. свид. СССР № 308635.
5. Рогожин С. В., Даванков В. А. Лигандообменная хроматография на дисимметрических комплексообразующих сорбентах — новый принцип расщепления рацематов. *ДАН СССР*, **192**, 1288 (1970).
6. Даванков В. А., Рогожин С. В. Хроматография лигандов — новый метод изучения смешанных комплексов. Стереоселективные эффекты в комплексах меди (II) с α -аминокислотами. *ДАН СССР*, **193**, 94 (1970).
7. Rogozhin S. V., Davankov V. A., Ligand chromatography on asymmetric complex-forming sorbents as a new method for resolution of racemates. *Chem. Commun.*, p. 490, 1971.
8. Tsuji A., Sekiguchi K., Adsorption of nicotine acid hydrazide on cation exchanger of various metal forms, *Nippon Kagaku Zasshi*, **81**, 847 (1960).
9. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G., Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature (London)*, **258**, 598 (1975).
10. Cooke N. H. C., Viavattene R. L., Eksteen R., Wong W. S., Davies G., Karger B. L., Use of metal ions for selective separations in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **148**, 391 (1978).
11. Lindner W., LePage J. N., Davies G., Seitz D. E., Karger B. L., Reversed-phase separation of optical isomers of Dns-amino acids and peptides using chiral metal chelate additives, *J. Chromatogr.*, **185**, 323 (1979).
12. LePage J. N., Lindner W., Davies G., Seitz D. E., Karger B. L., Resolution of the optical isomers of dansyl amino acids by reversed-phase liquid chromatography with optically active metal chelate additives, *Anal. Chem.*, **51**, 433 (1979).

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

Х. Уолтон

2.1. Условия эксперимента

2.1.1. Ионы металла

Ионы щелочных металлов не образуют комплексов в водных растворах, поскольку здесь происходит их полная гидратация. Другие катионы металлов принято классифицировать как «жесткие» или «мягкие» кислоты, подразумевая под словом «кислота» акцептор электронов. «Жесткие» катионы имеют электронную структуру благородных газов или большое соотношение заряд/радиус. Они преимущественно соединяются с жесткими основаниями, такими как F^- , OH^- , и кислородсодержащими лигандами. «Мягкие» катионы представлены переходными и некоторыми другими металлами, не обладающими электронной структурой благородных газов. Они связываются в основном с лигандами, у которых донорами электронов выступает азот или сера.

В лигандообменной хроматографии чаще всего используются ионы металлов, являющиеся мягкими кислотами, — преимущественно медь (II), которая образует очень стабильные комплексы. Ряд Ирвинга — Вильямса устанавливает закономерность, согласно которой в первой переходной серии двухвалентные катионы образуют комплексы возрастающей стабильности в порядке $Mn < Fe < Co < Ni \ll Cu$ с резким максимумом у Cu, затем стабильность комплексов падает от Cu к Zn. Этот ряд стабильности идентичен для всех мягких кислот в роли лигандов. Ион меди (II) характеризуется плоско-квадратным распределением координационных связей, что отличает его от никеля (II) с октаэдрической координацией и цинка с тетраэдрической координацией. Как известно, октаэдрическая пространственная структура комплексов меди (II) может быть искажена, так как аксиальные связи значительно менее прочны, чем экваториальные связи. Аксиальная координация меди (II) тем не менее играет исключительно важную роль в селективности лигандного обмена (см. гл. 5).

При выборе катиона для лигандообменной хроматографии необходимо определить, насколько прочно он связывается с ионообменником, являющимся неподвижной фазой. Обычно используемый в качестве ионита сульфированный полистирол удерживает медь (II) недостаточно прочно, в связи с чем она

легко вытесняется ионами NH_4^+ или другими катионами. По этой причине в ранних работах по лигандообменной хроматографии были использованы никель (II) в сочетании с сульфированным полистирольным ионитом. Ионами меди (II) заряжали акриловые или хелатообразующие смолы, которые достаточно прочно удерживали эти ионы, так что они практически не вытеснялись водным аммиаком. Кроме того, использование никеля (II) или цинка объяснялось также тем, что ионы меди слишком сильно удерживали ряд лигандов, например 1,2-диамины. Ионы меди (II) в составе неподвижной фазы удерживали эти соединения настолько сильно, что для их элюирования приходилось вытеснять ионы меди разбавленной кислотой.

Преимущественному использованию цинка благоприятствует и относительно высокая скорость лигандного обмена. При проведении лигандообменной хроматографии аминокислот на сульфированном полистироле цинк дает более четкие зоны разделяемых веществ по сравнению с медью (II), что указывает на более высокую скорость лигандного обмена [1, 2]. Самые низкие скорости лигандного обмена наблюдались для кинетически стабильных комплексов, образованных кобальтом (III), хромом (III) и платиной (IV). Эти комплексы находят применение в лигандообменной хроматографии, но лишь в случае внешнесферного комплексообразования или ион-парной ассоциации, которые будут рассмотрены позднее. Отметим, что кобальт (II) редко используется в лигандообменной хроматографии, поскольку в обычно используемых щелочных средах он легко окисляется кислородом воздуха до трехвалентного.

Вслед за двухвалентными медью, цинком и никелем в лигандообменной хроматографии наиболее часто используют такие мягкие катионы, как кадмий (II), серебро (I) и ртуть (II). Ионы кадмия находят применение в колоночной хроматографии с серусодержащими лигандами, включая тиомочевину [3], но основная сфера их использования — это тонкослойная хроматография, где ионы кадмия наносят на поверхность частиц силикагеля и с их помощью анализируют смеси ароматических аминов [4—7]. По эффективности кадмий (II) и цинк близки между собой. Ионы серебра, введенные в состав ионообменных полимеров, а также нанесенные на поверхность силикагеля, используют при хроматографировании гетероциклических азотистых оснований [8] и различных олефиновых соединений [9, 10]. В последнем случае применяют неводные элюенты, что вызывает сомнение в том, можно ли относить эти процессы к лигандообменной хроматографии; тем не менее разделение происходит благодаря разнице в стабильности комплексов металлов — лигандов. Ртуть (II) обладает большим сродством к серусодержащим лигандам, поэтому макропористый катионообмен-

ник, насыщенный ртутью(II), можно использовать для полного удаления соединений серы из нефти [11]. Насадки с ртутью используют для хроматографирования ароматических гидроксикислот [12]. Надо учитывать, что соли ртути(II) необратимо реагируют с ионообменными смолами на основе полистирола путем ковалентного присоединения ртути к ароматическим кольцам [13].

Среди жестких катионов, вероятно, наиболее широкое применение находят кальций, образующий комплексы с многоатомными спиртами и некоторыми сахарами. На колонках, заполненных заряженным кальцием катионообменником, обычно анализируют смеси сахаров, используя воду в качестве элюента. Хотя комплексы кальция непрочны, константы их образования в ряде случаев измерены, а механизм удерживания в основном обусловлен лигандным обменом (см. гл. 6).

В ряде публикаций описано применение железа(III) для выделения и хроматографирования фенолов [14, 15], ароматических кислот и гидроксикислот [16], β -дикетонатов [17] и даже ароматических диаминов [18]. С помощью титана(IV) проводили разделение гидроксикислот [19], а с помощью алюминия — фракционирование ДНК и РНК; в качестве элюента служил щелочной глициновый буфер [20].

Сложность применения железа(III) и алюминия состоит в легком гидролизе этих ионов в водных растворах при $\text{pH} > 3$ —4. Большой по размерам ион лантана(III) гидролизуется в меньшей степени — только приблизительно на 1% при $\text{pH} 6$. Смола, заряженная лантаном(III), селективно удерживает анионы карбоновых и гидроксикислот и может быть использована для их хроматографирования [21] в ацетатном буфере в качестве элюента. В этом случае основной трудностью, характерной для лигандообменной хроматографии вообще, является низкая хроматографическая эффективность, т. е. размывание хроматографических зон, что связано с низкой скоростью лигандного обмена. Скорость ионного обмена, как правило, лимитирована скоростью, с которой ионы и молекулы могут диффундировать в ионит и из него. Обычные гелевые ионообменники, заряженные ионами трехвалентных металлов, более компактны и содержат меньше воды по сравнению с ионитами, заряженными ионами одновалентных металлов, поэтому диффузия в таких насадках протекает медленнее.

2.1.2. Сорбенты

Сорбенты, используемые для удерживания катионов в лигандообменной хроматографии, могут быть органическими, неорганическими или представлять собой комбинацию органической

и неорганической частей, как, например, в силикагеле с привитыми функциональными группами. Большинство исследований было проведено на органических обменниках преимущественно на основе сшитого полистирола. Этот обменник доступен, а его частицы обладают достаточно высокой жесткостью при работе в колонках под давлением.

К наиболее распространенным органическим катионообменникам относится сульфированный полистирол различной степени сшивки с различными размерами частиц. Для аналитической хроматографии предпочтительны маленькие однородные частицы диаметром приблизительно 10 мкм. Для получения необходимой жесткости степень поперечной сшивки должна достигать 8%; полимеры со степенью сшивки 6% и даже 4% можно использовать совместно с двухзарядными противоионами. (Двухзарядные ионы вызывают электростатическое притяжение полимерных цепей, уменьшают набухаемость частиц, делая их более жесткими и устойчивыми к высокому давлению; как раз такие ионы и используются в лигандообменной хроматографии.)

Обычные ионообменники гелевого типа благодаря своей однородности лучше подходят для аналитической хроматографии, чем макропористые смолы. В наших экспериментах они давали более узкие и симметричные хроматографические пики. Макропористые смолы представляют собой конгломерат из очень маленьких микросфер высокой степени сшивки; в этом случае окружение ионогенных функциональных групп неоднородно, что приводит к размыванию заднего фронта пика (образованию хвоста). Когда высокая хроматографическая эффективность не требуется, как, например, при извлечении следов лигандов из большого объема воды, лучше использовать макропористые смолы; их же можно и нужно использовать в неводных средах. В наших экспериментах макропористый сульфированный полистирол, удерживал ионы металла слабее, чем насадка гелевой структуры, но в случае неводных растворителей это не столь важно.

Ни одно из сделанных замечаний не относится к «макросетчатым и изопористым» полимерам, полученным Даванковым и сотр. [22, 23]. Эти сорбенты представляют собой модифицированные растворителем полимеры, полученные с помощью длинных стержнеобразных молекул в качестве сшивающего агента. Такие полимеры отличаются высокой внутренней пористостью и однородностью поперечной сшивки. Более подробно свойства этих полимеров будут описаны далее.

При использовании в лигандообменной хроматографии сульфированных полистирольных смол гелевого типа в подвижную фазу необходимо добавлять в случае меди(II) и цинка соль

соответствующего металла, чтобы предотвратить снижение содержания металла в колонке вследствие слабого удерживания этих ионов. Как мы уже отмечали, никель(II) удерживается более прочно.

Ионы металлов удерживаются значительно сильнее на полимерах, содержащих другие функциональные группы. Ряд исследователей использовали поперечно-сшитый полистирол с привитыми фосфоновыми группами [24]. Широкое применение находят иминодиацетатные хелатообразующие смолы Хелекс-100, но из-за медленной диффузии хроматографическая эффективность их низка; кроме того, обменная емкость по отношению к лигандам лимитирована координацией иона металла с функциональной группой данной смолы. Тем не менее заряженные никелем(II) хелатирующие смолы использовали для колоночной хроматографии органических кислот [25]. Наиболее важным применением хелатообразующих смол, как при лигандном обмене, так и при обмене неорганических ионов, является выделение и концентрирование следов веществ из больших объемов воды. Заряженную никелем иминодиацетатную хелатообразующую смолу применяли для выделения аминокислот из сточных вод. Через колонку, содержащую 10 мл смолы, пропускали 11 проб, затем сорбированные аминокислоты элюировали концентрированным водным раствором аммиака [26]. Аналогичным образом, с помощью хелатообразующей смолы, заряженной медью, извлекали аминокислоты из морской воды [17] и мочи [28, 29]. Для сорбции фенолов из промышленных сточных вод использовали хелатообразующую смолу, заряженную железом(III), с последующим элюированием разбавленным раствором гидроксида натрия [30]. При решении подобных задач необходимо полное поглощение, а не высокое разрешение.

Функциональные карбоксильные группы сшитых полиакрилат-метакрилатных смол [коммерческое название Био-рекс 70 (Bio-Rex 70)] удерживают медь(II) и другие металлы сильнее, чем сульфогруппы. Акриловые смолы алифатической структуры не образуют π -связей с разделяемыми ароматическими соединениями, что улучшает условия их разделения. Это преимущество можно наблюдать при проведении лигандообменной хроматографии амфетаминных лекарственных препаратов [31]: на акриловых смолах получают симметричные и сравнительно узкие пики, тогда как лигандообменники на основе полистирола дают широкие, асимметричные пики с размытым задним фронтом, что указывает на смешанный механизм удерживания. Акриловые смолы лучше зарекомендовали себя при лигандообменной хроматографии алкалоидов [32]. Следует отметить, однако, что по сравнению с полистирольными смолами

акриловые смолы менее однородны и их свойства менее воспроизводимы. Мы установили, что одна из экспериментальных партий акрилатных смол удерживала алкалоиды намного лучше, чем коммерческие образцы со стандартными свойствами. Связывание лигандов медью в этих двух смолах коррелирует с различиями в электронно-спиновом резонансе меди(II) [33]. Незначительные различия в структуре полимеров могут привести к существенной разнице в связывании металлом лиганда.

Большим недостатком акриловых смол при использовании в условиях высокоэффективной хроматографии является их мягкость: они легко деформируются под давлением, а в закрытых колонках с ними нужно обращаться с большой осторожностью.

Еще более мягкими, чем акриловые смолы, являются сорбенты на основе натуральных полимеров — целлюлозы и декстрана. Их используют в лигандообменной хроматографии преимущественно для удерживания больших молекул биологического происхождения, например белков и пептидов. Диэтил-аминоэтилцеллюлоза (ДЕАЕ-целлюлоза), заряженная сурьмой, может служить также для разделения алифатических и ароматических аминов, включая диамины [34]. Заряженный медью сефадекс G-25 (декстран, содержащий карбоксильные группы) использовали для разделения аминокислот и пептидов [35]. Декстран и сефарозу (полисахарид) обрабатывали для прививки иминодиацетатных хелатообразующих групп, насыщали медью(II), затем заполняли ими колонки и, пропуская через колонки растворы, проводили сорбцию и разделение белков и пептидов [36, 37]. При замене меди(II) на ртуть(II) эти насадки использовали как селективные сорбенты для белков с сульфгидрильными группами, например папаина [38].

При проведении высокоэффективной жидкостной хроматографии большими преимуществами обладают сорбирующие системы на основе оксида кремния (кремнезема, силикагеля). Благодаря своей жесткости силикагель устойчив при больших объемах скоростях элюирования и значительных перепадах давления; его легко получить с точно заданными размерами частиц и пористостью. К силикагелю можно привить целый ряд органических групп; методики прививки широко известны [39—49]. На силикагеле с химически связанными органическими группами, в основном углеводородными цепями типа $C_{18}H_{37}$, проводится большое число разделений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Естественно, что силикагель стали модифицировать и для использования в лигандообменной хроматографии.

Одними из первых, кто опробовал для этих целей силикагель, были Чоу и Грушка [39]. Они импрегнировали медью(II)

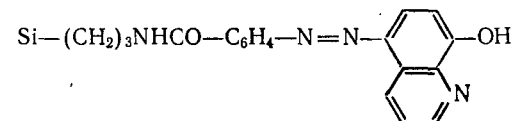
из раствора сульфата меди (II) в сухом метаноле силикагель с привитыми группами $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$. Медь из полученной лигандообменной системы вымывалась водными растворами. Следующим этапом стало химическое связывание с силикагелем диаминов, полиаминов и иминодиацетатных групп для более прочного удерживания меди и других металлов. Мастерс и Лейден [46] прививали диаминовые группы не к силикагелю, а к стеклу с контролируемой пористостью путем нагревания с обратным холодильником с раствором N-β-аминоэтил-γ-аминопропилтриметоксисилана в сухом толуоле. Полученный ими продукт содержал группировки $\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$. В результате насыщения медью (II) из водного раствора аммиачного комплекса меди (II) степень насыщения составила 0,4 мкМ меди на грамм сорбента. Хроматографирование аминокислот и аминсахаров проводили в элюенте следующего состава: 0,1 М аммиак, pH 9,5, 10^{-4} М CuCl_2 . Эффективность разделения оказалась низкой, возможно, из-за большого размера гранул сорбента, но диаминовые функциональные группы удерживали медь (II) достаточно прочно, что позволило применять водные элюенты. Позднее Гимпель и Унгер [40] привили к силикагелю ряд аminosиланов, содержащих группы $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$, $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$. После насыщения медью (II) эти сорбенты использовали для разделения аминокислот и смесей алифатических карбоновых кислот. Элюирование проводили различными буферными растворами с pH 3—6, содержащими $8 \cdot 10^{-5}$ М меди (II).

К силикагелю прививали и другие функциональные группы; для этого имеется много возможностей. Чоу и Грушка [47] привили к силикагелю, модифицированному γ-аминопропильными группами (обычная коммерческая неподвижная фаза с аминогруппами), дитиокарбаматные лиганды реакцией с сероуглеродом и дикетогруппы реакцией с этилбензоилацетатом; привитые лиганды координировали медь (II). Привив к силикагелю диаминовые лиганды, эти исследователи затем получали трис(этилендиаминовый) комплекс кобальта (III), который был эффективен при хроматографическом разделении нуклеотидов с помощью фосфатного буфера в качестве элюента [48]; в этом разделении реализуется механизм внешнесферной координации.

Винную кислоту прививали к силикагелю через связанную с ним γ-аминопропильную группу [42]. В синтезе использовали оптически активную D-винную кислоту, что позволяло получать асимметрическую неподвижную фазу, на которой можно проводить разделение оптических изомеров. На этой неподвижной фазе, заряженной медью, были разделены катехоламины и род-

ственные соединения, включая такие аминокислоты, как диоксифенилаланин (ДОФА), а также изомеры гидроксиминдальной кислоты. В качестве элюента использовали фосфатный буфер, содержащий $3 \cdot 10^{-4}$ М меди (II). Оптические изомеры были разделены с хорошим разрешением за 15 мин.

Шахвэн и Йезорек [41] использовали силикагель с привитыми аминогруппами $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ для проведения синтеза с 8-хинолинолом, в результате которого была получена группировка



Эта функциональная группа связывает железо (III) в соотношении 1 : 1, в результате чего железо (III) с четырьмя координационными связями стало доступным для лигандного обмена. Полученный таким путем сорбент использовали для хроматографирования фенолов, хлор- и нитрофенолов.

Аминокислоты можно химически связывать с силикагелем различными способами. Особый интерес представляют оптически активные аминокислоты, привитые к силикагелю, поскольку такие неподвижные фазы, насыщенные медью (II), способны разделять D- и L-изомеры аминокислот, находящиеся в подвижной фазе. Гл. 5 полностью посвящена разделению энантиомеров аминокислот. Недавно, на силикагеле, к которому через глицидилоксипропильные группы были привиты L-пролин и L-гидроксипролин, были разделены гидроксикислоты, включая миндальную и фенилмолочную кислоты [49].

Силикагель сам является ионообменником благодаря присутствию на его поверхности силанольных групп $-\text{Si}-\text{OH}$.

Оксид кремния удерживает катионы металлов и в ряде случаев выступает в роли сорбента для лигандообменной хроматографии. Ионы металлов можно присоединить гидротермально; Вотт и сотр. [7] нагревали силикагель с насыщенным водным раствором хлорида кадмия в закрытом сосуде при 350°C в течение 2 ч. В результате прочного связывания кадмия площадь поверхности силикагеля уменьшалась, что приводило к повышению поверхностной концентрации ионов кадмия. Сорбент применяли для хроматографического разделения ароматических и гетероциклических аминов, используя в качестве подвижной фазы смесь гексан — ацетонитрил.

Ионы меди, как и ионы других металлов, можно нанести на силикагель простым ионным обменом в водных растворах при комнатной температуре. Код и Фуко [43], Фуко и Россе

[44] приготовили насадку для лигандообменной хроматографии, просто заполнив колонку силикагелем с размером гранул 7 мкм и затем пропустив через нее раствор сульфата меди в 1 М водном аммиаке с последующей промывкой насадки водой. Поверхностные силанольные группы обменивали свои протоны на ионы меди. Первоначально аммиачный раствор меди вытеснял растворитель (этанол), в котором проводили заполнение колонки, после чего из нее выходила чистая вода, так как силикагель полностью сорбировал медь (II) и NH_4^+ . Затем из колонки выходил раствор аммиака, так как медь (II) элюента вытесняла ионы аммония из силикагеля. Окончание процесса подготовки колонки определяли по появлению интенсивно голубого раствора $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4\text{SO}_4$ [44]. После отмычки водой силикагель удерживал 0,75 мМ меди на грамм и не содержал сульфат-ионов.

Поскольку ионы меди находятся на поверхности сорбента, т. е. диффузионный путь к ним короток, лигандный обмен происходит быстро, в результате чего получаются компактные пики (рис. 2.1). Фуко и Россэ применяли обработанный ионами меди силикагель для хроматографирования аминокислот и пептидов при элюировании раствором аммиака в смеси вода-ацетонитрил (1:1). Разделение восьми аминокислот было проведено за 15 мин. Особенно большое впечатление производит разделение ди- и трипептидов; этот вид хроматографии можно использовать для диагностики в медицине. Трипептиды выходили из колонки первыми, затем шли дипептиды, после чего вымылись аминокислоты [44].

Силикагель растворяется в щелочных растворах. При хроматографическом разделении на модифицированном силикагеле с водными элюентами нельзя применять элюенты с рН более 8; желательнее, чтобы рН не превышало 7. Тем не менее Фуко и сотр. [43, 44] использовали растворы аммиака с концентрацией 0,5 М и выше. Применение таких сильно щелочных элюентов оказалось возможным вследствие того, что силикагель, на поверхности которого адсорбирована медь, несколько менее растворим в щелочных растворах по сравнению с чистым силикагелем, и, кроме того, оксид кремния значительно хуже растворяется в органических элюентах, чем в воде. Исследователи дополнительно насыщали элюент силикатом, пропуская подвижную фазу через предколонку, заполненную обработанным медью кремнеземом. Предколонка в этом случае выполняла двойную роль: насыщала элюент оксидом кремния и поддерживала достаточно высокую концентрацию меди, чтобы компенсировать вынос меди из аналитической колонки за счет смыва ее с насадки. С такими мерами предосторожности аналитическую колонку можно использовать в течение нескольких

месяцев, а в случае ухудшения свойств ее достаточно просто переупаковать, что не связано с большими расходами.

Гийон и сотр. [45] определяли влияние меди (II) и состава растворителя на растворимость кремнезема в 0,5 М аммиаке; полученные результаты они объясняли протеканием двух реак-

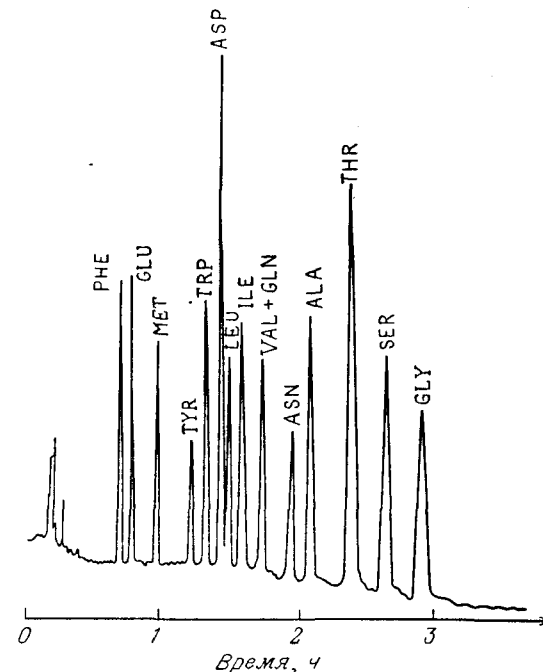


Рис. 2.1. Хроматограмма разделения аминокислот на силикагеле, заряженном медью(II). [Колонка размером 100×1 мм, размер частиц 7 мкм, температура 50°C , элюент ацетонитрил — вода, 1:1 (по объему), 0,5 М аммиак [44].]

ций — гидратации кремнезема и диссоциации кремниевой кислоты. Влияние состава растворителя показано на рис. 2.2. Кремнезем менее подвержен воздействию аммиака в системе метанол — вода (1:1) или ацетонитрил — вода, чем в чистой воде.

2.1.3. Элюенты и обнаружение

Элюирование и обнаружение необходимо рассматривать вместе, так как это взаимосвязанные процессы. В начальный период становления лигандообменной хроматографии основное внимание уделяли разделению аминов в водном аммиаке в качест-

ве элюента. Для ароматических аминов можно регистрировать поглощение ультрафиолетового (УФ) излучения, однако ионы металла, выходящие из колонки, также поглощают УФ-излучение, снижая чувствительность обнаружения. Алифатические амины не поглощают УФ-излучения. В этом случае можно измерять показатель преломления, который отражает любое из-

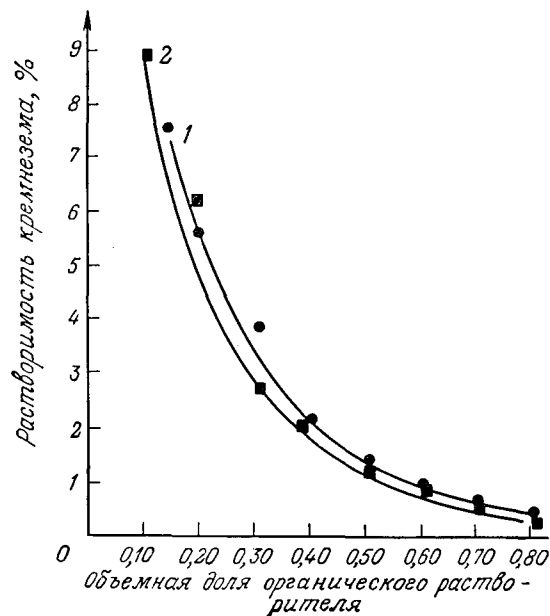


Рис. 2.2. Зависимость растворимости кремнезема от доли органического растворителя: 1 — метанол и вода; 2 — ацетонитрил и вода [45].

менение в составе элюата, но в общем случае измерение этого показателя является менее чувствительным методом, чем детектирование по поглощению УФ-излучения. К недостатку рефрактометрического детектирования следует отнести регистрацию пиков вытеснения (замещения), возникающих при введении пробы аминов в элюент на основе водного раствора аммиака. Амины при входе на колонку вытесняют аммиак из комплексов на поверхности сорбента. Зона с повышенной концентрацией аммиака перемещается вниз по колонке со скоростью, определяемой наклоном изотермы адсорбции; когда колонка полностью насыщена аммиаком (и только тогда), эта зона (пик показателя преломления), соответствующая пику аммиака при рефрактометрическом детектировании, выходит с мертвым объемом. Чаще такого совпадения не происходит,

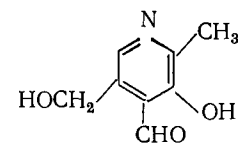
и этот пик может накладываться на пики компонентов пробы [50].

Для исследовательских целей иногда используют амины, меченные изотопами, в качестве калибровочных проб. Меткой обычно служит изотоп углерода с атомной массой 14; после разделения собирают фракции и измеряют уровень радиоактивности [51]. В важной работе, посвященной исследованию лигандообменной хроматографии аминокислот, Дури-Бертон [52] использовал меченные углеродом-14 аминокислоты и с помощью специально разработанного детектора измерял радиоактивность выходящего с колонки элюата.

Обнаружение аминокислот в ионообменной хроматографии обычно проводят после их реакции с нингидрином в спиральном реакторе в течение нескольких минут при температуре 100 °С. В результате реакции образуется красный или фиолетовый раствор, поглощение которого служит объектом измерения. Нингидрин не является селективным реагентом; он взаимодействует с аминами, аминокислотами и аммиаком, и поэтому его нельзя использовать при элюировании аммиаком. Более того; следы ионов металлов также влияют на интенсивность окраски. Даванков [53] избежал этих трудностей, применив в качестве элюента пиридин вместо аммиака, поскольку нингидрин не реагирует с пиридином. Он добавлял к нингидрину этилендиаминтетрауксусную кислоту для маскирования ионов меди, содержащихся в элюате.

Нингидрин использовали для обнаружения в коммерческом аминокислотном анализаторе фирмы «Арикава», принцип действия которого основан на лигандном обмене с помощью катионообменных смол, заряженных ионами цинка. В качестве элюента применяли не раствор аммиака, а ряд ацетатных буферных растворов с pH 4—5, содержащих 10^{-3} М ионов цинка [2], которые не мешают реакции с нингидрином.

Маеда и др. [54] в качестве реагента, взаимодействующего с аминами, аминокислотами и аминокислотами, но не реагирующего с аммиаком, предложили пиридоксаль:



Соответствующая реакция протекает за 10 мин при 75 °С и приводит к образованию флуоресцирующего производного, поглощающего излучение с длиной волны 390 нм и испускающего излучение с длиной волны 470 нм. Обнаружение с помощью

пиридоксала очень чувствительно, как и большинство флуоресцентных определений. Лигандообменное хроматографирование проводят на заряженных цинком ионообменных насадках при элюировании буферным раствором ацетата натрия в уксусной кислоте с рН 4,1—5,1 и концентрацией цинка 10^{-3} М [1]. Цинк не мешает определению, поэтому аммиак добавляют в элюент для ускорения элюирования сильно основных аминокислот.

Широкое распространение в ЛОХ получил *о*-фталевый альдегид, при добавлении которого в элюент также образуются флуоресцирующие соединения. В присутствии сильного восстановителя это соединение легко реагирует при комнатной температуре с первичными аминами и аминокислотами, за исключением пролина и гидроксипролина, являющихся вторичными аминами. *о*-Фталевого альдегида совсем не взаимодействует с аммиаком или реагирует с ним лишь в незначительной степени. Впервые этот реагент описал Рот [55]; для разделения аминокислот он был использован Бенсоном и Харом [56], которые сравнивали его эффективность с эффективностью нингидрина и флуорескамина. Проявляющая смесь состояла из [56] 0,8 г *о*-фталевого альдегида и 2 г 2-меркаптоэтанола (восстановитель) в 1 л 0,4 М боратного буферного раствора с рН 9,7. Для облегчения реакции с лизином добавляли неионные поверхностно-активные вещества. Аминокислоты давали различную интенсивность флуоресценции; предел обнаружения составлял несколько пикомолей. Длина волны возбуждающего излучения 340 нм, длина волны испускаемого излучения 455 нм. Хар и Гиль-Ав [57] использовали этот реагент для разделения оптических изомеров аминокислот на колонке с заряженной медью катионообменной насадкой при элюировании ацетатным буферным раствором, содержащим медь (II) и *л*-пролин. Хиральный разделяющий агент находился в подвижной фазе. Для предотвращения осаждения меди при добавлении щелочного раствора *о*-фталевого альдегида исследователи вводили этилендиаминтетрауксусную кислоту; как уже упоминалось ранее, *о*-фталевого альдегида не реагирует с пролином.

Вернемся к детектированию по поглощению УФ-излучения. Аминокислоты и карбоновые кислоты обычно поглощают в области ниже 220 нм и в элюентах с низким содержанием меди (не более 0,5 мг/л), не снижающим чувствительности; аминокислоты обнаруживают по поглощению при 206 нм [23], 210 нм [58] или при 214 нм — длине волны, соответствующей интенсивной резонансной линии излучения цинковой лампы. Большинство УФ-детекторов, однако, снабжено ртутными источниками излучения с рабочей длиной волны 254 нм.

Следует отметить, что присутствие ионов меди, являющееся недостатком при УФ-обнаружении в коротковолновой области,

становится преимуществом при больших длинах волн, например при 254 нм. В 1975 г. Навратил, Мургия и Уолтон [59], разделяя аминокислоты и аминокислоты на заряженных медью ионообменных смолах с карбоксильными функциональными группами в 1 М растворе аммиака в качестве элюента, заметили, что элюируемые зоны веществ сильно поглощают при 254 нм. Разделяемые соединения выходили из колонки в форме комплексов с медью, которые поглощали УФ-излучение сильнее и при больших длинах волн, чем комплексы меди (II) с аммиаком. О высоких молярных коэффициентах экстинкции комплексов меди (II) с аминокислотами между 230 и 240 нм сообщалось и раньше [60], но их не использовали в хроматографии. В связи с этим целесообразно, чтобы элюенты содержали незначительное количество меди (II) (от 10^{-3} до 10^{-4} М), достаточное для поглощения УФ-излучения при 230 нм. Этот способ детектирования был использован Мастерсом и Лейденом [46], определившими длины волн максимума поглощения нескольких комплексов меди с аминокислотами. Фуко и Россе [44], как уже было отмечено ранее, устанавливали предколонку с силикагелем, насыщенным медью, не только для того, чтобы подавить растворение кремнезема в щелочных элюентах на основе аммиака в аналитической колонке, но и для создания определенной концентрации меди (II), необходимой для детектирования. Этот прием использовал и Грушка [61], проводивший лигандный обмен в подвижной фазе для разделения аминокислот на силикагеле с привитыми октадецильными группами. Элюент содержал $3 \cdot 10^{-4}$ М CuCl_2 и в ряде случаев — ацетатный буферный раствор. Грушка представил в виде таблицы данные по молярным коэффициентам экстинкции (поглощения) комплексов меди с несколькими аминокислотами при 230 нм, изменявшиеся от 1100 л/(моль·см) для валина до 4400 л/(моль·см) для глутаминовой кислоты, что соответствовало пределу обнаружения порядка нескольких нанограммов. Этот способ обнаружения является в настоящее время общепринятым для аминокислот и аминокислот, а также, вероятно, пригоден и для обнаружения диаминов и полиаминов. Детектирование проводят при 254 нм, соответствующей интенсивной линии излучения ртутной лампы, что несколько снижает чувствительность.

2.1.4. Порядок элюирования

Селективность и порядок выхода веществ в лигандообменной хроматографии отражают величины свободных энергий замещения лигандов в сорбенте, включающих и существенный вклад взаимодействия лигандов с матрицей носителя. Константы

Таблица 2.1. Порядок элюирования аминов в различных ионообменных системах [30]

Ион металла	Ni				Cu		
	С сульфогруппами	С карбоксильными группами	Хелатирующие	Гель фосфата цинкоия	С карбоксильными группами	Хелатирующие	Фосфат целлюлозы
Диэтаноламин	1	1	1	4	1	1	1
Этаноламин	2	4	2	3	(2)	2	2
Диметиламин	3	3	3	2	3	3	4
n-Бутиламин	4	2	4	1	(2)	4	3

Таблица 2.2. Порядки элюирования диаминов и полиаминов^a

Тип обменника	Сульфированный полистирол		Полиакриловый (карбоксильный)		Целлюлоза (карбоксильный)		
	Cu	Zn	Cu	Zn	Cu	Zn	Ni
Ион металла							
Диамины:							
C ₂	5	6	7	—	—	—	—
C ₃	4	1	6	2	6	1	5
C ₄	—	2	3	4	1	2	1
C ₅	—	5	4	5	2	5	3
C ₆	3	7	5	6	4	6	4
Полиамины:							
спермидин	1	3	1	1	3	3	2
спермин	2	4	2	3	5	4	3
Концентрация аммиака, M		7		4	1,1	1,7	1,1

^aИз работы: *Navratil J. D., Walton H. F., Recent Developments in Separation Science*, vol. 6, Li N. N. (ed.) CRC Press, Boca Raton, Fla, 1981, chap. 5.

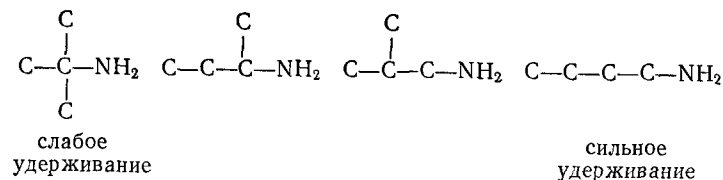
устойчивости комплексов металл — лиганд в водных растворах представляют лишь приблизительный ориентир. Например, комплексы (1 : 1) никеля(II) с этаноламином и диметиламином в воде характеризуются константами образования 950 и 50 л/моль соответственно, тогда как заряженный никелем сульфированный полистирол связывает диметиламин сильнее, чем этаноламин [62]. Путем замены матрицы сорбента, фиксированных ионов на его поверхности, а также противоионов металлов в элюенте можно широко варьировать последовательность элюирования, как это показано в табл. 2.1 и 2.2. Воз-

можность изменять порядок элюирования относится к преимуществам лигандообменной хроматографии.

Проанализировав порядки выхода соединений различных классов, можно сформулировать следующие общие положения в отношении элюирования аминов из системы металл — сорбент на основе полистирола:

Во-первых, связывание лигандов очень чувствительно к стерическим затруднениям. Первичные амины удерживаются сильнее вторичных, а вторичные — сильнее третичных. Производные с заместителем у углеродного атома, смежного с аминогруппой (например, —CHR—NH₂), удерживаются слабее, чем амины без таких заместителей.

Во-вторых, для изомеров первичных аминов, чем сильнее разветвлена углеводородная цепь, тем слабее удерживается амин лигандообменным сорбентом. Для первичных бутиламинов был выявлен следующий порядок элюирования в системе никель — сульфированный или хелатообразующий полистирол [63]:



Изопропиламин удерживается слабее, чем n-пропиламин. Определенную роль здесь играет взаимодействие между молекулой амина и водой подвижной фазы. Чем протяженнее молекула, тем сильнее она нарушает структуру воды, основанную на водородных связях, и тем сильнее она вытесняется из водной фазы в фазу сорбента. Это обобщение справедливо и для распределения изомерных спиртов между водой и сорбентом на основе сульфированного полистирола независимо от противоиона этого сорбента.

В-третьих, гидроксильная группа в молекуле может усиливать или ослаблять притяжение аминов к заряженному сорбенту в зависимости от того, что оказывается сильнее — образование бидентатного хелатного кольца или усиление гидрофильных взаимодействий. Так, например, этаноламин удерживается слабее, чем этиламин на заряженном никелем сорбенте, в то время как норэфедрин C₆H₅CHONCH(CH₃)NH₂ удерживается сильнее на сорбенте, заряженном никелем(II) или медью(II), чем амфетамин C₆H₅CH₂CH(CH₃)NH₂ [31].

2.2. Равновесие металл — лиганд в фазе сорбента и в растворах

Ранее было показано, что константы устойчивости комплексов металл—лиганд, измеренные в водных растворах, не связаны непосредственно с селективностью и последовательностью элюирования с ионообменных смол, заряженных ионами металла. Внутри ионообменников гелевого типа объем воды лимитирован, и взаимодействие между лигандами и матрицей лигандообменника вносит существенный вклад в энергию комплексообразования.

Лучше всего для изучения поведения незаряженных лигандов подходит аммиак. Стокс и Уолтон [64] в 1953 г. изучали комплексы металла с аммиаком в катионообменных смолах. Они брали определенные навески сухой смолы в водородной форме и встряхивали ее с растворами, содержащими нитрат меди или серебра, нитрат аммония и некоторое количество аммиака, достаточное для нейтрализации всех ионов водорода в смоле и образования комплексов с ионами металла. После установления равновесия авторы измеряли количество ионов металла (которое было незначительным), общее количество титруемого аммиака и величину pH. Концентрацию ионов аммония в растворе легко находили из количества добавленных солей, а активность свободного аммиака рассчитывали из концентрации ионов аммония и pH. Были построены графики зависимости отношения связанного аммиака к общему количеству ионов металла в обменнике от отрицательного логарифма активности свободного аммиака в растворе. Кривые для меди(II) и серебра(I) представлены на рис. 2.3. Они соответствуют двум различным ионообменным смолам: сульфированному полистиролу с 10% сшивок и акриловому полимеру с карбоксильными функциональными группами. Графики представляют собой зависимости, полученные Бьеррумом для ассоциации ионов металла с аммиаком в водных растворах.

Рис. 2.3 иллюстрирует тот факт, что в фазе сульфированного полистирола комплексы металл—аммиак по устойчивости соответствуют (не более и не менее) аналогичным комплексам в концентрированных водных растворах. В фазе акрилатных смол комплексы существенно менее стабильны, чем в воде или концентрированных растворах соли. Очевидно, это объясняется тем, что ионы металла здесь уже координационно связаны в комплексы с карбоксильными группами смолы, что приводит к снижению емкости связывания молекул аммиака. Гельферих [65] при теоретическом описании лигандного обмена аммиака и диаминов в сорбентах с карбоксильными функциональными группами, заряженными медью, считал, что две координацион-

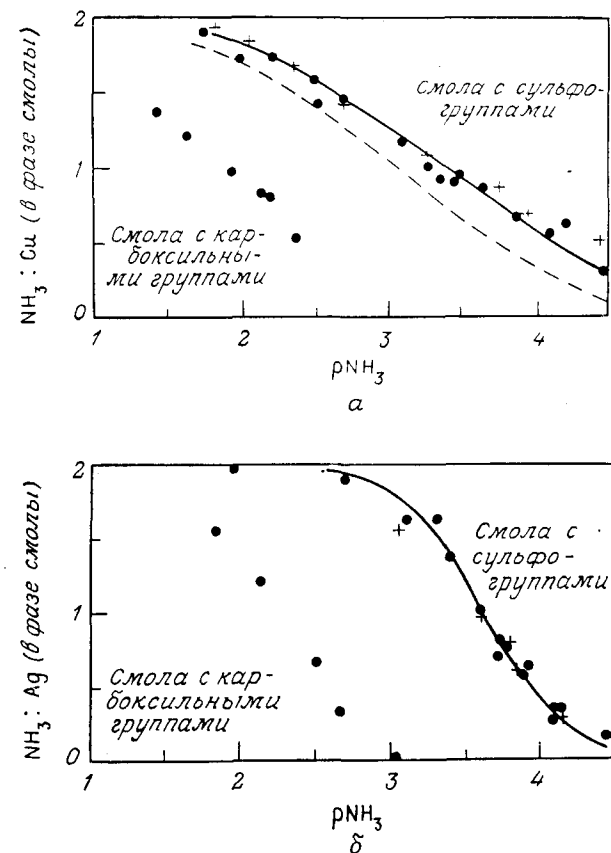


Рис. 2.3. Кривые образования комплексов медь(II) — аммиак (а) и серебро — аммиак (б). Точки соответствуют ионообменным смолам, сплошные линии — данным Бьеррума для комплексообразования в водных растворах нитрата аммония (5 М — график а, 2 М — график б), штриховые линии — кривым образования в 0,5 М NH_4NO_3 [64].

ные связи у меди(II) блокированы, остаются только две свободные координационные связи для образования комплексов с аммиаком и диаминами. Как следует из рис. 2.3, а, такое описание не вполне правильно, так как ионы меди способны связывать три молекулы аммиака и, возможно, еще больше. Повидимому карбоксилат-ионы вызывают общую дестабилизацию комплексов медь(II)-аммиак. Необходимо помнить, что координационное число меди(II) шесть, а не четыре. Геометрически координационная сфера меди(II) представляет собой искаженный октаэдр, где четыре координационные связи, находящиеся

в одной плоскости, достаточно прочны, а две аксиальные связи сравнительно слабы. Тем не менее аксиальные связи важны для комплексообразования в ионообменниках, особенно при разделении оптических изомеров [49]. Ловенцус и Шмуклер [66] пришли к заключению, что ионы меди в составе иминодиацетатных хелатирующих смол удерживают три молекулы

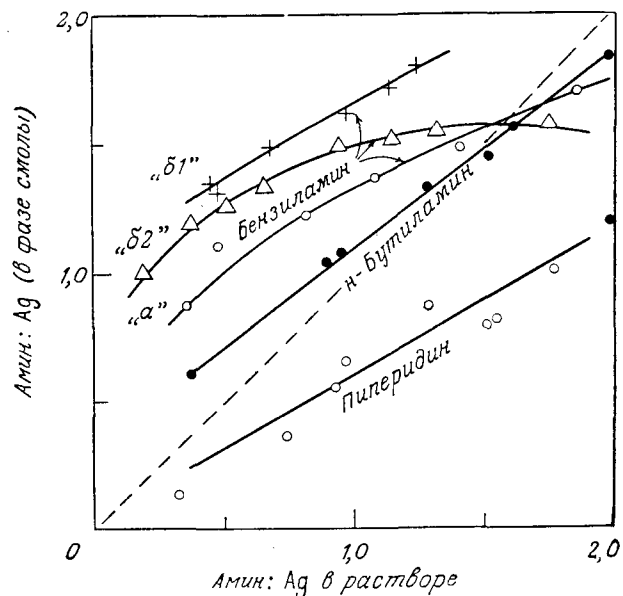


Рис. 2.4. Сравнение устойчивости комплексов в растворах и в фазе ионообменника. На оси ординат отложено отношение количества связанного аммиака к общему количеству серебра в сульфированном полистирольном ионообменнике со степенью сшивки 8%; на оси абсцисс — отношение количества связанного аммиака к общему количеству серебра в водном растворе. Для бензиламина кривая *a* соответствует содержанию 2 мг-экв. серебра на грамм катионообменника, кривые *δ1* и *δ2* соответствуют двум другим катионообменникам, содержащим 2 и 5 мг-экв. серебра на грамм катионообменника соответственно [64].

воды, т. е. они координированы по вершинам октаэдра. Способность серебра (I) связывать две молекулы аммиака в составе акрилатных смол (рис. 2.3, б) объяснить пока трудно.

Уолтон и сотр. [62, 64, 67] провели аналогичные эксперименты для изучения ассоциации алифатических и ароматических аминов с медью (II), серебром (I), цинком и никелем (II). Были построены графики для сравнения устойчивости комплексов в фазе сорбентов и в растворах (см. рис. 2.4).

Из рис. 2.4 очевидно, что комплексы в растворе и в фазе ионообменника имеют разную устойчивость. Ароматические

амины образуют более устойчивые комплексы в фазе сорбента на основе полистирола, чем в растворе, что, несомненно, обусловлено образованием π -связей с ароматическими кольцами смолы. Пиперидин, являющийся неароматическим вторичным амином, образует более слабые комплексы в фазе лигандообменника, возможно, из-за стерических затруднений (см. обсуждение порядка элюирования). В общем случае, комплексы более устойчивы при низком соотношении лиганд : металл, чем

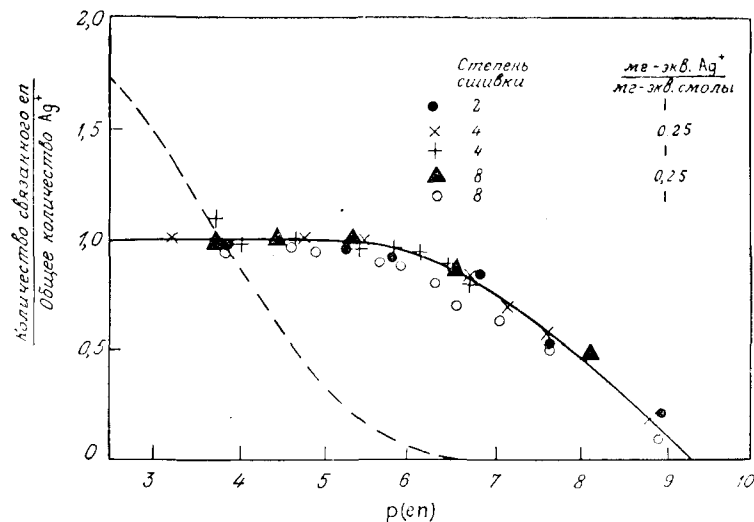


Рис. 2.5. Кривые образования комплексов серебра с этилендиамином (en) в растворе и в фазе катионообменника [67].

при высоком, по-видимому, из-за эффекта «переполнения» при высоких концентрациях лигандов.

В условиях хроматографического эксперимента оперируют с низкими соотношениями лиганд : металл, поэтому здесь комплексы, вероятно, более стабильны в фазе лигандообменника, чем в растворе, что подтверждает пример *n*-бутиламина на рис. 2.4.

Моно-, ди- и триэтаноламины связываются слабее в фазе лигандообменника, чем в растворе [62], что может быть обусловлено большими возможностями для образования водородных связей в водной фазе.

Интересную ситуацию с диаминами иллюстрирует рис. 2.5, представляющий кривые образования комплексов серебра (I) с этилендиамином в фазе ионообменника и в растворе. При не-

значительном числе лигандов комплекс в фазе сорбента устойчивее в тысячу раз. Процесс комплексообразования останавливается в фазе сорбента при соотношении лиганд : ион металла 1 : 1, тогда как в растворе соответственно 2 : 1. Было сделано предположение, что этилендиамин выступает в роли мостикового лиганда, соединяющего два иона серебра.

Ряд статей Скорохода и сотрудников был посвящен изучению ассоциации ионов металлов с незаряженными лигандами в катионообменниках из сульфированного полистирола. Первоначально исследования [3, 68] были посвящены тиомочевине и катионам кадмия(II), цинка и свинца(II). Ионит, заряженный ионами металла, встряхивали с водным раствором тиомочевины и после реакции измеряли остаточное содержание тиомочевины в растворе. Графики зависимости отношения количества связанных лигандов к общему количеству ионов металла в сорбенте n от отрицательного логарифма концентрации тиомочевины в растворе p (ТМ) представляли собой кривые, аналогичные кривым на рис. 2.3, т. е. кривые Бьеррума. Соответствующее значение n заключено между 0 и 2, т. е. комплексы не относились к числу устойчивых. Кривые показывают, что комплексы более устойчивы в фазе сорбента, чем в водном растворе, и ассоциация в фазе сорбента проходит до более высоких соотношений лиганд : металл; комплекс $Cd(ТМ)_4^{+}$ полностью устойчив в 1 М водном растворе тиомочевины. При исследовании влияния степени сшивки полимерной матрицы было установлено, что комплексы с большим числом лигандов дестабилизируются при увеличении степени сшивки с 8 до 12%. Комплексы кадмий — тиомочевина в фазе ионита значительно более устойчивы, чем комплексы с цинком. В связи с этим цинк очень легко отделить от кадмия на колонке с катионообменной смолой элюированием цинка разбавленным раствором тиомочевины, содержащим нитрат натрия, в то время как кадмий остается в колонке.

Объясняя эти результаты, Скороход предположила, что ассоциация происходит вследствие ион-дипольного взаимодействия, которое усиливается в фазе сорбента ввиду его более низкой диэлектрической проницаемости.

К числу других лигандов, изученных Скороход, относятся пиридин и метильные производные пиридина (пиколины) [69], изомеры бипиридила, 1,10-фенантролин и этилендиамин [70]. α -Пиколин (2-метилпиридин) значительно слабее связывается медью(II) и кадмием(II) в фазе лигандообменника, чем β - и γ -пиколин, очевидно, ввиду рассмотренных выше стерических затруднений. Комплексы более устойчивы в фазе сорбента, чем в растворе, причем их устойчивость возрастает в ряду: этилендиамин (самый неустойчивый), бипиридил, фенантролин

(самый устойчивый); ароматические соединения сильнее удерживаются полистирольной матрицей. При низких соотношениях лиганд : металл устойчивость комплексов возрастает с увеличением степени сшивки полимерной матрицы; при высоких соотношениях возникает эффект «переполнения». Комплексы с максимальным числом лигандов наименее стабильны в фазе лигандообменника или не возникают вообще. Первая константа образования (K_1) комплекса этилендиамина с медью(II) и никелем(II) в фазе лигандообменника приблизительно в десять раз больше, чем в растворе; K_2 соответственно больше приблизительно в три раза. Тенденцию к стабилизации комплексов с уменьшением соотношения лиганд : металл и к дестабилизации с увеличением этого соотношения иллюстрирует рис. 2.6. Особенно ярко эта тенденция прослеживается на примере α, α' -бипиридила.

Сравнивая устойчивость комплексов в фазе лигандообменника и в растворе, обычно делают молчаливое допущение, что термодинамическая активность несвязанного незаряженного лиганда одинакова как в фазе лигандообменника, так и в растворе. Это допущение, вероятно, является правильным, но неверно говорить, что концентрации свободных лигандов одинаковы в обеих фазах. Для аммиака молярные концентрации в фазе лигандообменника и вне его, по-видимому, примерно одинаковы, что справедливо и для других небольших молекул типа метиламина и этилендиамина. Однако следует ожидать, что большинство органических лигандов, особенно ароматических, в большей степени будут концентрироваться в лигандообменнике, т. е. соотношение несвязанных лигандов к воде будет больше в фазе лигандообменника. Скороход и Варавва [3] пытались оценить этот эффект для тиомочевины путем измерения ее сорбции смолой, заряженной некомплексообразующими ионами Na^+ , K^+ и H^+ . Сорбция хотя и не равнялась нулю, но была очень мала; она составляла только 2—3% от сорбции, наблюдавшейся в присутствии комплексообразующих металлов.

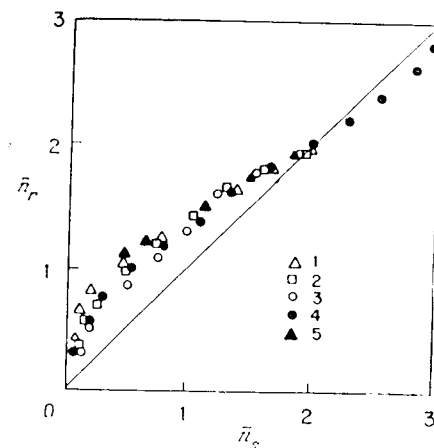


Рис. 2.6. Распределение этилендиамина между катионообменником КУ-2 и водным раствором (1—3) $Cu(NO_3)_2$ и $Ni(NO_3)_2$ (4). Кривая 5 рассчитана по данным, приведенным в работе [62, 70].

Сравнивая устойчивость комплексов в фазе лигандообменника и в растворе, обычно делают молчаливое допущение, что термодинамическая активность несвязанного незаряженного лиганда одинакова как в фазе лигандообменника, так и в растворе. Это допущение, вероятно, является правильным, но неверно говорить, что концентрации свободных лигандов одинаковы в обеих фазах. Для аммиака молярные концентрации в фазе лигандообменника и вне его, по-видимому, примерно одинаковы, что справедливо и для других небольших молекул типа метиламина и этилендиамина. Однако следует ожидать, что большинство органических лигандов, особенно ароматических, в большей степени будут концентрироваться в лигандообменнике, т. е. соотношение несвязанных лигандов к воде будет больше в фазе лигандообменника. Скороход и Варавва [3] пытались оценить этот эффект для тиомочевины путем измерения ее сорбции смолой, заряженной некомплексообразующими ионами Na^+ , K^+ и H^+ . Сорбция хотя и не равнялась нулю, но была очень мала; она составляла только 2—3% от сорбции, наблюдавшейся в присутствии комплексообразующих металлов.

Концентрацию свободных, или несвязанных, лигандов в рассматриваемой системе очень трудно измерить экспериментально, поэтому ею обычно пренебрегали. Химический потенциал незаряженных свободных лигандов, однако, должен быть одинаковым в обеих фазах.

Маес и Кремерс [71—74] предложили новый подход к оценке устойчивости комплексов. Допустим, что два катиона распределены между фазой сорбента и раствором и один из добавленных лигандов образует комплексы с одним из катионов, а с другими присутствующими катионами комплексов не образует. Если комплекс более устойчив в фазе сорбента, чем в растворе, добавление лиганда приведет к тому, что комплексобразующий катион перейдет из раствора в фазу лигандообменника. Если же в фазе сорбента комплекс менее устойчив, добавление лиганда обусловит переход комплексобразующего катиона в раствор.

Добавление незаряженных лигандов может вызвать изменения в коэффициентах ионообменного распределения, что было отмечено Инцеди [75, 76] и использовано для улучшения разделения ионов металлов методом ионообменной хроматографии. Так, например, добавление нейтрального пиридина к суспензии катионообменной смолы в пиридиний-форме в растворе пиридинийхлорида, содержащего небольшое количество меди(II), вызовет вытеснение меди(II) из раствора в фазу сорбента. Цинк также вытесняется из раствора, но в значительно меньшей степени. Ионы цинка и меди эффективно разделяли на колонке с катионообменной смолой в пиридиний-форме при элюировании пиридинийхлоридом, содержащим небольшой избыток пиридина; при этом цинк элюировался первым. Вейнерт и Стрелов [77] показали, что тиомочевина, являющаяся незаряженным лигандом, вызывает увеличение коэффициента распределения таких металлов, как медь(II), между катионообменной смолой и разбавленным раствором соляной кислоты, но снижение коэффициента распределения других металлов, например цинка.

Маес и Кремерс [71—74] выбрали для исследования систему медь(II) — этилендиамин с кальцием в качестве некомплексобразующего конкурирующего катиона. Этилендиамин координируется с медью(II) в две стадии, образуя катионы $\text{Cu}(\text{en})^{2+}$ и $\text{Cu}(\text{en})_2^{2+}$ со следующими ступенчатыми константами образования: $\lg K_1 = 10,72$ и $\lg K_2 = 9,31$. Приведенные константы достаточно высоки, чтобы небольшой избыток этилендиамина стабилизировал комплекс 2:1 $\text{Cu}(\text{en})_2$, и поэтому только этот комплекс нужно принимать во внимание. Константы обменного равновесия Cu^{2+} (водн.) и $\text{Cu}(\text{en})_2^{2+}$ с Ca^{2+}

можно записать в следующем виде:

$$\frac{[\overline{\text{Cu}^{2+}}][\text{Ca}^{2+}]}{[\text{Cu}^{2+}][\overline{\text{Ca}^{2+}}]} = K \quad \frac{[\overline{\text{Cu}(\text{en})_2^{2+}}][\text{Ca}^{2+}]}{[\text{Cu}(\text{en})_2^{2+}][\overline{\text{Ca}^{2+}}]} = K^L$$

Члены с чертой соответствуют фазе раствора. Было выведено соотношение

$$\frac{K^L}{K} = \frac{[\overline{\text{Cu}(\text{en})_2^{2+}}][\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Cu}(\text{en})_2^{2+}][\overline{\text{Cu}^{2+}}]} = \frac{\overline{\beta}_2}{\beta_2} \frac{[\overline{\text{en}}^2]}{[\text{en}^2]}$$

где β_2 — общая константа образования, $K_1 K_2$, для комплекса $\text{Cu}(\text{en})_2^{2+}$. Маес и Кремерс назвали соотношение $\overline{\beta}_2/\beta_2$ «константой избыточной стабильности» K_{syn} . Если активности этилендиамина одинаковы в обеих фазах (есть все основания считать, что это именно так), тогда K_{syn} представляет собой просто отношение двух констант равновесия: K^L (измеренную при избытке лиганда) и K (измеренную в отсутствие лиганда). Это истинные константы равновесия, поскольку они были определены путем измерения концентрационных констант K_c во всем интервале составов фазы сорбента и интегрированы методом Гэйнса — Томаса.

Измерения были проведены для двух ионообменников: макропористого сульфированного полистирола и монтмориллонитовой глины. Значения, найденные для K_{syn} , составляли соответственно 22 и 850.

Для определения ступенчатых констант образования K_1 и K_2 применяли две методики. По одной из них, основанной на методе Бьеррума, заряженный металлом лигандообменник приводили в равновесие с растворами, содержащими свободные лиганды в различных концентрациях. Найденное отношение (количество связанного лиганда к общему количеству металла) для лигандообменника и отрицательный логарифм концентрации свободных лигандов откладывали по осям координат графика и получали зависимость, аналогичную изображенной на рис. 2.3. Для определения значений K_1 и K_2 проводили численный анализ. Из этих графиков с довольно хорошей надежностью можно найти K_1 ; при определении K_2 ошибки могут быть достаточно большими. Вторая методика основана на определении зависимости изменения ионообменного распределения комплексобразующего металла от изменения соотношения лиганд: металл. Вторая методика особенно полезна в том случае, когда первый комплекс дестабилизирован. Тогда коэффициент распределения ионов металла характеризуется максимумом при концентрации свободного лиганда, близкой к $\beta_2^{-0,5}$. Максимум коэффициента распределения чувствителен к

соотношению $K_2 : K_1$, что позволяет рассчитать K_2 с достаточно хорошей точностью.

Применяя этот метод к комплексу серебра с тиомочевинной, Маес и Кремерс нашли, что в макропористых обменниках K_1 более чем в 10^4 раз больше, чем в воде; одновременно с этим K_2 существенно ниже в фазе лигандообменника.

Данные по комплексам меди с этилендиамином собраны в табл. 2.3. Как K_1 , так и K_2 в обоих ионообменниках выше, чем в воде; сходимость значений K_2 максимальна для монтмориллонитовой глины. Впоследствии было показано [74], что сходимость K_2 зависит от плотности заряда глины и становится минимальной, когда плотность заряда приближается к нулю.

Таблица 2.3. Константы устойчивости для комплексов меди с этилендиамином, полученные по кривым образования Бьеррума [72]

Обменник	$\lg K_1$	$\lg K_2$	$\lg \beta_2$	Общая константа устойчивости
Монтмориллонит	11,60	11,50	23,10	$10^{3,1}$
Макропористые смолы	11,65	9,70	21,35	$10^{1,32}$
В растворе	10,72	9,31	20,03	—

Причины стабилизации комплексов в ионообменниках не ясны до сих пор. Стабилизация отмечалась для комплексов с монодентатными лигандами, например тиомочевинной и пиридином, а также для комплексов с бидентатными лигандами. Это нельзя объяснить образованием внутренних поперечных связей, постулированных для серебра (I) и этилендиамина [67]. Силы притяжения между лигандом и матрицей ионообменника усиливают прочность связи металл—лиганд и стабилизируют комплекс. Органические лиганды ароматического характера притягиваются к ароматической матрице полистирольного ионообменника, и поэтому можно ожидать стабилизации, например пиридинового комплекса. Такое притяжение тем не менее не объясняет стабилизации, отмеченной для ионообменных глин.

2.3. Распределение неионных органических соединений между сорбентами и растворами

Удерживание органических соединений ионообменниками представляет собой сложное явление, включающее несколько видов взаимодействий. При лигандном обмене главным взаимодействием является координация металла с лигандом, но она сопровождается и другими взаимодействиями. Как было показано, комплексы металл—лиганд подчас оказываются во много раз

стабильнее в фазе ионообменника, чем в растворе, но возможна и иная картина. На координацию металл—лиганд могут влиять и другие взаимодействия.

Для выявления этих взаимодействий целесообразно исследовать сорбцию незаряженных органических соединений ионообменниками, когда координация металл—лиганд незначительна или вообще отсутствует. Рассмотрим сорбцию ароматических углеводородов ионообменными полистирольными смолами. Углеводородные молекулы удерживаются полимером благодаря перекрыванию ароматических π -электронов. Молекулы ароматического характера (в этот класс входят также ксантины и другие ароматические соединения небензоидного строения) всегда сильнее удерживаются полистирольной матрицей ионообменника, чем алифатические соединения, независимо от того, является ли основным механизмом ионный обмен, лигандный обмен или просто растворяющее воздействие полимера.

Уолтон и сотр. [21, 78] изучили распределение ароматических углеводородов между катионообменниками и водно-органическими растворителями. Было установлено, что это распределение в основном зависит от свойств неорганического катиона в фазе ионообменника. Чем больше заряд катиона, тем сильнее удерживается углеводород. Для фенантрена, например, найдены следующие значения удерживания (коэффициентов емкости) для противоионов в фазе катионообменника на основе сульфированного полистирола со степенью сшивки 4% при использовании в качестве подвижной фазы 37%-ного раствора 2-пропанола в воде: Na 3,7; NH_4 4,4; Ca 7,9; Fe(III) 8,2. Для неионных полярных ароматических соединений типа кофеина и ацетанилида обнаружена сходная последовательность. Катион La^{3+} обеспечивал приблизительно такое же удерживание, как и Fe^{3+} , примерно вдвое превышающее удерживание в присутствии катионов Na^+ . Точные соотношения зависят от степени сшивки смолы и ее физической формы: гелевой или макропористой.

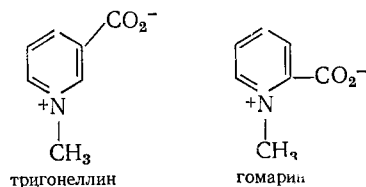
При интерпретации полученных результатов целесообразно рассматривать ионообменные смолы как твердый органический растворитель, на свойства которого влияет присутствие ионных групп и иммобилизованной воды. Помещенная в содержащий воду растворитель ионообменная смола сама ведет себя как смешанный водно-неводный растворитель и тем сильнее удерживает неполярный или слабополярный органический компонент, чем меньше в ней содержится воды.

Содержание воды в набухшей смоле зависит от неорганического противоиона. В этом случае важна степень гидратации иона, но еще важнее заряд иона. Когда двухзарядный катион

замещает два однозарядных катиона, смола сжимается и вода вытесняется. Этот эффект вызван электростатическим притяжением: двухзарядный ион притягивает фиксированные сульфо-анионы разных полимерных цепей и тем самым сближает их.

Далее приведена еще одна концепция. В случае линейной полимерной цепи с отрицательными ионами, расположенными через определенные интервалы по всей ее длине, подвижный двухзарядный катион в соответствии с законом электростатического взаимодействия займет наиболее устойчивое положение вблизи одного из фиксированных ионов, а не между ионами. Естественно, что расположение подвижного катиона в известной степени определено тепловым движением, но данные эксперимента, а именно скорость диффузии катионов различного заряда в фазе катионообменника из поперечно-сшитого полистирола [79], однозначно показывают, что противоионам при их перемещении в катионообменнике приходится преодолевать энергетический барьер, который тем выше, чем больше заряд иона. Другими словами, происходит образование ионных пар, и легко заметить, что катионы с двумя или тремя зарядами могут вызывать электростатическую сшивку. При введении таких ионов полимеры сжимаются, выделяя воду. Одновременно с этим они начинают лучше поглощать (растворять) ароматические углеводороды или ароматические соединения средней полярности.

Интересное действие оказывают цвиттер-ионы аминокислот, в том числе тригонеллин и гомарин:



Катионообменники, заряженные кальцием, удерживают эти соединения значительно сильнее, чем катионообменники, заряженные натрием, и еще сильнее при использовании лантана. Аналогичную картину можно наблюдать и для простых аминокислот, как, например, глицина, α - и β -аланина, причем эффект тем заметней, чем больше их дипольный момент. Так, катионообменники с Ca^{2+} или La^{3+} в качестве противоионов удерживают тригонеллин сильнее гомарина, а β -аланин сильнее α -аланина [80]. Причиной этому может быть притяжение между ионами и диполями или сильное электростатическое поле, возникающее в ионообменнике между двух-, трехзарядными иона-

ми и соседними незанятыми фиксированными ионами (рис. 2.7).

Влияние гидратации ионов можно проследить, сравнивая удерживание на ионообменниках с различными противоионами одинакового заряда, например с ионами щелочных металлов. Такое исследование провели Дитер и Уолтон [81] для растворимых в воде полярных ароматических соединений (рис. 2.8). В качестве противоионов они использовали Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} . Среди исследованных ими веществ были выявлены две различные тенденции: для ксантинов, кофеина, теобромидина, теофилина, цвиттер-иона тригонеллина, амидов ацетанилида и фенацетина, а также, возможно, для этил- и метилбензоата удерживание возрастает в следующем ряду противоионов: $\text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+$, а также при переходе от K^+ к Mg^{2+} . Для соединений со свободными фенольными группами, метил- и этилпарабена, а также для самого фенола наблюдается возрастание удерживания в ряду $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$ и уменьшение при переходе от K^+ к Mg^{2+} . В первой группе, чем сильнее гидратирован противоион, тем больше удерживание. Во второй группе отмечена обратная зависимость.

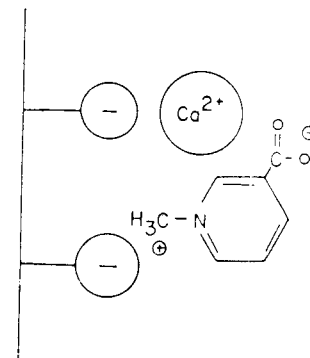


Рис. 2.7. Постулированное удерживание цвиттер-иона тригонеллина ионообменником с двухзарядными ионами (Ca^{2+}) [21].

На первый взгляд чем выше содержание воды в набухшем катионообменнике, тем слабее должно быть поглощение (растворение) органических соединений. Однако, поскольку гидратирующая ионы вода является связанной, она не влияет на способность полимерной матрицы сольватировать различные соединения. Широко известное явление высаливания органических веществ из воды основано на связывании воды добавленной солью. Количественно гидратную воду можно определить по коэффициентам активности в соответствии с теорией сильных электролитов; общее количество воды в набухшем ионообменнике можно определить центрифугированием и взвешиванием. Комбинируя оба этих измерения, Дитер и Уолтон [81] пришли к выводу, что, хотя общее содержание воды в эквиваленте ионообменника при использовании в качестве противоиона лития является максимальным, содержание свободной воды, т. е. воды, не участвующей в гидратации, в этом случае самое низкое среди всех щелочных металлов. Еще меньше свободной воды при использовании в качестве противоионов Mg^{2+} и Ca^{2+} , и, как уже отмечалось, в присутствии двухзарядных катионов наблюдается большая сорбция ароматических углеводов.

Другую картину наблюдали в экспериментах с фенолами, когда свободная вода способствовала сорбции, а не подавляла ее. Это скорее всего обусловлено образованием водородных связей между свободной водой и гидроксильными фенольными группами.

Распределение сахаров между растворами и ионообменниками определяется образованием водородных связей. Класси-

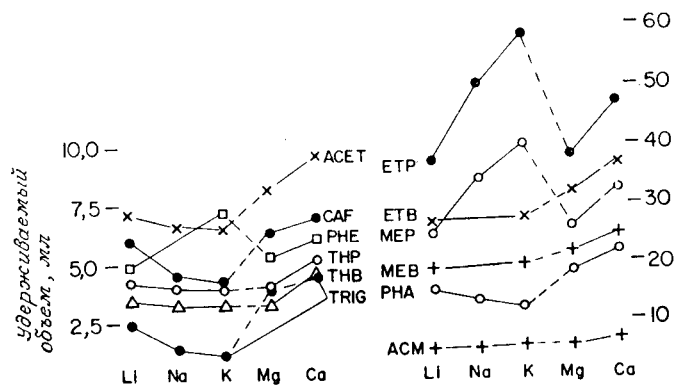


Рис. 2.8. Зависимость удерживаемых объемов органических соединений в катионообменнике со степенью шивки 8% от свойств неорганического противоиона.

ACET — ацетанилид, N-ацетилфениламин; CAF — кофеин, 1,3,7-триметилксантин; ETB — этилбензоат; ETP — этилпарабен, этил-*n*-гидроксibenзоат; MEP — метилбензоат; MEB — метилпарабен, метил-*n*-гидроксibenзоат; PHA — фенацетин, 4'-этоксиацетанилид; PHE — фенол; THB — теобромин, 3,7-диметилксантин; THP — теофиллин, 1,3-диметилксантин; TRIG — тригонеллин или N-метилпиридиний-3-карбоксилат.

ческое исследование Рюкерта и Самуэльсона [82] показало, что сорбция глюкозы катионообменником, заряженным ионами щелочных металлов, возрастает в ряду $Li^+ < Na^+ < K^+$. Эту же зависимость наблюдали и другие исследователи [80]. Свободная вода, не участвующая в гидратации, удерживает сахар в фазе катионообменника, что более подробно обсуждается в гл. 6.

Литература

1. Maeda M., Tsuji A., Ganno S., Onishi Y., Fluorophotometric assay of amino acids by using automated ligand-exchange chromatography and pyridoxal-zinc(II) reagent, *J. Chromatogr.*, **77**, 434 (1973).
2. Wagner F. W., Shepherd S. L., Ligand exchange amino acid analysis: resolution of some amino sugars and cysteine derivatives, *Anal. Biochem.*, **41**, 314, 1971.

3. Скороход О. Р., Варрава А. Г. Комплексы тиомочевины с кадмием в сульфокатионитах КУ-2, *ЖФХ*, **46**, 1708 (1972).
4. Shimotsuma K., Walton H. F., Thin-layer chromatography of amines by ligand exchange, *Sep. Sci.*, **3**, 493 (1968).
5. Yasuda K., Thin-layer chromatography of aromatic amines on cadmium sulphate-impregnated silica gel thin layers, *J. Chromatogr.*, **60**, 144 (1971).
6. Kunzru D., Frei R. W., Separation of aromatic amine isomers by high-pressure liquid chromatography on cadmium-impregnated silica gel columns, *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 191 (1974).
7. Vogt C. R., Ryan T. R., Baxter J. S., High-speed liquid chromatography on cadmium-modified silica gel, *J. Chromatogr.*, **136**, 221 (1977).
8. Frei R. W., Beall K., Cassidy R. M., Determination of aromatic nitrogen heterocycles in air samples by high-speed liquid chromatography, *Mikrochim. Acta*, p. 859, 1974.
9. Guha O. K., Janak J., Charge transfer complexes of metals in the chromatographic separation of organic compounds, *J. Chromatogr.*, **68**, 325 (1972).
10. Houx N. W. H., Voerman S., Jongen W. M. F., Purification and analysis of synthetic insect sex attractants by liquid chromatography on a silver-loaded resin, *J. Chromatogr.*, **96**, 25 (1974).
11. Snyder L. R., Nitrogen and oxygen compound types in petroleum, *Anal. Chem.*, **41**, 314 (1969).
12. Funasaka W., Hanai T., Fujimura K., Ando T., Nonaqueous solvent chromatography, *J. Chromatogr.*, **78**, 424 (1973).
13. Walton H. F., Martinez J. M., Reactions of Hg(II) with a cation-exchange resin, *J. Phys. Chem.*, **63**, 1318 (1959).
14. Petronio B. M., DeCaris E., Iannuzzi L., Some applications of ligand-exchange. II, *Talanta*, **29**, 691 (1982).
15. Shahwan G. J., Jezorek J. R., Liquid chromatography of phenols on an 8-quinolinol silica gel-iron(III) stationary phase, *J. Chromatogr.*, **256**, 39 (1983).
16. Maslowska J., Pietek W., The use of ligand exchange for the separation of aromatic acids on synthetic cation exchangers, *Chromatographia*, **20**, 46 (1985).
17. Webster P. V., Wilson J. N., Franks M. C., Macroreticular ion-exchange resins: some analytical applications to petroleum products, *Anal. Chim. Acta*, **38**, 193 (1967).
18. Funasaka W., Fujimura K., Kuriyama S., Ligand exchange chromatography. I. Separation of phenylaminodiamine isomers, *Bunseki Kagaku*, **18**, 19 (1969).
19. Fujimura K., Koyama T., Tanigawa T., Funasaka W., Studies in ligand-exchange chromatography. IV. Separation of hydroxybenzoic and hydroxynaphthoic acid isomers, *J. Chromatogr.*, **85**, 101 (1973).
20. Kothari R. M., Some aspects of the fractionation of DNA on an IR-120-Al(III) column, *J. Chromatogr.*, **57**, 83 (1971).
21. Otto J., de Hernandez C. M., Walton H. F., Chromatography of aromatic acids on La-loaded ion-exchange resins, *J. Chromatogr.*, **247**, 91 (1982).
22. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Tsyurupa M. P., Factors determining the swelling power of crosslinked polymers, *Angew. Makromol. Chem.*, **32**, 145 (1973).
23. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Tsyurupa M. P., Influence of polymeric matrix structure on performance of ion-exchange resins, in *Ion Exchange and Solvent Extraction*, Vol. 7, Marinsky J. A., Yizhok M. (eds.), Marcel Dekker, New York, 1977, chap. 2.
24. Del Rosario Maury M., Pottrinaud C., Tremilon B., Sorption of ammonia from an aqueous solution by complexation with ion exchanger containing phosphonic groups, *Chem. Anal. (Warsaw)*, **17**, 1059 (1972).
25. Bedetti R., Carunchio V., Marino A., An application of the ligand exchange

- method to the separation of some aliphatic carboxylic acids, *J. Chromatogr.*, **95**, 127 (1974).
26. *Hemmasi B., Bayer E.*, Ligand-exchange chromatography of amino acids on copper, cobalt, and zinc Chelex 100, *J. Chromatogr.*, **109**, 43 (1975).
 27. *Siegel A., Degens E. T.*, Concentration of dissolved amino acids from saline waters by ligand-exchange chromatography, *Science*, **151**, 1098 (1966).
 28. *Buist N. R. M., O'Brien D.*, The separation of peptides from amino acids in urine by ligand exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **29**, 398 (1967).
 29. *Bellinger J. F., Buist N. R. M.*, The separation of peptides from amino acids by ligand-exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **87**, 513 (1973).
 30. *Petronio B. M., Lagana A., Russo M. V.*, Some applications of ligand-exchange. I. Recovery of phenolic compounds from water, *Talanta*, **28**, 215 (1981).
 31. *de Hernandez C. M., Walton H. F.*, Ligand exchange chromatography of amphetamine drugs, *Anal. Chem.*, **44**, 890 (1972).
 32. *Murgia E., Walton H. F.*, Ligand-exchange chromatography of alkaloids, *J. Chromatogr.*, **104**, 417 (1975).
 33. *Warren D. C., Fitzgerald J. M.*, Parameters influencing the electron spin resonance signal intensity of metal ion complex-exchanged resin, *Anal. Chem.*, **49**, 1840 (1977).
 34. *Muzzarelli R. A. A., Martelli A. F., Tubertini O.*, Ligand-exchange chromatography on thin layers and columns of natural and substituted celluloses, *Analyst*, **94**, 616 (1969).
 35. *Rothenbühler E., Waibel R., Solms J.*, An improved method for the separation of peptides and amino acids on copper-Sephadex, *Anal. Biochem.*, **97**, 367 (1979).
 36. *Goździcka-Josefiak A., Augustyniak J.*, Preparation of chelating exchangers with a polysaccharide network and low cross-linkage, *J. Chromatogr.*, **131**, 91 (1977).
 37. *Tsuji A., Sekiguchi K.*, Adsorption of nicotine acid hydrazide on cation exchanger of various metal forms, *Nippon Kagaku Zasshi*, **81**, 847 (1960).
 38. *Sluyterman L. A. E., Wijdenes J.*, An agarose mercurial column for the separation of mercaptopapain and nonmercaptapapain, *Biochim. Biophys. Acta*, **200**, 593 (1970).
 39. *Chow F. K., Grushka E.*, Separation of aromatic amine isomers by high pressure liquid chromatography with a copper(II)-bonded phase, *Anal. Chem.*, **49**, 1756 (1977).
 40. *Gimpel M., Unger K.*, Monomeric vs. polymeric bonded iminodiacetate silica supports in high-performance ligand-exchange chromatography, *Chromatographia*, **17**, 200 (1983).
 41. *Shahwan G. J., Jezorek J. R.*, Liquid chromatography of phenols on an 8-quinolinol silica gel-iron(III) stationary phase, *J. Chromatogr.*, **256**, 39 (1983).
 42. *Kicinski H. G., Kettrup A.*, Determination of enantiometric catecholamines by ligand-exchange chromatography using chemically modified tartaric acid silica gel, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **320**, 51 (1985).
 43. *Caude M., Foucault A.*, Ligand exchange chromatography of amino acids on copper(II) modified silica gel with ultraviolet spectrophotometric detection at 210 nanometers, *Anal. Chem.*, **51**, 459 (1979).
 44. *Foucault A., Rosset R.*, Ligand-exchange chromatography on copper(II)-modified silica gel: improvements and use for screening of protein hydrolyzate and quantitation of dipeptides and amino acid fractions, *J. Chromatogr.*, **317**, 41 (1984).
 45. *Guyon F., Chardonnet L., Caude M., Rosset R.*, Study of silica gel and copper silicate gel solubilities in high performance liquid chromatography, *Chromatographia*, **20**, 30 (1985).
 46. *Masters R. G., Leyden D. E.*, Ligand-exchange chromatography of amino sugars and amino acids on copper-loaded silylated controlled-pore glass, *Anal. Chim. Acta*, **98**, 9 (1978).

47. *Chow F. K., Grushka E.*, High performance liquid chromatography with metal-solute complexes, *Anal. Chem.*, **50**, 1346 (1978).
48. *Chow F. K., Grushka E.*, High performance liquid chromatography of nucleotides and nucleosides using outersphere and intersphere metal-solute complexes, *J. Chromatogr.*, **185**, 361 (1979).
49. *Gubitz G., Mihellyes S.*, Direct separation of 2-hydroxy acid enantiomers by high-performance liquid chromatography on chemically bonded chiral phases, *Chromatographia*, **19**, 257 (1984).
50. *Shimomura K., Hsu T.-J., Walton H. F.*, Ligand-exchange chromatography of aziridines and ethanalamines, *Anal. Chem.*, **45**, 501 (1973).
51. *Hill (Sister) A. G., Sedgley R., Walton H. F.*, Separation of amines by ligand exchange. III. A comparison of different cation exchangers, *Anal. Chim. Acta*, **33**, 84 (1965).
52. *Doury-Berthod M., Poitrenaud C.*, Continuous detection of molecules labeled with C-14, *Analisis*, **5**, 270 (1977).
53. *Davankov V. A., Rogozhin S. V., Semechkin A. V., Baranov V. A., Sannikova G. S.*, Ligand-exchange chromatography of racemates; influence of temperature and concentration of eluent on ligand-exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **93**, 363 (1974).
54. *Maeda M., Kinoshita T., Tsuji A.*, A novel fluorimetric method for determination of hexosamines using pyridoxal and zinc(II), *Anal. Biochem.*, **38**, 121 (1970).
55. *Roth M.*, Fluorescence reaction for amino acids, *Anal. Chem.*, **43**, 880 (1971).
56. *Benson J. R., Hare P. W.*, *o*-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 619 (1975).
57. *Hare P. E., Gil-Av E.*, Separation of D and L amino acids by liquid chromatography: use of chiral eluants, *Science*, **204**, 1226 (1979).
58. *Foucault A., Caude M., Oliveros L.*, Ligand-exchange chromatography of enantiomeric amino acids on copper-loaded chiral bonded silica gel and of amino acids on copper(II)-modified silica gel, *J. Chromatogr.*, **185**, 345 (1979).
59. *Navratil J. D., Murgia E., Walton H. F.*, Ligand-exchange chromatography of amino sugars, *Anal. Chem.*, **47**, 122 (1975).
60. *Spies J. R.*, An ultraviolet spectrophotometric micromethod for studying protein hydrolysis, *J. Biol. Chem.*, **195**, 65 (1952).
61. *Grushka E., Levin S., Gilon C.*, Separation of amino acids on reversed-phase columns as their copper(II) complexes, *J. Chromatogr.*, **235**, 401 (1982).
62. *Cockerell L., Walton H. F.*, Metal amine complexes in ion exchange. II. 2-Aminoethanol and ethylenediamine complexes, *J. Phys. Chem.*, **66**, 75 (1962).
63. *Shimomura K., Dickson L., Walton H. F.*, Separation of amines by ligand exchange. IV. Ligand exchange with chelating resins and cellulosic exchangers, *Anal. Chim. Acta*, **37**, 102 (1967).
64. *Stokes R. H., Walton H. F.*, Metal-amine complexes in ion exchange, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3327 (1954).
65. *Helfferich F. G.*, Ligand exchange. I. Equilibria, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3237 (1962).
66. *Loewenschuss H., Schmuckler G.*, Chelating properties of the ion exchanger Dowex R-A-1, *Talanta*, **11**, 1399 (1964).
67. *Suryaraman M. G., Walton H. F.*, Metal-amine complexes in ion exchange. III. Diamine complexes in ion exchange. III. Diamine complexes of silver(I) and nickel(II), *J. Phys. Chem.*, **66**, 78 (1962).
68. *Скорород О. Р., Варрава А. Г.* Сорбция лигандов тиомочевины сульфокатионитами с ионами металлов. *ЖФХ*, **48**, 429, (1974).
69. *Скорород О. Р., Калинина А. А.* Лигандообменная хроматография изомеров органических оснований. *ЖФХ*, **48**, 2830, (1974).

70. Скорород О. Р., Калинина А. А. Устойчивость комплексов с противоионами в сульфокатионитах. ЖФХ, 49, 317 (1975).
71. Maes A., Marynen P., Cremers A., Stability of metal uncharged ligand complexes in ion exchangers. I. Quantitative characterization and thermodynamic basis, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1, 73, 1297 (1977).
72. Maes A., Peigneur P., Cremers A., Stability of metal uncharged ligand complexes in ion exchangers. II. The copper+ethylenediamine complex in nont-morillonite and sulphonic acid resin, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, 74, 182 (1978).
73. Maes A., Cremers A., Stability of metal uncharged ligand complexes in ion exchangers. III. Complex ion stability and stepwise stability constants, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1, 74, 2470 (1978).
74. Maes A., Cremers A., Stability of metal uncharged ligand complexes in ion exchangers. IV. Hydration effects and stability changes of copper-ethylenediamine complexes in montmorillonite, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1, 75, 513 (1979).
75. Gabor-Klatsmanyi P., Inczedy J., 3rd Proc. Anal. Chem. Conf., 1970, 15; C. A., 74, 57627s (1971).
76. Inczedy J., Gabor-Klatsmanyi P., Erdey L., The use of complex forming agents in ion exchange chromatography. VI, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 69, 137 (1971); Anal. Abstr., 19, 4959 (1972).
77. Weinert C. H. S. W., Strelow F. W. E., Bohmer R. G., Cation exchange in thiourea-HCl solutions, Talanta, 30, 413 (1983).
78. Ordemann D. M., Walton H. F., Liquid chromatography of aromatic hydrocarbons on ion-exchange resins, Anal. Chem., 48, 1728 (1976).
79. Helfferich F., Ion Exchange, McGraw-Hill, New York, 1962, chap. 6.
80. Walton H. F., Counter-ion effects in partition chromatography, J. Chromatogr., 332, 203 (1985).
81. Dieter D. S., Walton H. F., Counter-ion effects in ion-exchange partition chromatography, Anal. Chem., 55, 2109 (1983).
82. Rückert H., Samuelson O., Distribution of glucose between ion-exchange resins and alcohol-water mixtures, Acta Chem. Scand., 11, 315 (1957).

РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОВ

Дж. Навратил

Разделение аминов на колонках с катионообменными смолами, заряженными ионами меди(II), представляет собой пример реализации ЛОХ. Ионы меди присутствуют в форме комплексов с аммиаком, а в качестве элюента используют водный раствор аммиака. Ионы меди сорбируются в колонке, тогда как молекулы аммиака и амина перемещаются вниз по насадке, обмениваясь местами друг с другом в координационной сфере ионов меди. Чем стабильнее комплекс меди с амином, тем медленнее амин перемещается по колонке.

Для разделения аминов применяют также ионы других металлов, в частности серебра(I), кобальта(II), кадмия(II), никеля(II) и цинка [1—6]. Серебро(I), применяемое в основном для разделения олефинов и ненасыщенных соединений (см. гл. 7), использовали и для разделения аминов [7, 8]. На колонках с обработанной сурьмой целлюлозой можно хроматографировать алифатические и ароматические амины [9].

Первым применением ЛОХ в этой области стало выделение диамина, 1,3-диамино-2-гидроксипропана, из разбавленного водного раствора, содержащего аммиак [10—12]. Раствор пропускали через колонку с заряженным медью катионообменником для концентрирования аминов, а затем проводили элюирование концентрированным раствором аммиака.

Впоследствии Уолтон с сотрудниками, а также другие исследовательские группы опубликовали ряд статей, посвященных практическим приложениям ЛОХ для разделения смесей алифатических и ароматических аминов, диаминов, гидразинов, азиридинов, алканоламинов, аминокислот, нуклеиновых оснований и т. п. [1—6]. При этом был разрешен ряд аналитических проблем, в том числе анализ азиридинов, алкалоидов и аминокислот.

3.1. Алифатические амины

ЛОХ простых алифатических аминов не представляет большого практического интереса, поскольку эти соединения можно эффективно анализировать с помощью газовой хроматографии.

Порядок элюирования в ЛОХ хорошо иллюстрирует роль стерических затруднений у атома азота.

Уолтон и сотр. [13, 14] исследовали порядок элюирования различных алифатических аминов на катионообменниках, заряженных ионами меди и никеля. Полученные ими результаты (табл. 3.1) показали, что путем подбора соответствующего сочетания катионообменника и иона металла можно получить практически любую желаемую последовательность элюирования. Порядок элюирования согласуется с уменьшением поляр-

Таблица 3.1. Порядок элюирования аминов при различных сочетаниях ион металла — обменник [13]

Вещество	Порядок элюирования					
	сульфированный полистирол	хелатообразующий полистирол	поликриловая кислота (карбоксильный)		фосфат целлюлозы	фосфат циркония
			Ni	Cu		
Cu	N, Cu			Cu	Ni	
Диэтаноламин	1	1	1	1	1	4
Этаноламин	2	2	4	2	2	3
Диметиламин	3	3	3	3	4	2
n-Бутиламин	4	4	2	2	3	1

ности и гидрофильности аминов, а также с увеличением гидрофобности катионообменника на основе полистирола. При использовании фосфата циркония отмечена обратная зависимость.

Данные табл. 3.2 показывают, что ионы меди(II) обеспечивают лучшее разделение аминов, чем никель или цинк. Основность аминов не соотносится с их сорбцией: первичные амины удерживаются прочнее вторичных, а вторичные амины прочнее третичных. Заместители у атома азота аминогруппы ослабляют связывание. Для изомеров первичных аминов ослабление удерживания пропорционально разветвленности цепи или компактности молекулы.

Барбер и сотр. [15] в 1959 г. также наблюдали более сильное удерживание первичных алифатических аминов с прямой цепью, чем с разветвленной. В этом случае при газохроматографическом разделении в качестве насадки использовали целлит с нанесенной на него жидкой пленкой стеаратов металлов, а в качестве газа-носителя — смеси аммиака и водорода; амины удерживались сильнее, чем в экспериментах с апиезоном (табл. 3.3).

3.2. Ароматические амины

Ароматические амины разделяли с помощью нескольких лигандообменных систем. В системе никель — хелатообразующая смола дауэкс А-1 2 М раствором аммиака [16] последовательно элюировали анилин, пиридин и бензиламин. Инцеди [17] выявил такой же порядок элюирования в системе никель — катионообменник на основе сульфированного полистирола с применением в качестве элюента водно-спиртового раствора хлорида никеля. Бензиламин и фенетиламин сильно удерживаются полистирольной матрицей как при лигандообменном, так и при катионообменном вариантах разделения. Молекулы этих соеди-

Таблица 3.2. Коэффициенты распределения на колонке алифатических аминов в 1,4 М растворе аммиака [35]

Амин	pK_a	Коэффициент распределения в смоле			
		дауэкс-50		хелекс	
		Ni	Ni	Cu	Zn
Метиламин	3,38	—	3,8	5,9	8,9
Диметиламин	3,23	—	2,5	3,0	9,5
Триметиламин	4,20	—	1,1	1,3	—
Этиламин	3,37	—	3,8	7,1	9,8
Диэтиламин	3,07	—	3,4	4,1	6,8
Триэтиламин	3,13	—	2,9	3,0	5,7
n-Пропиламин	3,47	12,5	3,8	7,7	9,6
изо-Пропиламин	3,37	8,2	2,7	4,5	7,5
n-Бутиламин	3,40	21,6	6,6	13,4	18,9
изо-Бутиламин	3,51	13,4	4,1	9,1	12,9
втор-Бутиламин	3,44	11,6	3,4	5,9	10,2
трет-Бутиламин	3,55	9,1	2,9	3,4	7,1

■ Основные константы ионизации заимствованы из работы: Martell A. E., Sillen L. G., «Stability Constants».

нений сходны с мономерным звеном полимерной матрицы, что может быть причиной такого сильного удерживания. Напротив, неорганический катионообменник с цирконием слабо удерживает бензиламин [14].

Музарелли [9] наблюдал на диэтиламиноэтилцеллюлозе следующий порядок элюирования: анилин, триметиламин и диметиламин. Анилин и метиламины могут вытесняться диэти-

ловым эфиром и этиловым спиртом соответственно. Присутствующий при этом этилендиамин остается в колонке. Музарелли провел аналогичные разделения на фосфате целлюлозы, заряженной кобальтом (III) и сурьмой (III), используя в качестве элюента водный аммиак, эфир или спирт. Во всех случаях анилин выходил из колонки первым. Было установлено также,

Таблица 3.3. Относительные времена удерживания аминов на колонках с неподвижной фазой апиезон L и стеарат марганца при 156 °C [15]

Амины	Относительные времена удерживания	
	апиезон L	стеарат марганца
Первичные		
изо-Pr	66	2304
н-Pr	173	3655
н-Vi	215	6032
трет-Vi	79	1550
Вторичные		
Et ₂	99	1610
н-PrO ₂	276	2134
н-Vi ₂	758	4871
Третичные Et ₃		
Et ₃	187	328
н-Pr ₃	619	649
н-Vi ₃	2382	3342

что амины взаимодействуют с собственно целлюлозой, поскольку целлюлоза, не заряженная металлом, сорбирует анилин, хотя и несколько слабее, чем в присутствии ионов металла.

При ЛОХ на полистирольных смолах получают широкие, асимметричные пики ароматических соединений, возможно, вследствие наложения π -взаимодействий на взаимодействие металл—лиганд. Фернандес и Уолтон [18] при разделении амфетаминных лекарственных препаратов лигандообменной хроматографией обнаружили, что на акриловой смоле био-рекс 70 (Bio-Rex 70) с алифатической матрицей получались более острые пики, чем на полистирольной матрице, которая сильнее связывает металл (рис. 3.1). При использовании меди, никеля

и кадмия отмечен следующий порядок элюирования:

метамфетамин $C_6H_5CH_2CH(CH_3)NHCH_3$ (элюируется первым),
 эфедрин $C_6H_5CH(OH)CH(CH_3)NHCH_3$,
 амфетамин $C_6H_5CH_2CH(CH_3)NH_2$,
 норэфедрин $C_6H_5CH(OH)CH(CH_3)NH_2$,
 фенетиламин $C_6H_5CH_2CH_2NH_2$ (элюируется последним).

Этот пример наглядно иллюстрирует влияние стерических затруднений и совместной координации гидроксильных групп.

По сегодняшним стандартам описанные выше колонки имеют низкую хроматографическую эффективность, но зато они обладают высокой селективностью разделения. Высокая селективность является характерной особенностью ЛОХ. Фунасака

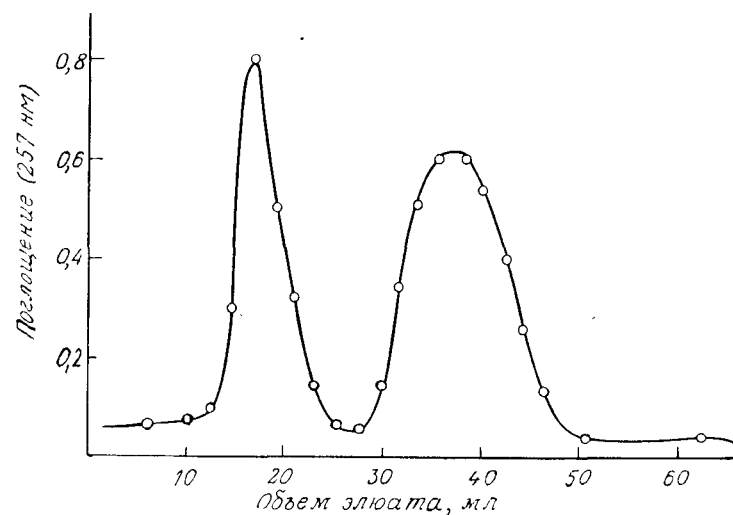


Рис. 3.1. Элюирование метиламфетамина и амфетамина. Метиламфетамин выходит из колонки первым. Условия разделения: колонка размером 60 см × 0,8 см²; насадка — карбоксильная смола био-рекс 70 с размером частиц 100—200 меш, заряженная медью; элюент — 0,1 М раствор аммиака в 50%-ном водном метаноле [18].

[19—21] продемонстрировал это для изомеров аминокислоты и ароматических диаминов.

В результате недавних исследований, проведенных с использованием заряженных ионами металлов обменников на основе пористого силикагеля, были получены более высокая эффективность и лучшее разрешение и сокращено время разделения. Вогт [22] используя силикагель, гидротермально обработанный

кадмием, и 2%-ный CH_3CN в гексане в качестве элюента, последовательно элюировал 2-, 3- и 4-пиколин, α -нафтиламин, а затем его β -изомер, и разделил метил и этиланилины. Чоу и Грушка [23, 24] на заряженном медью модифицированном силикагеле разделили в аналогичном элюенте аминафталины, хлоранилины, нитроанилины, толуидины, анизидины и не-

Таблица 3.4. Величины R_f при разделении в тонких слоях сорбентов, импрегнированных солями металлов [26]

Вещество	Бензол — метанол (5 : 1)		Бензол — метилэтилкетон (3 : 1)		Бензол — метанол (20 : 1)	
	силикагель		силикагель		оксид алюминия	
	без соли	Zn	без соли	Cd	без соли	Zn
Анилин	0,53	0,28	0,47	0,21	0,83	0,40
o-Толуидин	0,60	0,45	0,51	0,29	0,86	0,70
m-Толуидин	0,55	0,27	0,47	0,15	0,83	0,46
n-Толуидин	0,50	0,17	0,43	0,10	0,82	0,22
2,4-Ксилидин	0,58	0,31	0,48	0,25	0,86	0,48
N-Метиланилин	0,68	0,56	0,62	0,57	—	—
N,N'-Диметиланилин	0,74	0,67	0,69	0,61	—	—
N,N'-Диэтиланилин	0,78	0,28	0,73	0,35	—	—
α -Нафтиламин	0,60	0,59	0,52	0,44	0,85	0,79
β -Нафтиламин	0,55	0,44	0,47	0,21	0,85	0,55
N-Метилнафтиламин	0,72	0,82	0,67	0,72	—	—
o-Фенетидин	0,49	0,11	0,31	0,06	0,70	0,12
Метил-n-аминобензоат	0,49	0,50	0,46	0,45	0,70	0,82

которые не содержащие азот лиганды типа флуорена и флуорена. Методом высокоэффективной ЛОХ в системе силикагель — медь (II) был определен N-метилпиридиний-2-альдоксим в биологических жидкостях [25].

Тонкослойную лигандообменную хроматографию успешно использовали для разделения ароматических аминов (табл. 3.4). Разделение проводили на слое оксида кремния или оксида алюминия, импрегнированном солями металлов [8, 26—31]. Изомеры толуидинов, хлор- и нитроанилины, нафтиламины, анизидины, ксилидины и аминофенолы были разделены с очень хорошим разрешением. Обычно в качестве подвижной фазы использовали гексан или бензол с незначительным добавлени-

ем полярного растворителя, например метанола или уксусной кислоты. И в этом случае стерические затруднения вокруг атома азота аминогруппы (*орто*-замещение, $-\text{NHCH}_3$) ослабляют притяжение к ионам металла и ускоряют миграцию вещества.

Ароматические амины разделяли также с помощью газовой хроматографии. Жидкие пленки стеаратов металлов наносили на целит в качестве неподвижной фазы и разделяли ароматические амины [15] в потоке смеси водорода и аммиака. В этом

Таблица 3.5. Относительные времена удерживания аминов при 156 °С на колонках с неподвижными фазами апиезон L и стеарат марганца [15]

Вещество	Апиезон L	Стеарат марганца
Анилин	855	2094
N,N'-Диметиланилин	1835	1989
Пиридин	296	3016
α -Пиколин	416	1230
β -Пиколин	535	7460
γ -Пиколин	540	9670
2,6-Лутидин	571	661
Пиррол	202	301

случае удерживание оказалось лучшим, чем при использовании апиезона (табл. 3.5). Хромосорб с нанесенным на него стеаратом марганца (II) более подходит для ГХ-разделения анилиновых оснований, чем гели на основе фосфата циркония с марганцем (II) [32].

3.3. Алифатические диамины и полиамины

Напомним, что 1,2-диамины прочно удерживаются лигандообменниками, заряженными медью, и с трудом элюируются аммиаком. Другие диамины, удерживаемые не так сильно, можно разделить с помощью ЛОХ. Как уже было сказано, Гельферих [10—12] первым применил ЛОХ для выделения и концентрирования 1,3-диамин-2-пропанола из разбавленного раствора, содержащего аммиак, на заряженном никелем карбоксильном катионообменнике амберлит IRC-50, кондиционированном раствором аммиака. Амины вытесняли аммиак и

сорбировались насадкой, затем диамины элюировали с насадки концентрированным раствором аммиака.

Этилендиамин также очень сильно удерживается заряженными никелем ионообменными смолами и может быть извлечен из разбавленных растворов с помощью коротких колонок, заполненных хелатообразующей или сульфированной насадкой [16].

Таблица 3.6. Порядок элюирования диаминов и полиаминов [36]

Амин	Сульфированный полистирол		Полиакриловый (карбоксильный)		Целлюлоза (карбоксильный)		
	Cu	Zn	Cu	Zn	Cu	Zn	Ni
Диамины							
C ₂	5	6	7	—	—	—	—
C ₃	4	1	6	2	6	1	5
C ₄	—	2	3	4	1	2	1
C ₅	—	5	4	5	2	5	3
C ₆	3	7	5	6	4	6	4
Полиамины:							
спермидин	1	3	1	1	3	3	2
спермин	2	4	2	3	5	4	3
Концентрация аммиака, М	7		4		1,1	1,7	1,1

Уолтон и Латерель [7, 33, 34] нашли, что другие диамины удерживаются слабее и их можно элюировать в следующей последовательности: 1,6-гександиамин, 1,4-бутандиамин, 1,3-пропандиамин. Согласно данным Шимомуры [35], 1,4-бутандиамин выходит перед 1,6-гександиамином на сульфированной смоле, заряженной никелем, при элюировании 4 М раствором аммиака. Аналогичная картина наблюдалась и в случае хелатообразующей насадки, заряженной медью. Было также найдено, что пропандиамин образует с медью две координационные связи, в то время как гександиамин только одну.

Ряд диаминов и полиаминов входят в состав растений и ткани животных и представляют интерес для медицины. К их числу можно отнести путресцин (1,4-бутандиамин), кадаверин (1,5-пентандиамин), спермин ($(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH} \cdot (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2)$), спермидин ($(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2)$). Навратил и Уолтон [36] предприняли широкое исследование этих со-

единений, а также других диаминов и аминокислот на трех лигандообменниках с тремя ионами металлов (меди, цинка и никеля); ими были найдены различные порядки элюирования (см. табл. 3.6).

На удерживание различных веществ влияют концентрация аммиака и природа иона металла; используя эти зависимости, можно оптимизировать разделение. Например, при использовании обменника, заряженного медью, удерживаемый объем 1,3-пропандиамина обратно пропорционален квадрату концентрации аммиака, т. е. это соединение является бидентатным лигандом: две молекулы аммиака должны вытеснить одну молекулу диамина. Для 1,5-пентандиамина удерживание изменяется обратно пропорционально первой степени концентрации аммиака, значит, диамин представляет собой монодентатный лиганд. Спермин и спермидин соответствуют бидентатным лигандам.

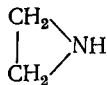
На заряженной медью смоле с карбоксильными группами био-рекс 70 были получены наилучшие коэффициенты разделения, но эта смола слишком мягка и не обеспечивает высокой эффективности. Заряженный цинком сульфированный полистирол (аминекс А-7) с размером частиц 7—11 мкм и степенью сшивки 8% обеспечивает наилучшее разрешение в 5,5 М растворе аммиака, содержащем 0,002 М цинка при температуре 55°C. Изменение концентрации цинка приводит к смещению положения пиков, в связи с чем для наилучшего разделения четырех указанных выше компонентов необходим тщательный контроль. Весь анализ занимает 90 мин.

Для детектирования применяли рефрактометрический детектор, что было удобно, но не обеспечивало достаточно высокой чувствительности. Предел обнаружения спермина или спермидина составлял 10—15 мкг. Для того чтобы ЛОХ могла конкурировать с другими хроматографическими методами, например с традиционным аминокислотным разделением на катионообменнике с помощью нитратных элюентов, необходимы более совершенные методы детектирования [37]. Когда такие методы детектирования появятся, ЛОХ будет выгодно отличаться своей простотой. Все аминокислоты, даже наиболее основные, элюируются вслед за мертвым объемом, существенно опережая диамины и полиамины, и для их элюирования требуется всего один элюент.

Для разделения нефтепродуктов на различные основные и кислотные компоненты использовали макропористую (пористую сшитую полистиролсульфоокислоту) смолу (амберлист-15), заряженную медью, никелем и железом (III) [38]. Алифатические диамины с длинной цепью сорбировались наряду с нафтеновыми кислотами, салициловой кислотой, бензотриазолом и другими соединениями и вытеснялись метанолом.

3.4. Азиридины, алканол амины и гидразины

Азиридины, получаемые из этиленimina, являются нестабильными и легко гидролизующимися в нейтральных или кис-



лых водных растворах соединениями, устойчивыми в щелочных средах, которые хорошо переносят условия лигандообменной хроматографии. Разделение проводили на обменной системе никель — сульфированный полистирол, используя в качестве элюента 1 М раствор аммиака [39]. Хроматограмма разделения N-(2-гидроксиэтил)азиридина, пропиленimina и этиленimina

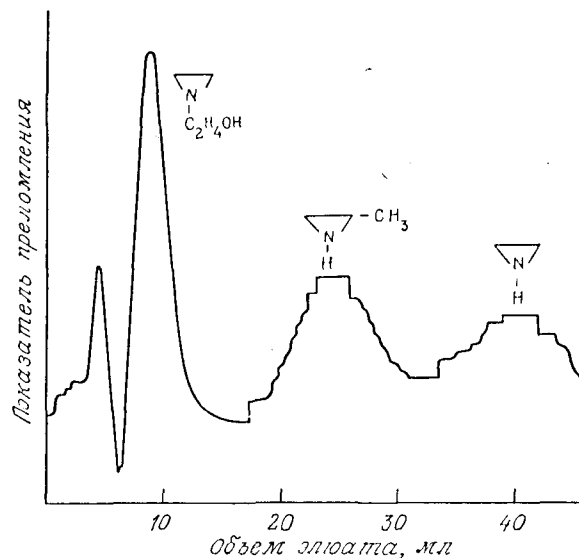


Рис. 3.2. Элюирование азиридинов. Условия разделения: насадка — смола дауэкс-50 W×8 с размером частиц 200—400 меш, заряженная никелем; общий объем колонки 30 мл; элюент — 0,1 М аммиак, скорость 11 мл/ч; загрузка 5 мг N-(2-гидроксиэтил)азиридина, 10 мг пропиленimina и 10 мг этиленimina [35, 39].

представлена на рис. 3.2, а соответствующие данные по элюированию приведены в табл. 3.7. Как и следовало ожидать, исходное вещество, этиленимин, выходит из колонки последним. Замещение у атома азота или одного из атомов углерода снижает удерживание.

Коэффициенты распределения для моно- и диэтанолamina, являющихся продуктами гидролиза этиленimina и N-(2-гидро-

ксиэтил)азиридина соответственно, представлены в табл. 3.7. Интересно отметить, что заряженная медью хелатообразующая смола позволяет разделить азиридины и алканол амины, в то время как на заряженной никелем смоле такое разделение невозможно. На рис. 3.3 изображена хроматограмма отделения азиридинов от их продуктов гидролиза.

Алканол амины полярны, гидрофильны, нелетучи и с трудом анализируются газохроматографически. Их легко разделить с

Таблица 3.7. Коэффициенты распределения азиридинов и этанол аминов [35, 39]

Амин	Сульфированная смола		Хелатообразующая смола			
	Ni		Ni		Cu	
	конц. NH ₃	k	конц. NH ₃	k	конц. NH ₃	k
Этиленимин	1,0	11	0,25	14	0,1	14
Пропиленимин	1,0	6	0,25	4,5	0,1	12
N-Этилазиридин	1,0	0,67	0,05	2,3	0,1	1,8
N-(2-Гидроксиэтил)азиридин	1,0	1,4	0,05	5,5	0,1	1,8
Этаноламин	1,0	10	0,25	10,7	0,1	17
Диэтаноламин	—	—	0,05	7,2	—	—

помощью ЛОХ [35]. Увеличение основности соответствует порядку элюирования: первым выходит триэтаноламин, а затем диэтаноламин и, наконец, моноэтаноламин (рис. 3.4). После выхода пика диэтанолamina целесообразно увеличить концентрацию аммиака, чтобы ускорить выход прочно удерживаемого пика моноэтанолamina.

Три этанолamina были разделены с помощью традиционного ионного обмена с использованием 1,5 М соляной кислоты [10] и боратного буферного раствора с рН 9,2 [41]. И в этом случае порядок элюирования соответствовал возрастанию основности. Тем не менее именно ЛОХ обеспечивает наилучшее разделение моно- и диэтанол аминов. Моноэтаноламин был отделен от триэтанолamina на колонке с фосфатом циркония элюированием соляной кислотой. Моноэтаноламин выходил из колонки первым, но разделение не было полным [42].

Гидразин и замещенные гидразины разделяли аналогично алканолaminaм, но поскольку медь катализирует разложение этих соединений, ее нельзя использовать при разделении. На

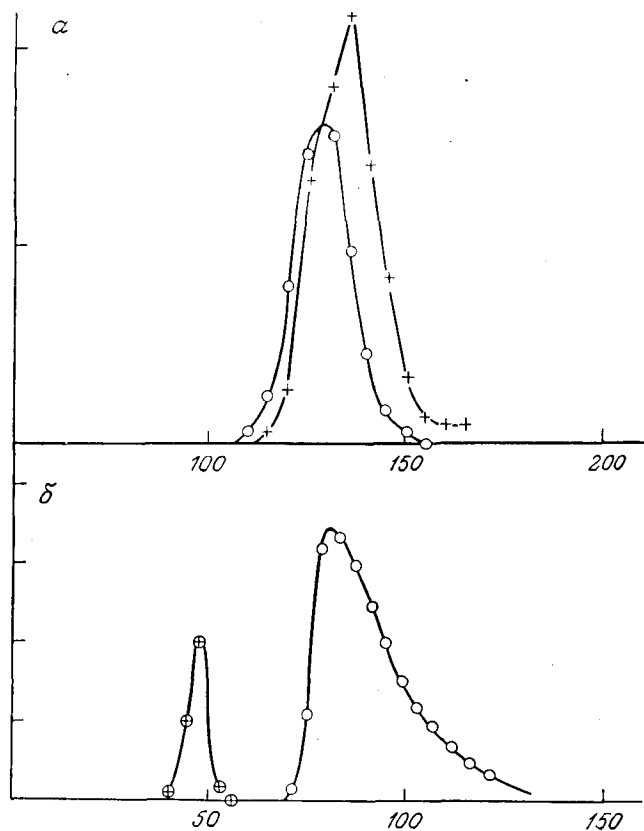


Рис. 3.3. Элюирование этиленimina (обозначен крестиками) и этаноламина (обозначен кружками). Условия разделения: а) насадка — смола дауэкс-50 W×8 заряженная никелем с размером частиц 200—400 меш; б) насадка — смола хелекс-100 с размером частиц 200—400 меш, заряженная медью. В обоих случаях: объем колонки 33 мл, элюент — 1,0 М водный аммиак. В состав этаноламина введена радиоактивная метка ^{14}C ; имин обнаруживают по появлению окраски в реакции с 1,2-нафтохинон-4-4-сульфокислотой [35, 39].

насадках с никелем можно сорбировать гидразин, оставить колонку на ночь и элюировать на следующий день с потерей вследствие разложения не более 10%. Асимметрические соединения, диметилгидразин и монометилгидразин, можно разделить на заряженном никелем сульфированном полистироле, а затем последовательно элюировать 0,4 М раствором аммиака; последним с помощью 5 М раствора аммиака из колонки вымывают гидразин (рис. 3.5) [13]. Приведенный пример вновь иллюстрирует тот факт, что метильные заместители у азота

затрудняют сорбцию на металле, а также дестабилизируют комплексы металлов в водных растворах [13]. В данном случае гидразин выступает в роли монодентатного лиганда.

В 1960 г. Тсуи [43, 44] исследовал сорбцию изониазида, или изоникотинового гидразида, с использованием сульфированного

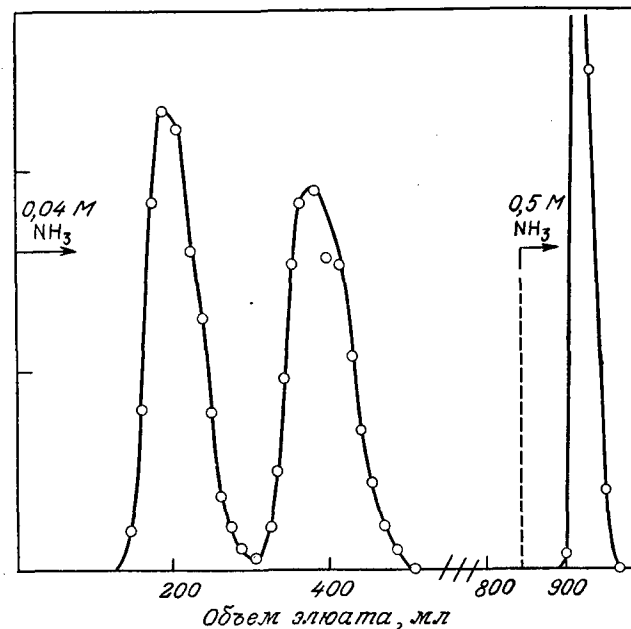


Рис. 3.4. Элюирование этаноламинов. Порядок элюирования: триэтаноламин, диэтаноламин, моноэтаноламин; ось ординат соответствует скорости счета меченных ^{14}C соединений. Условия разделения: насадка — смола дауэкс-50 W×8 с размером частиц 200—400 меш, заряженная никелем; размер колонки 30 см×0,43 см²; загрузка: 1,5 мг три-, 2,5 мг ди- и 5 мг моноэтаноламина [35].

полистирола, заряженного ионами различных металлов. Прочность связывания изониазида уменьшалась в ряду $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Hg} > \text{H} > \text{Co} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Fe(II)} > \text{Pb} > \text{Mn} > \text{Al}$; на Na, Ca, Mg, Ba сорбция отсутствовала.

3.5. Аминосакхара

Чувствительность ЛОХ к геометрической форме молекул лучше всего иллюстрирует разделение аминсахаров. Изомеры гексозамина, глюкозамин, галактозамин и маннозамин, элюировали в указанном порядке с насадки био-рекс 70, заряженной медью, 1 М водным раствором аммиака при комнатной

температуре со следующими удерживаемыми объемами: 1 : 1,4 : 2,5. На сульфированном полистироле, насыщенном медью, были получены еще более высокие коэффициенты разделения (1 : 1,7 : 8,0), но при этом удерживание маннозамина было слишком сильным, чтобы можно было проводить обычное изократическое элюирование [45, 46].

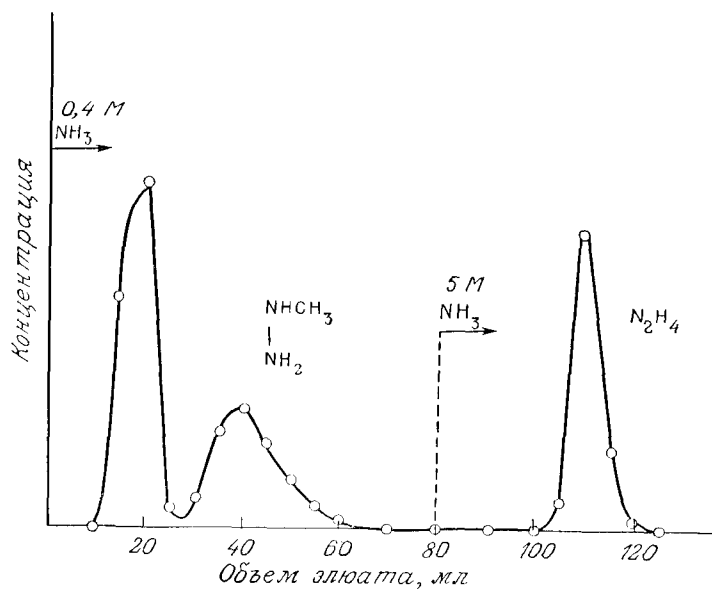


Рис. 3.5. Элюирование гидразинов. Условия разделения: насадка — смола дауэкс-50 W×12 с размером частиц 200—400 меш, заряженная никелем; общий объем колонки 30 мл; концентрация выражена в произвольных единицах (определена титрованием с броматом) [13].

Аминосакхара, находящиеся в подвижной фазе в виде комплексов с медью, детектируют по поглощению УФ-излучения. На рис. 3.6 представлена хроматограмма, где ширина пика маннозамина соответствует высоте, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), равной 0,3 мм, что можно квалифицировать как достаточно высокую эффективность. Ширины пиков пропорциональны введенным количествам вещества в пределах 2—3%.

Аминокислоты также перемещаются по колонке в виде поглощающих УФ-излучение комплексов с медью и фиксируются на хроматограмме. Для большинства из них удерживаемые объемы близки к мертвому объему, что предотвращает наложение пиков аминокислот на пики аminosахаров. Только основ-

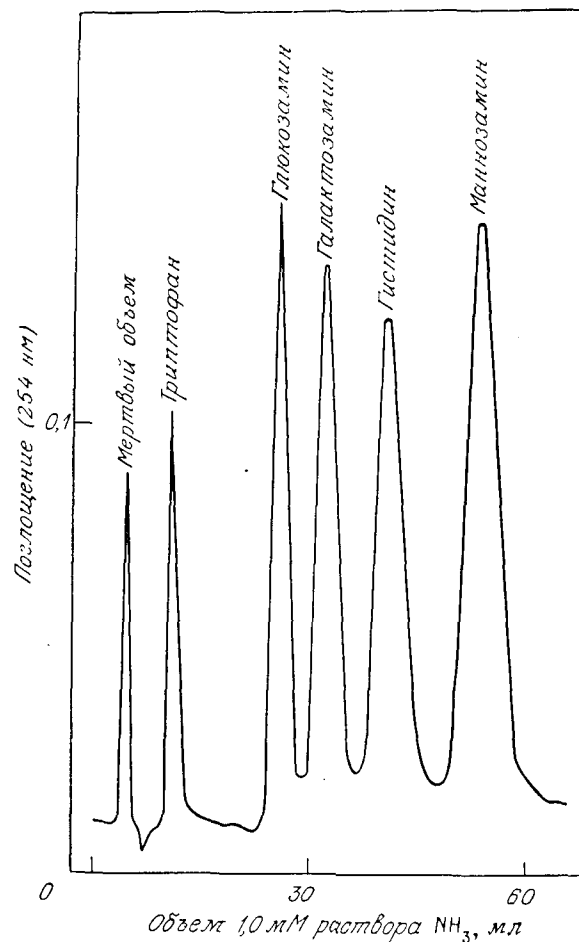


Рис. 3.6. Хроматограмма аminosахаров и аминокислот, разделенных на карбоксильной смоле, заряженной медью(II). [Navratil J. D., Murgia E., Walton H. F. Anal. Chem., 47, 122 (1975).]

ные аминокислоты по времени удерживания близки к аminosахарам. Наложение их пиков можно предотвратить, используя тот факт, что удерживаемые объемы аминокислот приблизительно обратно пропорциональны квадрату концентрации аммиака, в то время как удерживаемые объемы аminosахаров обратно пропорциональны первой степени концентрации аммиака. Таким образом, чтобы оптимизировать разделение, нужно подобрать элюент соответствующего состава.

Мастерс и Лейден [47] разделяли аминокислоты и аминоксахара с помощью ЛОХ на силилированных стеклах, заряженных медью. Их данные о порядке элюирования подтверждают результаты Навратила и сотрудников: глюкозамин выходит первым, маннозамин — последним, но практически все аминокислоты выходят не перед аминоксахарами, а после них. В качестве элюента использовали 0,1 М раствор аммиака (Навратил [45] — 1 М раствор аммиака). Дори-Бертон и др. [48, 49] показали, что высокая концентрация аммиака в сочетании с низ-

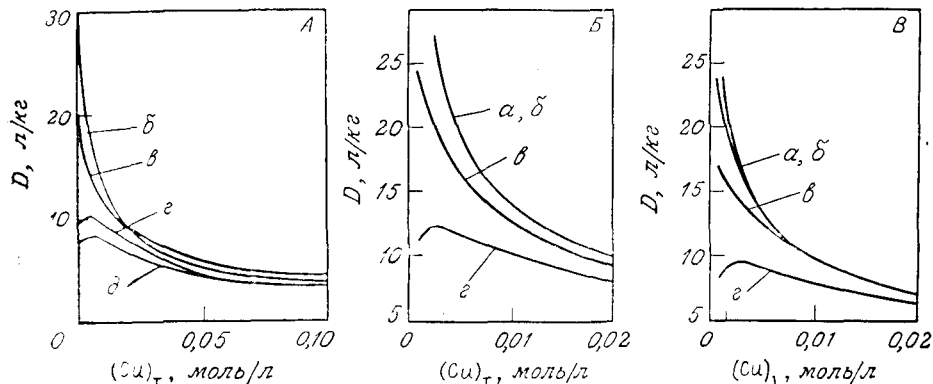


Рис. 3.7. Распределение аминокислот между растворами аммиака и заряженными медью ионообменными смолами: А — глицин на карбоксильной смоле; Б, В — аланин и лейцин на фосфорилированной смоле. Концентрация аммиака: а — 0,2; б — 0,3; в — 0,5; е — 1; д — 1,5. На оси ординат отложены коэффициенты распределения D , выраженные в л/кг. [Doury-Berthod M., Poitrenaud C., Tremillon B., J. Chromatogr., 131, 73 (1972).]

кой концентрацией металла ослабляет удерживание аминокислот (см. рис. 3.7 и статьи [48, 49]).

Аминосакхара и их ацетильные производные разделяли с помощью тонкослойной хроматографии. Силикагель тонкого слоя импрегнировали медью, а в качестве элюента использовали аммиак в 2-пропанол. Глюкозамин перемещался быстрее, чем галактозамин, а ацетильные производные еще быстрее [30]. Глюкозамин, маннозамин, галактозамин и N-ацетилглюкозамин успешно разделяли на силикагельных пластинках, импрегнированных кадмием, цинком, марганцем [50].

3.6. Алкалоиды

Алкалоиды разделяли на карбоксильных смолах, заряженных медью (II), в водно-спиртовом растворе аммиака. Широко применяемая полиакриловая смола био-рекс 70 не эффективна для

разделения алкалоидов, поскольку слишком слабо их удерживает. Путем исследования нескольких сорбентов была установлена зависимость между соотношением аммиак:медь в фазе смолы и способностью этих смол сорбировать алкалоиды, что уже обсуждалось выше. Таким образом можно разделить морфин, кодеин, стрихнин, папаверин и наркотин, но с низкой эффективностью (с величиной ВЭТТ порядка нескольких миллиметров). Это в известной степени можно объяснить тем, что алкалоиды являются вторичными и третичными аминами с большими размерами молекул, а основные атомы азота окружены другими атомами. Это вызывает стерические затруднения при координировании, и, как уже отмечалось нами, связывание лигандов в сорбентах, заряженных металлами, в значительной степени зависит от стерических затруднений.

3.7. Другие азотсодержащие лиганды

РНК и ДНК разделяли на заряженных алюминием лигандообменных сорбентах гелевого типа из сульфированного полистирола [52—55]. Макропористые смолы, вероятно, должны обеспечить лучшее разрешение. Нуклеозиды и основания нуклеиновых кислот сорбировали на заряженной медью хелатообразующей смоле хелекс-100 и затем элюировали аммиаком [56—58]. Нуклеотиды не сорбировались смолой, а основания удерживались ею очень прочно.

Тимин, цитозин, гуанин и аденин сорбировали на насадке хелекс-100, заряженной никелем, а затем элюировали в указанной последовательности 0,5 М раствором аммиака. Если никель заменить медью, то гуанин и аденин в указанной последовательности элюирования менялись местами [13, 35]. Эффективность разделения гуанина и аденина была низка, и преимущество использования ЛОХ по сравнению с традиционной катионообменной хроматографией состоит только в возможности изменения порядка выхода. Тем не менее Голдштейн [56] и Буртис и Голдштейн [57] рекомендуют заряженные медью обменники для быстрого разделения нуклеотидов, нуклеозидов и оснований нуклеиновых кислот: нуклеотиды при этом не сорбируются, слабоосновные нуклеозиды элюируются водой, а более основные нуклеозиды — 1 М раствором аммиака. С помощью 2,5 М раствора аммиака последовательно элюируют урацил, гуанин, аденин, цитозин. Многие пуриновые производные и ксантины, включая кофеин и теобромин, полностью разделялись на насыщенной медью хелатообразующей смоле при элюировании 1 М раствором аммиака. Прочнее всех удерживается кофеин, и поэтому его легко определить в кофе и других напитках [58]; весь анализ занимает 60 мин.

Несколько исследователей сообщили о более быстром и эффективном разделении нуклеозидов и нуклеотидов при использовании комплексообразования во внешней координационной сфере [59—61]. Чоу и Грушка [59] обнаружили, что при элюировании фосфатным буфером с рН 6,4 через силикагель с трис(этилендиаминовыми) комплексами кобальта(III) нуклеозиды не сорбируются носителем, а нуклеотиды сорбируются им очень сильно. Для того чтобы элюировать нуклеотиды за приемлемое время, к подвижной фазе добавляли ионы магния, что приводило к образованию комплексов в растворе и существенно ускоряло элюирование. При разделении аденозинмоно-, аденозинди- и аденозинтрифосфатов трифосфат выходил из колонны последним. При разделении на обычной обращенно-фазовой насадке с привитыми C_8 -группами наблюдается обратный порядок элюирования.

В завершение этого «смешанного» раздела целесообразно упомянуть о разделении 1-нитрозо-2-нафтола и 2-нитрозо-1-нафтола друг от друга, а также от аминифенолов на обменнике из сульфированного полистирола, заряженного железом(III) при использовании в качестве элюента водно-спиртового раствора аммиака. Нитрозогруппа вступала в координационное взаимодействие с атомом металла через атом азота с образованием слабоспиновых комплексов, соответствующих медленным процессам сорбции-десорбции.

Необходимо также отметить разделение азотсодержащих гетероциклических ароматических соединений на зипаксе SCX, заряженном серебром [61, 63] при элюировании 1%-ным раствором CH_3CN в гексане. Несомненно, что механизм разделения основан на координации азота с серебром, аналогично тому как в основе «хроматографии с использованием серебра» лежит π -электронное взаимодействие (см. гл. 7).

Литература

1. Walton H. F., Navratil J. D., Ligand exchange chromatography, Li N. N. (ed.), Recent Developments in Separation Science, Vol. 6, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1982, p. 65.
2. Davankov V. A., Semechkin A. V., Ligand exchange chromatography, J. Chromatogr., **141**, 313 (1977).
3. Navratil J. D., Walton H. F., Ligand exchange chromatography, Am. Lab., **8**, 69 (1976).
4. Walton H. F., Chromatography of non-ionic organic compounds on ion-exchange resins, in Separation and Purification Methods 4, Perry E. S., Van Oss C. J., Grushka E. (eds.), Marcel Dekker, New York, 1975, p. 189.
5. Walton H. F., Liquid chromatography of organic compounds on ion exchange resins, J. Chromatogr., **102**, 57 (1974).
6. Walton H. F., Advances in Ion Exchange and Solvent Extraction, 4, Marcel Dekker, New York, 1973, chap. 2.
7. Walton H. F., Latterell J. J., Metal amine complexes in ion exchange.

- IV. Separation of amines by ligand exchange, Analytical Chemistry 1962, Elsevier, New York, 1963, p. 356.
8. Tabak S., Mauro A. E., Del'Acqua A., Argentation thin-layer chromatography with silver oxide. II. Amines, unsaturated and aromatic carboxylic acids, J. Chromatogr., **52**, 500 (1970).
9. Muzzarelli R. A. A., Martelli A. F., Tubertini O., Ligand exchange chromatography on thin layers and columns of natural and substituted celluloses, Analyst, **94**, 616 (1969).
10. Heljferich F. G., Ligand exchange — a novel separation technique, Nature (London), **189**, 1001 (1961).
11. Heljferich F. G., Ligand exchange. I. Equilibria. II. Separation of ligands having different coordinative valences, J. Am. Chem. Soc., **84**, 3237, 3242 (1962).
12. Heljferich F. G., Ligand exchange. I. Equilibria. II. Separation of ligands having different coordinative variances, J. Am. Chem. Soc., **84**, 3237, 3242 (1962).
13. Shimonura K., Dickson L., Walton H. F., Separation of amines by ligand exchange. IV. Ligand exchange with chelating resins and cellulosic exchangers, Anal. Chim. Acta, **37**, 102 (1967).
14. Hill A. G., Sedgley R., Walton H. F., Separation of amines by ligand exchange. IV. A comparison of different cation exchangers, Anal. Chim. Acta, **33**, 84 (1965).
15. Barber D. W., Phillips C. S. G., Tusa G. F., Verdin A., The chromatography of gases and vapors. VI. Use of the stearates of bivalent manganese, cobalt, nickel, copper, zinc as column liquids in gas chromatography, J. Chem. Soc., **1959**, 18.
16. Bak C. M., Ligand exchange studies with an iminodiacetic acid ion exchange resin, Daehan Hwahak Hwoeje, **11**, 56 (1967).
17. Inczedy J., Klatsmanyi-Gabor P., Erdey L., The use of complex forming agents in ion exchange chromatography. VI, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **69**, 137, 265 (1971).
18. deHernandez C. M., Walton H. F., Liquid exchange chromatography of amphetamine drugs, Anal. Chem., **44**, 890 (1972).
19. Funasaka W., Fujimura K., Kuriyama S., Ligand-exchange chromatography. I. Separation of phenylenediamine isomers by ligand-exchange chromatography, Bunseki Kagaku, **18**, 19 (1969).
20. Funasaka W., Fujimura K., Kuriyama S., Ligand-exchange chromatography. II. Separation of aminobenzoic acid isomers by ligand-exchange chromatography, Bunseki Kagaku, **19**, 104 (1970).
21. Funasaka W., Hanai T., Fujimura K., Ando T., Nonaqueous solvent chromatography. III. Complex chromatography between the metal ion of a cation-exchange resin and organic compounds in organic solvents, J. Chromatogr., **78**, 424, (1973).
22. Vogt C. R., Ryan T. R., Baxter J. S., High-speed liquid chromatography on cadmium-modified silica gel, J. Chromatogr., **136**, 221 (1977).
23. Chow F. K., Grushka E., High performance liquid chromatography with metal-solute complexes, Anal. Chem., **50**, 1346, (1978).
24. Chow F. K., Grushka E., Separation of aromatic amine isomers by high pressure liquid chromatography with a copper(II)-bonded phase, Anal. Chem., **49**, 1756 (1977).
25. Guyon F., Tambute A., Caude M., Rosset R., Determination of *N*-methylpyridinium 2-aldoxime methylsulfate (contrathion) in rat plasma and urine by high-performance copper(II)-silica ligand exchange chromatography, J. Chromatogr., **229**, 475 (1982).
26. Shimomura K., Walton H. F., Thin-layer chromatography of amines by ligand exchange, Sep. Sci., **3**, 493 (1968).

27. *Yasuda K.*, Thin-layer chromatography of chlorinated anilines on zinc salt-impregnated silica gel thin layers, *J. Chromatogr.*, **74**, 142 (1972).
28. *Yasuda K.*, Thin-Layer chromatography of aromatic amines on cadmium acetate-impregnated silica gel thin layers, *J. Chromatogr.*, **72**, 413 (1972).
29. *Yasuda K.*, Thin-layer chromatography of aromatic amines in cadmium sulphate-impregnated silica gel thin layers, *J. Chromatogr.*, **60**, 144 (1971).
30. *Martz M. D., Kriwis A. F.*, Thin layer chromatography of hexosamines on copper impregnated sheets, *Anal. Chem.*, **43**, 790 (1971).
31. *Kunzru D., Frei R. W.*, Separation of aromatic amino isomers by high-pressure liquid chromatography on cadmium impregnated silica gel columns, *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 191 (1974).
32. *Fujimura K., Kitanaka M., Ando T.*, Ligand-exchange gas chromatographic separation of aniline bases, *J. Chromatogr.*, **241**, 295 (1982).
33. *Latterell J. J., Walton H. F.*, Separation of amines by ligand exchange. II, *Anal. Chim. Acta*, **32**, 101 (1965).
34. *Latterell J. J.*, Separation of Amines by Ligand Exchange, Ph. D. thesis, University of Colorado, Boulder, 1964.
35. *Shimomura K.*, Ligand Exchange Chromatography, Ph. D. thesis, University of Colorado, Boulder, 1968.
36. *Navratil J. D., Walton H. F.*, Ligand exchange chromatography of diamines and polyamines, *Anal. Chem.*, **47**, 2443 (1975).
37. *Gehrke C. W., Kuo K. C., Zumwalt R. W., Waalkes T. P.*, Determination of polyamines in human urine by an automated ion-exchange method, *J. Chromatogr.*, **89**, 231 (1974).
38. *Webster P. V., Wilson J. N., Franks M. C.*, Macroreticular ion-exchange resins: some analytical applications of petroleum products, *Anal. Chem. Acta*, **38**, 193 (1967).
39. *Simomura K., Hsu T. J., Walton H. F.*, Ligand-exchange chromatography of aziridines and ethanolamines, *Anal. Chem.*, **45**, 501 (1973).
40. *Pilgeram L. O., Gal L. M., Sassenrath E. N., Greenberg O. N.*, Metabolic studies with ethanolamine-1,2-C¹⁴, *J. Biol. Chem.*, **204**, 367 (1953).
41. *Yoshino Y., Kinoshita H., Sugiyama H.*, Separation and determination of diethanolamine and monoethanolamine in triethanolamine by cation exchange chromatography, *Nippon Kagaku Zasshi*, **86**, 405 (1965).
42. *Rebertus R. L.*, Ion-exchange behavior of some substituted ammonium ions on zirconium phosphate, *Anal. Chem.*, **38**, 1089 (1966).
43. *Tsuji A., Sekiguchi K.*, The adsorption of isoniotinic acid hydrazide on cation-exchangers of various metal forms, *Nippon Kagaku Zasshi*, **81**, 847 (1961).
44. *Tsuji A., Sekiguchi K.*, Microdetermination of primary aromatic amines with ion-exchange resins, *Nippon Kagaku Zasshi*, **81**, 847 (1961).
45. *Navratil J. D.*, Ligand Exchange Chromatography of Non-Ionized Organic Compounds, Ph. D. thesis, University of Colorado, Boulder, 1975.
46. *Navratil J. D., Murgia E., Walton H. F.*, Ligand-exchange chromatography of diamines and polyamines, *Anal. Chem.*, **47**, 2443 (1975).
47. *Masters R. G., Leyden D. E.*, Ligand-exchange chromatography of amino sugars and amino acids on copper-loaded silylated control-lead pore glass, *Anal. Chem. Acta*, **98**, 9 (1978).
48. *Doury-Berthod M., Poitrenaud C., Trémillion B.*, Ligand exchange separations of amino acids. I. Distribution, equilibria of some amino acids between ammoniacal and copper(II) nitrate solutions and phosphonic, carboxylic, and iminodiacetic ion exchangers in the copper(II) form, *J. Chromatogr.*, **131**, 73 (1977).
49. *Doury-Berthod M., Poitrenaud C., Trémillion B.*, Ligand-exchange separation of amino acids. II. Influence of the eluent composition and of the nature of the ion exchange, *J. Chromatogr.*, **179**, 37 (1979).
50. *Reena*, Chromatographic behavior of amino sugars on metal salt impregnated thin layers, *Anal. Lett.*, **18**, 753 (1985).

51. *Murgia E., Walton H. F.*, Ligand-exchange chromatography of alkaloids, *J. Chromatogr.*, **104**, 417 (1975).
52. *Kothari R. M.*, Some aspects of fractionation of DNA on an IR-120 Al³⁺ column. VII. Effect of the tissue and source variation on the chromatographic profiles of DNA, *J. Chromatogr.*, **64**, 85 (1972).
53. *Shankar V., Joshi P. N.*, Fractionation of RNA on a metal ion equilibrated cation exchanger. I. Chromatographic profiles of RNA on an Amverkute IR-120 (Al²⁺) column, *J. Chromatogr.*, **90**, 99 (1974).
54. *Shankar V., Joshi P. N.*, Fractionation of RNA on a metal ion equilibrated cation exchanger. II. Chromatographic behavior of RNA subjected to different treatments, on Amberlite IR-120 Al³⁺ columns, *J. Chromatogr.*, **95**, 65 (1974).
55. *Скорород О. Р., Клизович Л. И.* Молекулярная и лигандная сорбция пиридина на макропористых сульфокатионитах. *Жур. колл. хим.*, **33**, 268, (1971).
56. *Goldstein G.*, Ligand-exchange chromatography of nucleotides, nucleosides, and nucleic acid bases, *Anal. Biochem.*, **20**, 477 (1967).
57. *Burtis C. A., Goldstein G.*, Terminal nucleoside assay of ribonucleic acid by ligand-exchange chromatography, *Anal. Biochem.*, **23**, 502 (1968).
58. *Wolford J. C., Dean J. A., Goldstein G.*, Separation of oxypurines by ligand-exchange chromatography and determination of caffeine in beverages and pharmaceuticals, *J. Chromatogr.*, **62**, 148 (1971).
59. *Chow F. K., Grushka E.*, High performance liquid chromatography of nucleotides and nucleosides using outerspace and innerspace metal-solute complexes, *J. Chromatogr.*, **185**, 361 (1979).
60. *Corradini D., Sinibaldi M., Messina A.*, Outer-sphere ligand exchange chromatography of nucleotides and related compounds on a modified polysaccharide gel, *J. Chromatogr.*, **235**, 273 (1982).
61. *Sinibaldi M., Carunchio V., Messina A., Corradini C.*, Ligand exchange chromatography on bonded silica gel modified with amino-complexes of cobalt(III), *Ann. Chem.*, **74**, 175 (1984).
62. *Vivilecchia R., Thiebaud M., Frei R. W.*, Separation of polynuclear aza-heterocyclics by high-pressure liquid chromatography using a silver-impregnated adsorbent, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 411 (1972).
63. *Frei R. W., Beall K., Cassidy R. M.*, Determination of aromatic nitrogen heterocycles if air samples by high speed liquid chromatography, *Mikrochim. Acta*, **1974**, 859.

РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ, ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

В. А. Даванков

4.1. Разделение аминокислот и пептидов на полимерных сорбентах

Вполне естественно, что аминокислоты, являющиеся типичными комплексообразующими соединениями, часто использовались для оценки разделяющей способности лигандообменных хроматографических систем. При хроматографическом разделении аминокислот были опробованы практически все типы природных, синтетических полимерных и силикагельных сорбентов в сочетании с различными ионами переходных металлов. К наиболее важным достижениям в этой области относится разделение оптических изомеров аминокислот, которому посвящена специальная глава. Отделение различных аминокислот друг от друга — гораздо менее трудная задача. Ее и можно решить, используя хроматографические средства энантиомерного анализа, но в общем случае лиганды на поверхности сорбента или комплексообразующие добавки к элюенту могут и не быть хиральными. Традиционные ионообменники и другие насадки, способные удерживать ионы металлов и их комплексы, вполне обеспечивают разделение аминокислот.

В 1966 г. Сигель и Дедженс [1] впервые продемонстрировали исключительные возможности лигандообменных систем в сорбции аминокислот. Для селективного связывания свободных аминокислот из морской воды эти исследователи использовали ионообменник хелекс-100 на основе полистирола, содержащий остатки иминодиацетатных групп в форме комплексов с медью(II). Из-за высокой ионной силы морской воды ионообменный механизм сорбции в противоположность комплексообразованию не мог бы обеспечить необходимую селективность. Сорбированные на ионах меди аминокислоты затем вытесняли раствором аммиака и подвергали стандартному аминокислотному анализу.

К середине 1960-х годов относятся и первые попытки решить другую практически важную проблему — отделить аминокислоты от пептидов путем использования реакции комплексообразования. Сшитый декстрановый гель сефадекс G-25 в щелочной среде заряжали ионами меди(II) [2, 3]. При пропускании через этот сорбент смеси аминокислот и пептидов пептиды первыми выходили из колонки. В щелочном элюенте пептиды снимают медь с сефадекса, образуя с ней стабильные комплексы, кото-

рые слабо удерживаются сорбентом [4]. Пептиды координируют медь через концевую аминогруппу и соседнюю амидную группировку, теряющую свой амидный протон, поэтому в щелочной среде комплексы меди с пептидами заряжены отрицательно. Декстрановые гели при высоких значениях рН также заряжены отрицательно.

Аналогичный механизм лежит и в основе разделения аминокислот и пептидов, элюируемых растворами аммиака в колонках с насадкой хелекс-100, заряженной медью [5—9]. Кислые и нейтральные пептиды, кислые аминокислоты, образующие с медью отрицательно заряженные комплексы, элюируются первыми; нейтральные аминокислоты и основные пептиды, образующие нейтральные комплексы, элюируются 1,5 М раствором аммиака; основные аминокислоты вытесняются 6 М раствором аммиака. При рН 8,5—9,5 на насадке хелекс-100, заряженной никелем [10], цинком или кобальтом(II) [11], можно селективно удерживать и выделять основные аминокислоты (лизин, орнитин, аргинин, гистидин). При введении в такую гидрофильную матрицу, как, например, сефадекс G-25 [12], группировки иминодиацетата никеля проявляют наибольшее сродство опять-таки к основным аминокислотам [13] и основным пептидам [14]. Удерживание нейтральных аминокислот и олигопептидов значительно возрастает при увеличении рН и ионной силы раствора [13, 14]. β -Аминокислоты образуют неустойчивые медные комплексы и слабо удерживаются на насадке хелекс-100, заряженной медью [15]. Их легко отделить от пептидов и α -аминокислот, удерживаемых наиболее прочно.

Если вместо отрицательно заряженной насадки хелекс-100 использовать анионообменные смолы на основе ди- и триэтиламиноэтилцеллюлозы, медные комплексы кислых аминокислот и пептидов, наоборот, удерживаются сильнее [16, 17]. Этот метод группового отделения пептидов от аминокислот до сих пор используют для анализа ряда биологических жидкостей (в том числе мочи [18—20], лимфы [21], сыра [22] и сусла [23]).

Оптимизируя рН и ионную силу щелочного буфера на основе бората натрия на колонке с диэтиламиноэтил-сефадексом А-25, удалось разделить медные комплексы различных пептидов [24]. Таким же образом были исследованы пептиды гидролизатов белка, используемых при внутривенном питании (аминосол), а в ходе ступенчатого элюирования были полностью разделены олигоглицины от глицина до пентаглицина. Разделение приписывают возрастанию общего отрицательного заряда медных комплексов более длинных пептидов.

На основе разработок Арикавы [25, 26] был создан лигандообменный аминокислотный анализатор марки Хитачи Перкин-Элмер модели KLA-3B. На этом приборе в два этапа можно

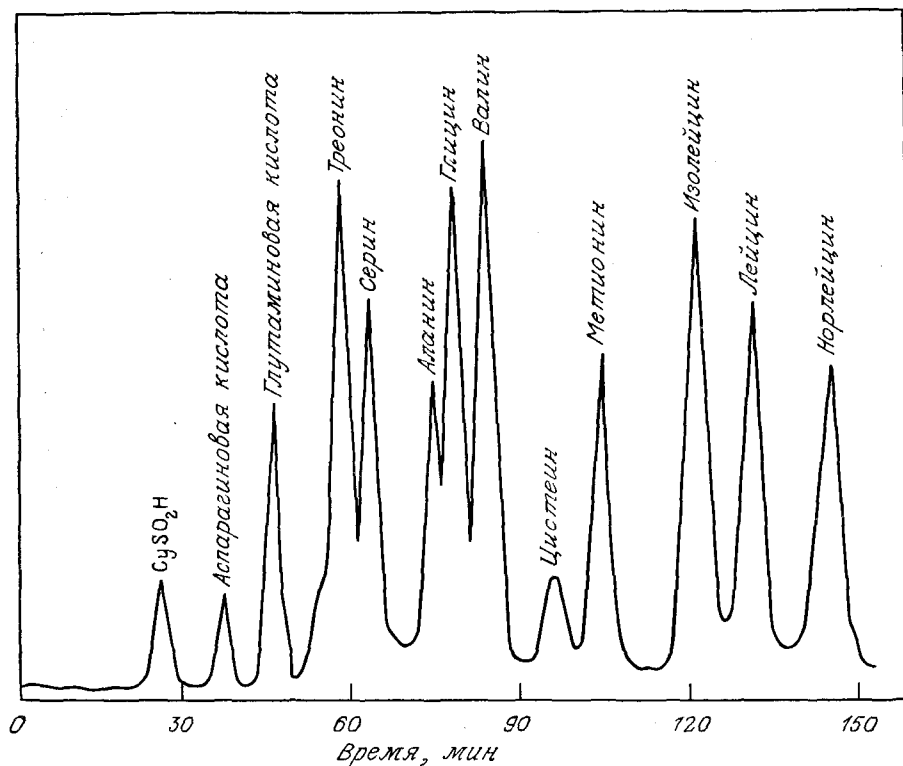


Рис. 4.1. Хроматограмма продуктов разделения кислотных и нейтральных аминокислот на сульфированной полистирольной смоле, заряженной ионами цинка. Каждый пик соответствует 0,01 мкмоль пробы. Элюент — буферный раствор ацетата натрия (рН 4,10), содержащий $3,5 \cdot 10^{-4}$ М цинка [26].

провести полный анализ аминокислот. Кислые и нейтральные аминокислоты (рис. 4.1) элюировали при 55°C из катионообменника на основе сульфированного полистирола буферным раствором с рН 4,10, содержащим $4 \cdot 10^{-4}$ М ацетата цинка и $5,5 \cdot 10^{-2}$ М ацетата натрия. Для элюирования основных аминокислот необходим элюент с рН 5,1, содержащий $1 \cdot 10^{-3}$ М цинка и 0,6 М ацетата натрия. Улучшенные буферные системы позволяют проводить одновременный анализ всех аминокислот в типичных гидролизатах белков и, кроме того, определение S-карбоксиметилцистеина S-(β -аминоэтил)цистеина, глюкозамина, галактозамина [27] и γ -аминомасляной кислоты [28]. Для повышения чувствительности обнаружения аминокислот в качестве обнаруживающих реагентов в этом методе вместо нингидрина использовали пирокатехиновый фиолетовый [26] и пиридок-

саль [29]. Однако лигандообменный аминокислотный анализатор не получил дальнейшего распространения и не смог успешно конкурировать с ионообменными аминокислотными анализаторами. Одной из трудностей эксплуатации прибора, ограничивающих его применение, оказалась недостаточная воспроизводимость значений удерживаемых объемов.

Следует отметить, что в присутствии ионов серебра сорбенты на основе сульфированного полистирола приобретают селективное сродство к серусодержащим аминокислотам (метионину, цистеину) и пептидам, содержащим метионин [30].

Первое хроматографическое разделение аминокислот с помощью хелатообразующих смол было описано Герингом и Хайльманом [31] в 1966 г. Насадка была получена им реакцией сшитого хлорметилированного полистирола с саркозином (N-метилглицином). После зарядки ионами меди или никеля на этом сорбенте удалось частично разделить простые смеси аминокислот, используя чистую воду в качестве элюента. Хотя эти первые результаты были довольно многообещающими, дальнейших попыток улучшить эффективность колонок не было сделано. Аналогично было проведено частичное разделение нескольких аминокислот на колонках с насадками медь—хелекс 100 [32] и медь—хитозан [33], а также в тонких слоях никель—хелекс 100 [34], но полученные результаты не привлекли внимания потенциальных потребителей, которые интересовались новыми методиками только в том случае, когда с их помощью можно было решить новые проблемы, неподвластные уже испытанным методам.

Последующие исследования ЛОХ аминокислот, предпринятые Дури-Бертодом и другими, привели к созданию теоретического описания равновесного распределения аминокислот, меди(II) и аммиака между подвижной фазой и фазой сорбента [35], а также к ряду практических разделений сложных смесей аминокислот [36]. Были исследованы три типа полимерных насадок: 1) полимер акриловой кислоты био-рекс 70; 2) фосфорилированный полистирол био-рекс 63; 3) хелекс-100. Результаты экспериментов, которые находились в хорошем соответствии с выведенными теоретически зависимостями, показали, что удерживание и селективность разделения аминокислот возрастают с уменьшением содержания в подвижной фазе аммиака и ионов меди, конечно, до тех пор, пока концентрация ионов меди не станет такой низкой, что сорбент начинает терять ионы меди. Зависимости коэффициентов распределения аминокислот от концентрации ионов меди в 1 М растворе аммиака имеют максимум при концентрации ионов меди(II) $2 \cdot 10^{-3}$ М. Как было показано, аминокислоты образуют смешанные медные комплексы с молекулами аммиака. В зависимости от числа карбоксильных и

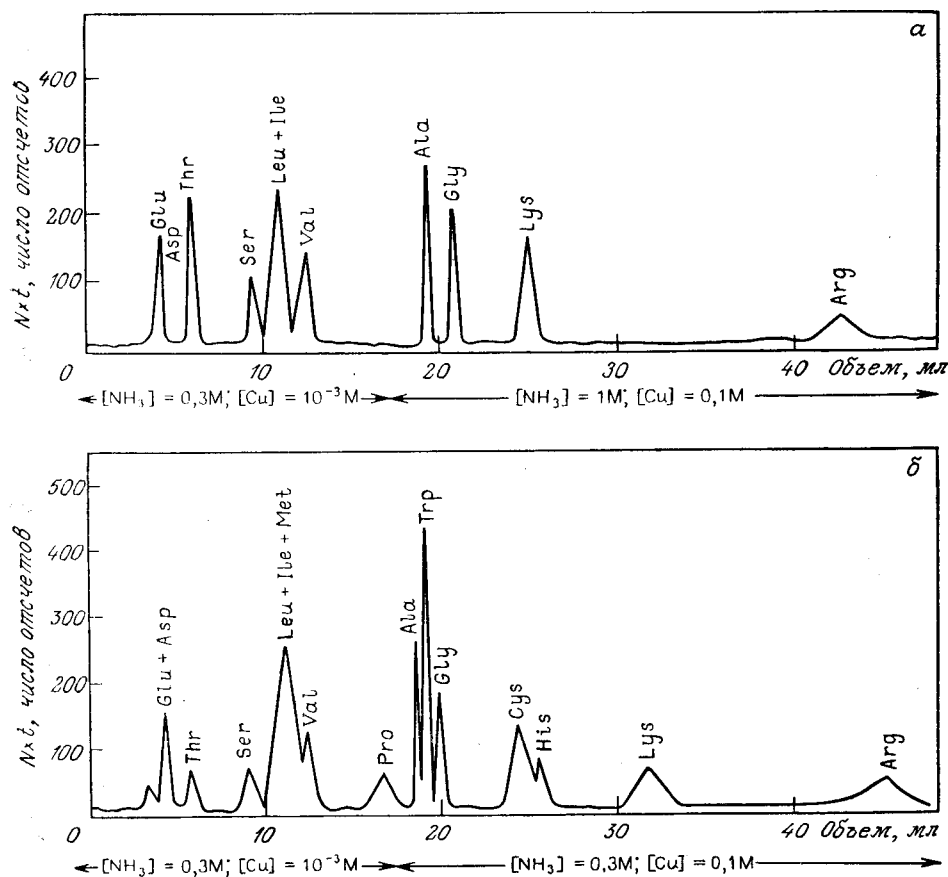


Рис. 4.2. Хроматограмма продуктов разделения меченных ^{14}C аминокислот на карбоксильной смоле био-рекс 70 с размером частиц 50—65 мкм. Колонка размером 45×0,4 см; детектирование непрерывным сцинтилляционным счетчиком; вводимое количество 4 нмоль на аминокислоту, что соответствует 0,02—0,07 мкКи по активности; расход элюента 8,8 мл/ч; комнатная температура [33].

аминогрупп в молекуле аминокислоты заряд разнолигандного комплекса меняется от 0 до +2. В соответствии с этим кислотные лиганды удерживаются более слабо, а основные лиганды — более сильно, чем нейтральные аминокислоты, поскольку все три типа исследованных сорбентов в растворе аммиака заряжены отрицательно. Для всех аминокислот удерживание зависело от стабильности их смешанных разнолигандных медных комплексов с аммиаком, а также от взаимодействия с матрицей сорбента, которое было особенно интенсивным в случае гидрофобных аминокислот и полистирольной матрицы. Как показано на рис.

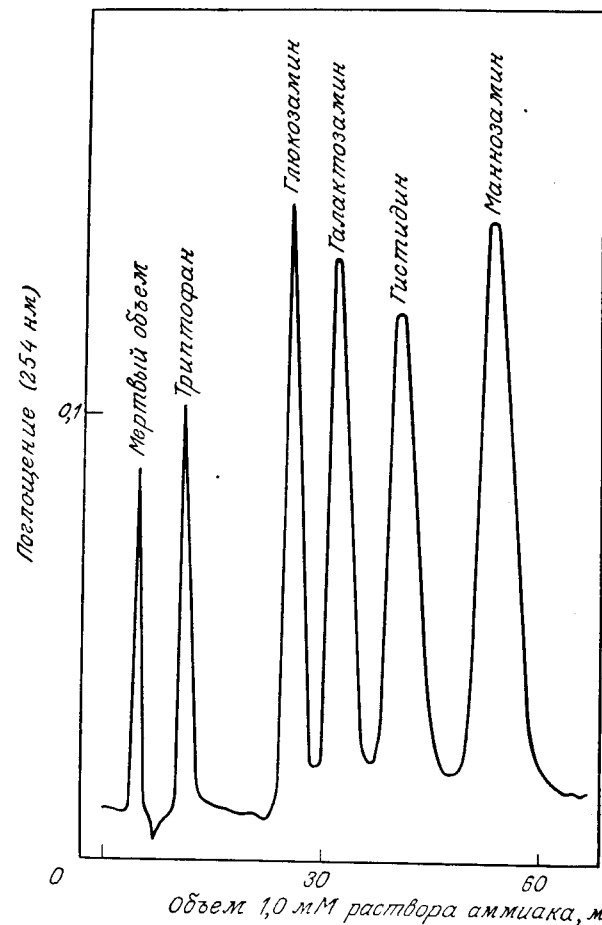


Рис. 4.3. Хроматограмма продуктов разделения аминокислот и аминокислот на карбоксильной смоле био-рекс 70, заряженной медью(II). Колонка размером 21×0,63 см; расход элюента 30 мл/ч; комнатная температура [34].

4.2, хроматографическая эффективность насадок с размером частиц 50—65 мкм (био-рекс 70) достаточно высока. Сорбенты на основе полистирола с фосфоновыми и иминодиацетатными группами био-рекс 60 и хелекс-100 соответственно проявляют более низкую эффективность. Однако этот факт может быть обусловлен различием в плотностях сшивки и набухаемости сравниваемых сорбентов. Было также найдено [37], что заряженный медью био-рекс 70 можно применять для одновременного анализа смесей аминокислот и аминокислот (рис. 4.3).

Селективная адсорбция цефалоспорина из его смеси с диа-

цетилцефалоспорином и рядом других аминокислот и получение антибиотика с чистотой 99%, по-видимому, имеют препаративное значение [38]. В качестве лигандообменника использовали полистирольную смолу, содержащую медные комплексы L-лизина.

4.2. Разделение аминокислот и пептидов на модифицированных силикагелях

Интерес к лигандообменному хроматографическому анализу аминокислот и пептидов вновь возрос в связи с началом применения высокоэффективных насадок на основе микрочастиц пористого силикагеля. Код и Фуко [39—44] предложили для этих целей одну из простейших и наиболее эффективных лигандообменных систем. Водный раствор сульфата меди(II) (10^{-2} — 2×10^{-2} М) в 1 М аммиаке пропускали через коммерческую колонку, заполненную силикагелем с размером частиц 5 мкм, до установления равновесия, когда ионы меди появлялись в элюате. На силикагеле с внутренней удельной поверхностью примерно 400 м²/г сорбировалось до 4,8% меди (0,75 мМ/г), вероятнее всего, в форме поверхностного слоя силиката меди. Между площадью поверхности силикагеля и поглощением меди была найдена [45] настолько хорошая линейная корреляция, что ее можно использовать для быстрого количественного определения доступных силанольных групп. Полученный материал является хорошей сорбирующей насадкой для ЛОХ, на которой можно эффективно разделять смеси аминокислот и пептидов в водно-органическом растворе аммиака (рис. 4.4 и 4.5). Этот метод должен стать популярным ввиду простоты модификации силикагельных колонок ионами металла, высокой эффективности и селективности, а также удобства и чувствительности (5—50 нг для аминокислот) фотометрического детектирования комплексов разделенных веществ с медью. Постепенное растворение силикагеля в содержащих аммиак элюентах можно подавить добавлением в элюент значительной доли органического растворителя (30—80% ацетонитрила), а также использованием предколонки с относительно крупными частицами модифицированного медью(II) силикагеля, установленной между насосом и узлом ввода пробы [46, 47]. Кроме того, добавление к элюенту незначительных количеств сульфата меди (1 часть на миллион или млн⁻¹ до 10^{-4} %) стабилизирует количество активного силиката меди в аналитической колонке и улучшает воспроизводимость данных по удерживанию.

Координационный механизм удерживания сорбатов в описанной системе очевиден из того факта, что из всех исследованных аминокислот наиболее сильно удерживаются аланин, серин и глицин вследствие незначительных стерических затруд-

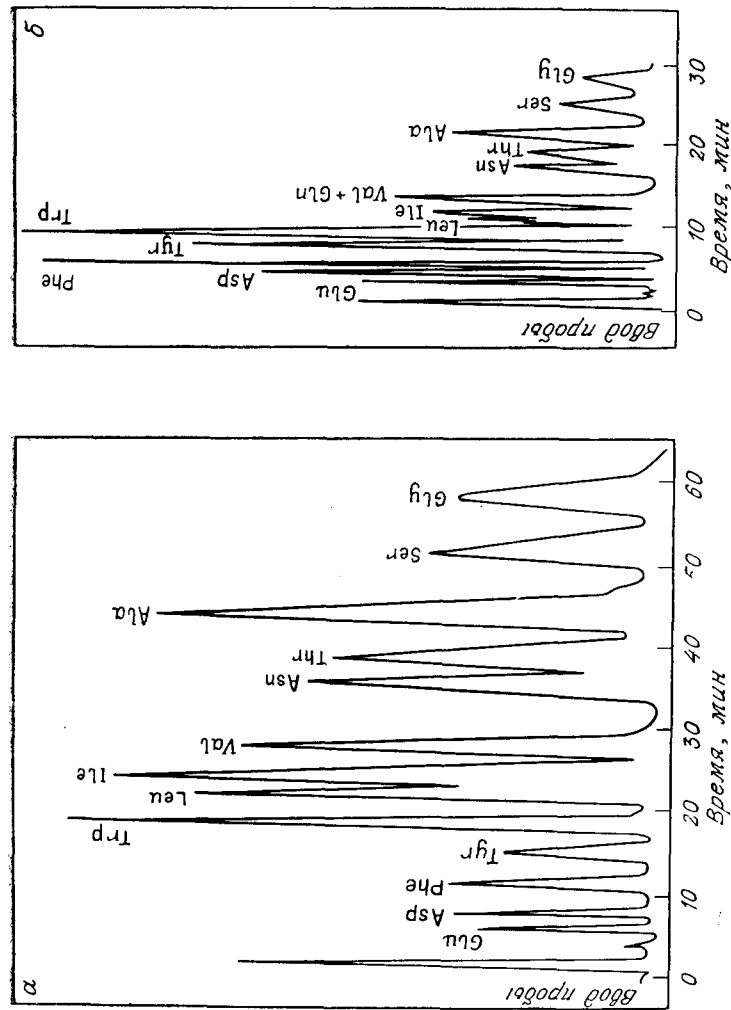


Рис. 4.4. Хроматограмма продуктов разделения аминокислот на силикагеле, модифицированном медью(II). Колонка 15X × 0,48 см. Насадки: а — пергисил 5; б — сферосил ХОА 600. Элюент: а — водный ацетонитрил (52:48) + 0,15 М раствор аммиака; б — водный ацетонитрил (50:50) + 0,17 М раствор аммиака. Расход элюента: а — 1 мл/мин, б — 1,7 мл/мин; детектирование по УФ-излучению при 210 нм [37].

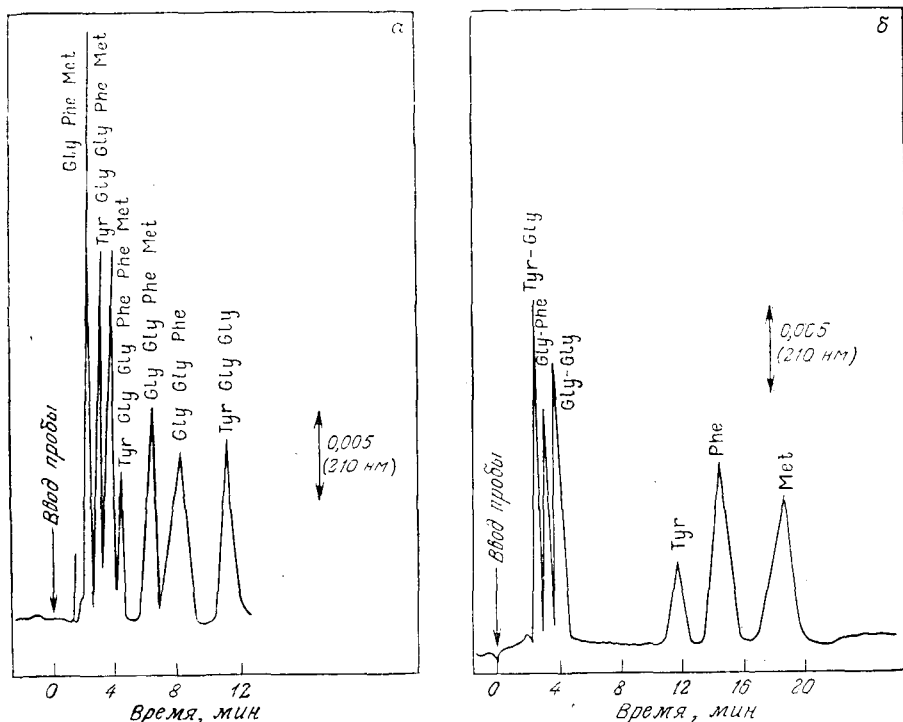


Рис. 4.5. Хроматограмма продуктов разделения фрагментов Met-энкефалина в ходе двух изократических циклов на силикагеле партисил 5, модифицированном медью(II). Колонка размером $20 \times 0,48$ см. Подвижная фаза: а — водный ацетонитрил (13 : 87) + 0,0125 М раствор аммиака; б — водный ацетонитрил (70 : 30) + 0,2 М раствор аммиака. Расход элюента 1,5 мл/мин. Детектирование по УФ-излучению при 210 нм [37].

нений при координации этих небольших молекул с поверхностью силиката меди. Большие молекулы пептидов из-за стерических затруднений удерживаются слабо. Аспарагиновая и глутаминовая кислоты, отрицательно заряженные в щелочных средах, отталкиваются от силанольных анионов и удерживаются слабо. Напротив, основные аминокислоты и основные пептиды проявляют особенно высокое сродство к модифицированному медью силикагелю, чему благоприятствует как электростатическое взаимодействие, так и координация аминокрупп с медью. В этом случае градиентное элюирование (рис. 4.6) сначала водно-ацетонитрильной (10 : 90) смесью, содержащей 0,1 М аммиака, а в конце водно-ацетонитрильной (60 : 40) смесью, содержащей не менее 0,95 М аммиака, позволяет анализировать целую палитру пептидов и аминокислот [46]. Рис. 4.6 замечателен тем,

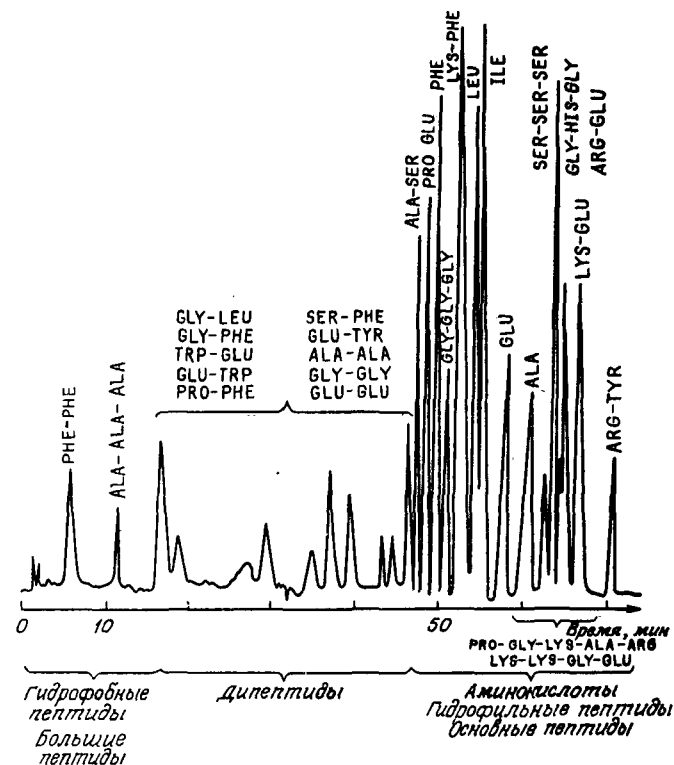


Рис. 4.6. Составная хроматограмма продуктов разделения ряда пептидов и аминокислот. Колонка размером $15 \times 0,48$ см. Насадка: лихосорб Si 60, модифицированный медью(II) с размером частиц 7 мкм. Подвижная фаза с градиентом концентрации от А: водный ацетонитрил (10 : 90) + 0,1 М раствор аммиака + 1 мл^{-1} ($10^{-4}\%$) меди(II) до В: водный ацетонитрил (60 : 40) + 0,95 М раствор аммиака, 1 мл^{-1} ($10^{-4}\%$) меди(II). Расход элюента 2 мл/мин. Детектирование по УФ-излучению при 254 нм. Проба объемом 30 мкл содержит несколько микрограммов разделяемого вещества [39в].

что на нем представлены результаты одного из очень немногих случаев успешного градиентного элюирования в ЛОХ с непосредственным детектированием комплексов меди(II) при 254 нм. Обычно градиентное элюирование в ЛОХ осложняется изменением равновесной концентрации ионов меди в элюате, что вызывает сильный дрейф нулевой линии на хроматограммах.

Авторы работы [46] разработали альтернативный метод фракционирования смесей пептидов и аминокислот за один хроматографический цикл при изократическом элюировании. Это было осуществлено путем замещения в водном элюенте аммиака слабоосновным N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамином

(ТМЭД). В водном растворе, содержащем $5 \cdot 10^{-3}$ М ТМЭД и $2 \cdot 10^{-3}$ М сульфата меди, смеси аминокислот и пептидов разделяются на четыре основные группы: 1) трипептиды и высшие полипептиды; 2) дипептиды, за исключением основных; 3) свободные аминокислоты (в трех основных пиках) и некоторые основные дипептиды типа Lys—Asp; 4) большинство основных дипептидов. Этот метод был предложен для быстрого фракционирования гидролизатов белка и количественного определения фракций дипептидов и аминокислот.

Что касается химически привитых хелатирующих фаз с основными аминогруппами, полученных реакцией поверхностных силанольных групп с 3-аминопропилтриэтоксисиланом $(\text{H}_5\text{C}_2\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, 3-(2-аминоэтиламино)пропилтриметоксисиланом $(\text{H}_3\text{CO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, 3-[N-(2'-аминоэтил)-2-аминоэтиламино]пропилтриметоксисиланом $(\text{H}_3\text{CO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, то, по-видимому, они менее подходят для лигандообменной хроматографии чем аналогичные полимерные ионообменники со сходными привитыми лигандами: амино-, этилендиамино- и диэтилентриаминогруппами. Как было найдено, анионообменники на основе силикагеля нестабильны в водных средах, содержащих ионы металла, с pH больше 4 [48, 49]. Тем не менее на колонках фирмы «Alltech» с насадкой 600-NH (привитые аминогруппы) удалось разделить несколько пептидов в присутствии ионов кадмия(II) в элюенте [50]. Применение ионов цинка позволило провести групповое отделение пептидов от более слабо удерживаемых аминсахаров [50]. На насадке с привитыми этилендиаминовыми группами, заряженными ионами меди, было проведено разделение ряда аминсахаров и аминокислот [48]; в элюенте, содержащем 10^{-3} М сульфата кадмия, $5 \cdot 10^{-2}$ М ацетата аммония и 35% ацетонитрила была успешно разделена смесь из семи дипептидов [51]. Высокое содержание ацетонитрила повышает гидролитическую устойчивость аминной фазы. Однако намного большие стабильность, воспроизводимость и, что особенно важно, эффективность колонки наблюдались при использовании основных хелатообразующих фаз, приготовленных динамическим покрытием обычных обращенно-фазовых колонок для ВЭЖХ [51]. Через коммерческие колонки с лихросорбом С8 пропускали водно-ацетонитрильный (65:35) элюент, содержащий ионы цинка и 4-додецилдиэтилентриамин (C_{12} -диен) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$. Гидрофобная хелатообразующая добавка элюента сильно сорбируется углеводородной поверхностью сорбента, образуя таким образом высокоэффективную лигандообменную насадку. Как показано на рис. 4.7 и 4.8, в такой лигандообменной системе можно быстро разделить смесь дансилпроизводных аминокислот и дипептидов.

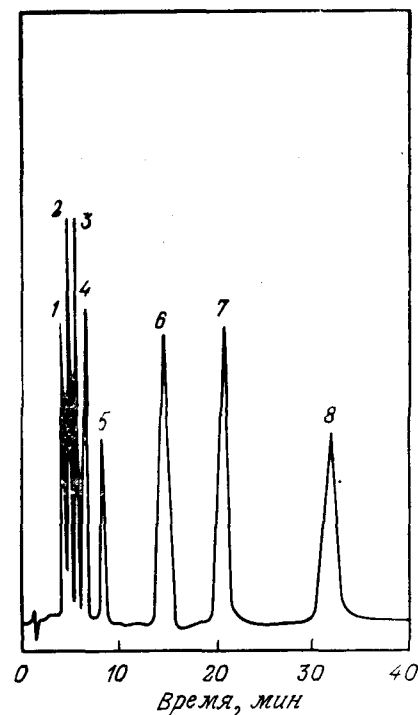


Рис. 4.7. Хроматограмма продуктов разделения дансил-аминокислот на насадке лихросорб RP8 с C_{12} -диен-цинк. Колонка размером $250 \times 4,6$ мм. Элюент: 10^{-3} М раствор сульфата цинка, 0,025% C_{12} -диен, 1% ацетата аммония, водный ацетонитрил (65:35). [43]. Разделенные вещества: 1 — глутаминовая кислота, 2 — γ -аминомасляная кислота, 3 — треонин, 4 — серин, 5 — α -аминомасляная кислота, 6 — норвалин, 7 — лейцин, 8 — триптофан.

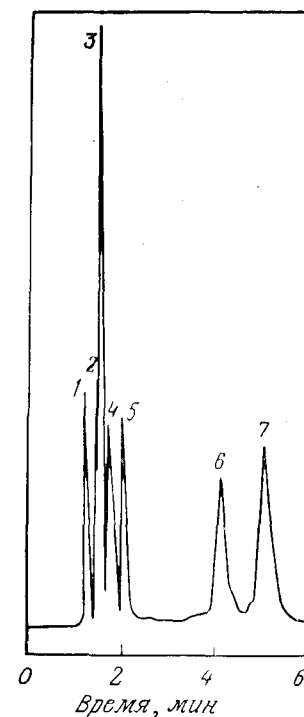
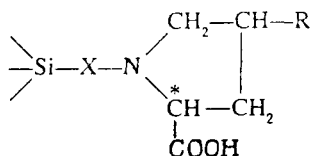


Рис. 4.8. Хроматограмма продуктов разделения дипептидов в системе лихросорб RP8 — C_{12} -диен-цинк. Колонка и элюент такие же, как на рис. 4.7. [43]. Разделенные вещества: 1 — Pro—Tyr; 2 — Pro—Phe; 3 — Pro—Trp; 4 — Phe—Pro; 5 — Tyr—Phe; 6 — Trp—Phe; 7 — Trp—Trp.

Завершая обзор химически связанных хелатирующих фаз, необходимо упомянуть о приготовлении стабильных химически модифицированных насадок прививкой к силикагелю таких лигандов, как иминодиацетат и этилендиамин-N,N',N'-триацетат [49]. Насадки с первым лигандом, заряженным медью, используются для анализа реакционных смесей, получаемых при защите аминокислоты треонина этоксикарбонилхлоридом трифенилфосфония [49]. Наконец, разработана методика [52] полного анализа обычных α -аминокислот в нативной форме как при изократическом, так и при градиентном элюировании на стабильных и

эффективных хиральных сорбентах типа



где R=H или OH; X=—CH₂—, —(CH₂)₃—, —(CH₂)₈— или —CH₂—CH₂—C₆H₄—CH₂— при наличии ионов меди в элюенте. Синтез, свойства и использование этих хиральных фаз для разделения энантиомеров аминокислот детально описаны в гл. 5.

К лигандообменной хроматографии вплотную примыкает разделение соединений, вступающих в реакции комплексообразования с добавленными в элюент ионами переходных металлов на неподвижных фазах, не участвующих в комплексообразовании. Путем превращения разделяемых лигандов в комплексы металл—лиганд можно изменить в желаемом направлении их удерживание и разрешение. Это может быть обусловлено, во-первых, изменением электростатических зарядов анализируемых веществ при комплексообразовании с катионами металлов, а во-вторых, тем, что в ходе координирования лиганд принимает новую конформацию и новые функциональные группы получают возможность вступать во взаимодействие с неподвижной фазой. Так, например, при разделении на сферисорбе-CN в водно-ацетонитрильном (70:30) элюенте с добавлением 10⁻⁵ М ацетата меди из колонки разделяются четыре возможных диастереомера пироглутамилгистидил-3,3-диметилпролинамида в следующей последовательности: L-L-D, L-D-L, L-L-L, D-L-L [51]. Подобным же образом в присутствии меди(II) был отделен [54] L-Тург—D-Ala—Gly—L-Phe—L-Met от его D-Met [5] изомера. В условиях эксперимента цианофазы практически не удерживают ионов меди (сорбция составляет приблизительно 5 мМ/г), а добавки ионов металла в основном модифицируют молекулы разделяемых веществ.

То же самое можно отнести к разделению аминокислот и N-метиламинокислот в форме их медных комплексов на обращенно-фазовых колонках [55, 56]. Основное преимущество такого подхода заключается в возможности проводить обнаружение при сравнительно больших длинах волн на простом фотометрическом детекторе благодаря сильному поглощению УФ-излучения медными комплексами аминокислот с λ_{макс} вблизи 230 нм. Как было найдено, линейный интервал обнаружения составляет более четырех порядков (более 10 000) при пределах обнаружения порядка 10 нг/10 мкл. Удерживание amino-

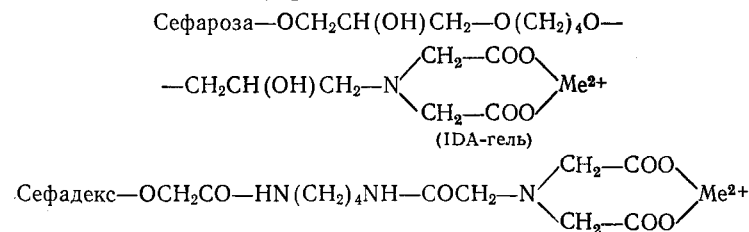
кислот возрастает одновременно с величиной pH, поскольку в комплексообразовании при этом вступает большее число молекул лигандов.

4.3. Разделение белков с помощью «металло-хелат-аффинной» хроматографии

Основное требование к разделяемым веществам ЛОХ — это способность образовывать координационные связи с ионами переходных металлов. Этому требованию удовлетворяют многие молекулы белков, содержащие остатки гистидина, цистенна, триптофана и в меньшей степени тирозина и лизина. Действительно, Порат и сотр. [57] показали, что координационное взаимодействие можно успешно использовать для селективной сорбции и выделения нативных ферментов и других белков. Разработанный ими метод базируется на иных, чем обычно используемых при фракционировании свойствах белков, таких, как размер молекул, электростатический заряд и др. Поэтому ЛОХ — мощный дополнительный метод в тех случаях, когда ситовая (эксклюзионная) и ионообменная хроматография оказываются неприменимыми с точки зрения сохранения активности, выхода и степени очистки.

ЛОХ белков, или «металло-хелат-аффинная» хроматография, как предложили ее называть Порат и сотр. [57] в 1975 г., обладает высокой сорбционной емкостью, обеспечивает количественное выделение белков без нарушения их структуры и отличается легкой регенерацией сорбента. На эту тему было опубликовано два небольших обзора Лённердала и Кина [58], и Даванкова [59].

В металло-хелат-аффинной хроматографии активные центры насадок, на которых происходит сорбция, обычно представляют собой систему ион переходного металла — иминодиацетатная группа, связанную с матрицей сорбента достаточно длинной группировкой, например [57, 60]:



Очевидно, что матрица сорбента должна быть доступной для больших молекул белков, чтобы обеспечивать возможность образования разнолигандных сорбционных комплексов. Этому условию удовлетворяют гели с высокой набухаемостью, такие,

как сефароза 6В, CM-сефадекс С-50, трисакрил GF 2000 (приготовленный сополимеризацией нового акрилового мономера N-акрилоил-2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиола) [61] или другие слабо шитые ионообменники. Было показано [62], что макропористый гидрофильный TSK-гель HW-55 также представляет собой прекрасную насадку для проведения ЛОХ ферментов. Нет причин, по которым нельзя было бы применять для этих же целей и лигандообменники на основе силикагеля. Действительно, недавно было показано, [62, 63], что белки можно разделить с помощью ЛОХ на силикагеле с ковалентно связанными иминодиацетатными хелатными комплексами. Естественно, что для предотвращения неспецифической сорбции нужно в значительной степени исключить все другие взаимодействия, помимо комплексообразования белков с привитыми хелатами металлов. Поэтому в ЛОХ следует применять только сорбенты с гидрофильной поверхностью или гидрофильные шитые полимеры. Электростатические взаимодействия обычно сводят к минимуму, используя элюенты с большой ионной силой (1 М хлорид натрия).

Связывание белка с системой металл—иминодиацетат—матрица происходит благодаря образованию координационных связей. Обычно процесс проводят в интервале значений рН от 6 (ацетатный буфер) до 8 (фосфатный буфер). Разрушение сорбционного комплекса и элюирование связанного белка осуществляют по одной из трех методик:

1. Понижение рН элюента. Это приводит к протонированию донорных групп белка и диссоциации его сорбционного комплекса. Следует помнить, что фиксированные в матрице иминодиацетатные группы (IDA) также способны протонироваться и таким образом терять ранее связанный с ними ион металла. Потерю кобальта(II) насадкой (обесцвечивание насадки IDA—Co²⁺) можно наблюдать визуально уже при рН 5. Хелатные комплексы IDA—Zn²⁺ и особенно IDA—Cu²⁺ более стабильны.
2. Лигандный обмен. Молекулы удерживаемого белка можно легко вытеснить имидазолом, образующим более устойчивый комплекс. Использование имидазола применительно к колонкам с насадкой IDA—Me²⁺ предполагает предварительную обработку насадки с целью образования разнолигандного комплекса, например IDA—Cu(Im)₂ 10 мМ раствором имидазола при рН 7,0 (1 М NaCl). Только в этом случае разбавленный 1 мМ раствор имидазола может обеспечить эффективное элюирование белков.
3. Разрушение хелата. Сорбционные комплексы можно разрушить при низких рН средним по силе хелатообразующим аген-

том (гистидином) или сильным хелатирующим агентом (этилендиаминтетрауксусной кислотой), что приводит к освобождению белка и десорбции металла.

Каждый из перечисленных способов элюирования можно проводить ступенчато или в градиенте концентраций.

Металло-хелат-аффинную хроматографию использовали до сих пор в основном в качестве препаративного метода. Интересно, что многие ферменты, выделенные этим методом, принадлежат к классу металлопротеинов. Такие белки содержат один или несколько прочно связанных ионов металла, играющих важную роль в поддержании специфической третичной структуры молекулы белка или взаимодействующих со специфическими субстратами фермента. Следует подчеркнуть, что эти белки всегда выделяются в своей первоначальной форме комплекса с металлом. Так, например, белок, содержащий железо, может быть сорбирован на медь(II)-хелатном геле, затем элюирован и, наконец, получен в первоначальной форме комплекса с железом. Это означает, что участки молекул металлопротеина, включающие атомы металла, не участвуют в лигандообменных процессах хроматографического разделения. Аналогичным образом остатки аминокислот, ответственные за удерживание ионов металлов в молекулах металлопротеинов, не взаимодействуют с ионами лигандообменной насадки. Например, лактоферрин имеет два участка связывания меди, тем не менее в насыщенном медью состоянии он будет удерживаться медно-иминодиацетатным гелем так же прочно, как и апоформа лактоферрина или железо-лактоферрин [58]. Все три формы лактоферрина ведут себя одинаково: элюируются с совершенно одинаковыми удерживаемыми объемами и сохраняют свои нативные металллические составляющие. Другой типичный пример представлен на рис. 4.9.

Приведенные доводы указывают на то, что только остатки аминокислот, находящиеся на поверхности молекулы белка, принимают участие в координации с привитыми к матрице хелатами. Лишь немногие из обычно входящих в состав белковой молекулы остатков гистидина или цистеина находятся на ее поверхности, что обуславливает высокую селективность метода. Так, например, в ряду родственных интерферонов родство к различным хелатам металлов, как было найдено [64], изменяется в широких пределах, что имеет большое аналитическое значение для оценки топографии поверхности молекул белка.

Сулковский [65] в ясной и убедительной статье анализирует результаты ЛОХ на геле IDA—Me²⁺ нескольких белков известной первичной и вторичной структуры, что позволило ему сделать ряд важных выводов:

1. Молекулы белка, не имеющие на своей поверхности остатков гистидина или триптофана, не удерживаются гелем IDA—Cu²⁺. Вклад остатков цистеина еще должен быть доказан с помощью подходящего модельного белка (металлотионеина).
2. Присутствие одного остатка гистидина на поверхности молекулы белка достаточно для ее удерживания гелем IDA—Cu²⁺ при нейтральных pH.

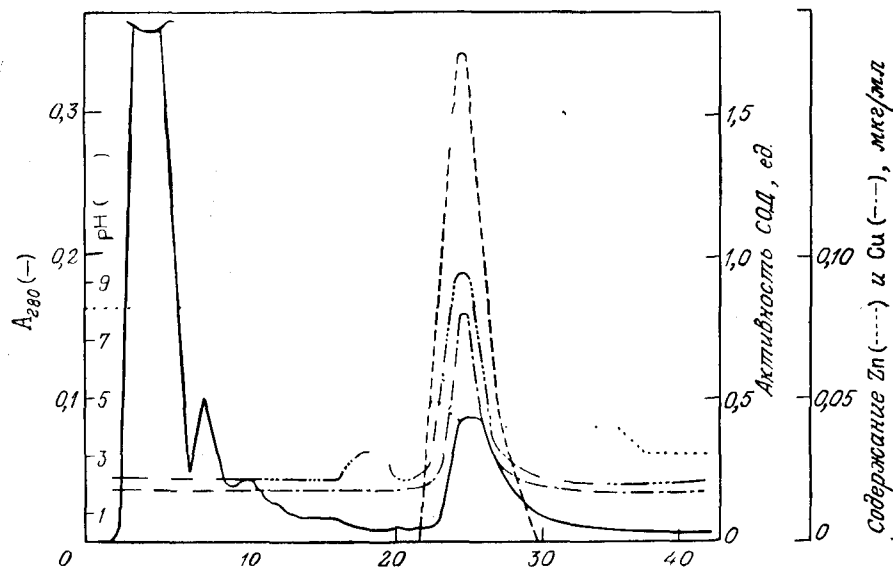


Рис. 4.9. Аффинная хроматография супероксиддисмутазы на хелатах металлов меди и цинка на сефарозе 4В, активированной иминодиацетатом меди(II). Элюент: 0,05 М трис-ацетат, pH 8,2 в 0,5 М растворе хлорида натрия, ступенчатый градиент pH 5,0, 4,0 и 3,0 в этом же буферном растворе. Колонка размером 20×1 см. Расход элюента 1 мл/мин.

3. Прочность удерживания молекулы белка гелем IDA—Cu²⁺ возрастает с увеличением числа экспонированных остатков гистидина.
4. Присутствие остатка триптофана на поверхности молекулы белка может быть распознано с помощью геля IDA—Cu²⁺, однако для удерживания белка может потребоваться несколько остатков триптофана.
5. Удержание белка гелями IDA—Zn²⁺ и IDA—Co²⁺ предполагает наличие двух соседних остатков гистидина.

В табл. 4.1 приведены данные об успешном использовании ЛОХ для селективного выделения индивидуальных белков. Следует отметить, что в этом направлении было опробовано

Таблица 4.1. Разделение белков аффинной хроматографией на хелатах металлов

Сорбент	Ион металла	Белок	Литература
а	Zn, Cu	Белки сыворотки крови человека	[57]
Трис-акрил-IDA	Cu	Глобулины плазмы крови человека	[61]
а,б	Ni, Fe	Белки сыворотки крови человека	[75]
б	Tl	Белки сыворотки крови	[76]
а	Cu	Zn- и Cu-пероксиддисмутаза	[58]
а	Cu	Металлотионеины	[58]
TSK-IDA	Cu	Экзонуклеаза А5	[62]
а	Co, Ni	Интерфероны HuIFN-α, HuIFN-β, HuIFN-γ	[64]
а	Cu	Хомячковый интерферон	[80, 81]
а	Zn	Интерферон из фибробластов человека	[82, 83]
а	Cu	Интерферон из лейкоцитов человека	[84]
а	Cu	Белки гранулоцитов	[85]
а	Zn	Активатор плазминогенов	[86]
а	Cu	Лактоферрин	[58, 63, 87]
а	Cu	Альбумин из необработанного экстракта Коха	[88]
а	Fe	Аналоги энкефалина	[89]
а	Cd	Cd-связывающий белок	[90]
а	Zn	Фактор XII свертывания крови человека	[91]
а	Zn	Фибриноген человека	[92]
а	Zn, Cu	Нуклеозиддифосфатаза печени крысы	[93]
а	Zn	Ингибитор интер-α-трипсина человека	[94]
а	Cu	Ингибитор тиолпротеиназы	[95]
а	Zn	Плазматический α ₂ -макроглобулин и ингибитор α ₁ -протеиназы	[96, 97]
а	Zn	Ингибитор металлопротеиназы	[98]
а	Zn	Металлопротеиназа костей кролика	[99]
а	Zn	Фосфотирозил-протеинфосфатаза	[100]
а	Zn	Нитратредуктаза	[103]
а	Cu	Глутатионредуктаза, липоамиддегидрогеназа	[103]
а	Zn	α ₂ -SH-Гликопротеин плазмы человека	[101]
а	Zn	Эпидермальные протеиназы	[103]

Продолжение

Сорбент	Ион металла	Белок	Литература
^a	Ni, Zn	«Эмбрионин», бычий α_2 -макроглобулин	[104]
^a		Стимулирующий фактор РНК-полимеразы	[105]
^a	Co	Нейтральная α -L-маннозидаза мозга	[106]
^a	Ca	Лектин семян	[107]
^{a, б}	Cd	Сывороточный α_2 -макроглобулин человека, гемопексин	[108]
^в	Al	Гистоны	[109]
^в	Hg	Калотропоин FI	[110]

^a Активированная 1,4-бис(2,3-эпоксипропокси)бутаном агароза, связанная с иминодиацетатом (IDA-гель) [57].

^б Активированная эпихлоргидрином агароза, связанная с этилендиамином, а затем алкилированная бромацетатом (TED-гель) [75].

^в Сульфированная полистирольная смола амберлит IR-120.

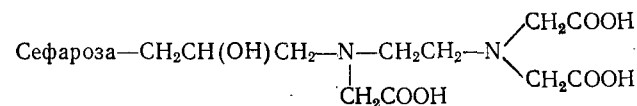
много ионов металлов, но до последнего времени сделаны лишь единичные попытки исследовать лигандообменные сорбенты, отличающиеся от тех, которые были первоначально предложены Поратом [57].

Наконец, следует упомянуть специальный метод, названный «аффинной хроматографией на лабильных лигандах». Этот метод был предложен Нексом [66] для того, чтобы преодолеть необратимую сорбцию ряда специфических белков к кобаламину, который использовался в качестве привитого к матрице хелата. Вместо ковалентной иммобилизации этого хелата гидроксокобаламин (или цианокобаламин) предварительно координируют с матрицей сефарозы, содержащей первичные аминогруппы. Белки, специфически связывающиеся с кобаламином, селективно сорбируются при 4°C на полученной неподвижной фазе. Эти белки затем выделяют снова в форме комплексов с кобаламином путем повышения температуры колонки до 37°C, при которой происходит диссоциация координационных связей кобаламина. Аналогичным образом были селективно сорбированы и выделены ряд транскобаламинов [66—72], гаптокоррин [73], внутренние факторы [72, 74].

В связи с этим может возникнуть вопрос, что общего между методом «аффинной хроматографии на хелатах металлов» и «аффинной хроматографии на лабильных лигандах». Оба метода объединяет то, что комплексообразующие ионы металла

ответственны за взаимодействие между неподвижной фазой и разделяемыми веществами, которое реализуется с помощью разнолигандного сорбционного комплекса. В аффинной хроматографии на хелатах металлов центральный ион металла остается связанным с матрицей через фиксированный лиганд как до, так и после взаимодействия с разделяемыми соединениями. В отличие от этого в методе аффинной хроматографии на лабильных лигандах в ходе сорбции образуется одна координационная связь, но во время десорбции разрывается другая координационная связь, так что центральный ион металла вместе с дополнительным «лабильным» лигандом изменяет свою локализацию, переходя из неподвижной фазы к лабильному лиганду. Очевидно, что оба метода следует отнести к лигандообменной хроматографии. В связи с этим недавнее предложение Пората и Олина [75] объединить термины «аффинная хроматография на хелатах металлов» и «лигандообменная хроматография» новым общим термином «аффинная хроматография на иммобилизованных ионах металла» необоснованно, поскольку локализация комплексообразующих ионов металла в неподвижной фазе не является обязательным условием для многих вариантов лигандообменной хроматографии.

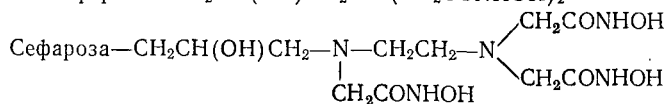
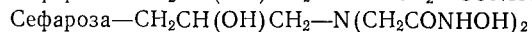
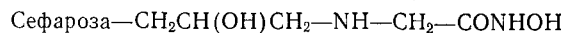
Помимо вопросов терминологии, статья Пората и Олина [75] заслуживает внимания еще и потому, что она подводит итог экспериментам в области хроматографии белков с использованием координационного взаимодействия за последние 10 лет и намечает перспективы ее дальнейшего развития. Кроме того, в статье явно показано основное преимущество фракционирования белков в зависимости от их координационных свойств, которое заключается в исключительно высокой селективности этого метода. Так, например, при хроматографировании всего набора белков сыворотки человека на двух соединенных последовательно колонках с иминодиацетат-сефарозой 6В, заряженной соответственно никелем (II) и железом (III), отдельные белки удерживаются соответствующими колонками с высокой селективностью независимо от последовательности соединения колонок. Более того, оказалось, что ионами никеля (II) и железа (III) в сочетании с одними и теми же матрицами на основе сефарозы 6В, но содержащими трис(карбоксиметил)этилендиаминовые лиганды (ТЭД-гель):



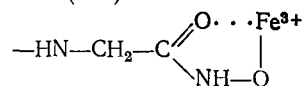
сорбируются совершенно иные белки. Будучи потенциально пентадентатными лигандами ТЭД, в отличие от тридентатных

иминодиацетатных групп имеют иные возможности для удерживания донорных функциональных групп белков по сравнению с IDA-хелатами октаэдрических ионов металлов. Так, например, иммуноглобулины сорбируются насадкой никель(II)—IDA, тогда как гемопексин полностью сорбируется на колонках, заполненных никель(II)—ТЭД [75]. Из металлов подгруппы IIIа периодической таблицы (Al³⁺, Ga³⁺, In³⁺, Tl³⁺), исследованных в сочетании с ТЭД-гелем, только у Tl³⁺ была обнаружена способность к координации с белками [76]. Как было показано, система сефароза 6В—ТЭД—Tl³⁺ во многих отношениях ведет себя подобно соответствующим колонкам, заряженным никелем(II), но не полностью идентично им. Было также исследовано [75] влияние на удерживание белков указанными хелатами металлов типа и концентрации неорганических солей в подвижной фазе, добавок органических растворителей, детергентов или мочевины к подвижной фазе и, наконец, величины рН. Результаты показывают широкие возможности селективного элюирования индивидуальных компонентов первоначально сорбированных смесей белков. Таким образом, получение новых типов привитых лигандов и разработка новых методов элюирования могут оказаться самыми многообещающими направлениями дальнейшего развития описываемого метода.

Относительно недавно были разработаны [77—79] новые типы хелатообразующих сорбентов на основе сефарозы 6В с функциональными группами α -аминогидроксамовой кислоты:



Гидроксамовые кислоты, как известно, образуют стабильные хелаты* с ионами железа (III):



Моно-, бис- и трис(гидроксамовые) группировки в составе сорбентов на основе сефарозы, заряженные ионами железа(III), в основном обладают свойствами слабых катионообменников. Тем не менее разделение белков сыворотки на этих сорбентах

* Некоторые авторы [77, 78] предполагают дополнительную координацию α -аминогрупп с тем же самым ионом металла, что невозможно по стерическим причинам, поскольку в присутствии углеродного атома карбонильной группы в sp^2 -гибризованном состоянии три заместителя должны располагаться в одной плоскости.

происходит иначе, чем на ионообменниках без металла. Следует отметить высокое сродство функциональных групп Fe³⁺—гидроксамат к аспарагиновой и глутаминовой аминокислотам и в особенности к цистеину [78, 79].

Другим перспективным направлением развития аффинной хроматографии на хелатах металлов должен стать анализ смесей белков с помощью высокоэффективной лигандообменной хроматографии.

Литература

1. Siegel A., Degens E. T., Concentration of dissolved amino acids from saline waters by ligand exchange chromatography, *Science*, **151**, 1098 (1966).
2. Grasbeck R., Karlsson R., Continuous microdetermination of protein with a Sephadex copper detector column, *Acta Chem. Scand.*, **17**, 1 (1963).
3. Fazakerley S., Best D. R., Separation of amino acids, as copper chelates, from amino acid, protein, and peptide mixtures, *Anal. Biochem.*, **12**, 290 (1965).
4. Rothenbühler E., Waibel R., Solms J., An improved method for the separation of peptides and α -amino acids on copper Sephadex, *Anal. Biochem.*, **97**, 367 (1979).
5. Buist N. R. M., O'Brien D., The separation of peptides from amino acids in urine by ligand exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **29**, 398 (1967).
6. Bellinger J. F., Buist N. R. M., The separation of peptides from amino acids by ligand exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **87**, 513 (1973).
7. Boisseau J., Jouan P., Separation des oligopeptides et des acides amines par chromatographie sur resin échangeuse d'ions, Chelex-X-100, *J. Chromatogr.*, **54**, 231 (1971).
8. Boisseau J., Jouan P., Separation des oligopeptides et des acides amines par chromatographie par échange de coordonnées, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1973, 153.
9. Maurer R., Separation of enkephalin degradation products by ligand exchange chromatography, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **2**, 183 (1980).
10. Hemmasi B., Ligand exchange chromatography of amino acids on nickel-Chelex 100, *J. Chromatogr.*, **104**, 367 (1975).
11. Hemmasi B., Bayer E., Ligand exchange chromatography of amino acids on copper-, cobalt-, and zinc-Chelex 100, *J. Chromatogr.*, **109**, 43 (1975).
12. Hemdan E. S., Porath J., Development of immobilized metal affinity chromatography. I. Comparison of two iminodiacetate gels, *J. Chromatogr.*, **323**, 247 (1985).
13. Hemdan E. S., Porath J., Development of immobilized metal affinity chromatography. II. Interaction of amino acids with immobilized nickel iminodiacetate, *J. Chromatogr.*, **323**, 255 (1985).
14. Hemdan E. S., Porath J., Development of immobilized metal affinity chromatography. III. Interaction of oligopeptides with immobilized nickel iminodiacetate, *J. Chromatogr.*, **323**, 265 (1985).
15. Antonelli M. L., Bucci R., Carunchio V., An application of the ligand exchange chromatography to the analysis of some protein components, *J. Liq. Chromatogr.*, **3**, 885 (1980).
16. Tommel D. K. J., Vliegthart J. F. G., Penders T. J., Arens J. F., A method for the separation of peptides and α -amino acids, *Biochem. J.*, **99**, 48P (1966).
17. Tommel D. K. J., Vliegthart J. F. G., Penders T. J., Arens J. F., A method for the separation of peptides and α -amino acids, *Biochem. J.*, **107**, 335 (1968).

18. *Niederwieser A., Curtius H. C.*, Separation of peptides and amino acids in urine, *J. Chromatogr.*, **51**, 491 (1970).
19. *Lutz W., Markiewicz K., Klyszejko-Stefanowicz L.*, Oligopeptides excreted in the urine of healthy humans and of patients with nephrotic syndrome, *Clin. Chim. Acta*, **39**, 425 (1972).
20. *Sampson B., Barlow B., Wilkinson A. W.*, Metabolism of 1-¹⁴C-labeled glycyl dipeptides in mice, *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 684 (1975).
21. *Lutz W., Markiewicz K., Klyszejko-Stefanowicz L.*, Oligopeptides in blood plasma of healthy human and of patients with nephrotic syndrome, *Clin. Chim. Acta*, **39**, 319 (1972).
22. *Polzhoffer K. P., Ney K. H.*, Isolierung von Peptiden aus Cheddar-Käse. Trennung von Aminosäure/Peptide-Copper(II)-Komplexen an Sephadex QAE, *Tetrahedron*, **28**, 1721, (1972).
23. *Clapperton J. F.*, Simple peptides of wort and beer, *J. Inst. Brew. London*, **77**, 177 (1971).
24. *Sampson B., Barlow G. B.*, Separation of peptides and amino acids by ion exchange chromatography of their copper complexes, *J. Chromatogr.*, **183**, 9 (1980).
25. *Arikawa Y., Tochida K.*, Multipurpose liquid chromatography, *Hitachi Rev.*, **16**, 236 (1967); *C. A.* **69**, 16008u (1968).
26. *Arikawa Y.*, Automatic liquid chromatography and chromatograph, англ. пат. 1173996, 1967; *C. A.*, **72**, 45513X (1970).
27. *Wagner F. W., Shepherd S. L.*, Ligand exchange amino acid analysis — resolution of some amino sugars and cysteine derivatives, *Anal. Biochem.*, **41**, 314 (1971).
28. *Wagner F. W., Liliedahl R. L.*, A rapid method for the quantitative analysis of α -aminobutyric acid in hypothalamus homogenates by ligand exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **71**, 567 (1972).
29. *Maeda M., Tsuji A., Ganno S., Onishi Y.*, Fluorophotometric assay of amino acids by using automated ligand exchange chromatography and pyridoxal zinc(II) reagent, *J. Chromatogr.*, **77**, 434 (1973).
30. *Shaw D. S., West C. E.*, The isolation of methionine and ethionine by silver ligand chromatography and application to methionine containing peptides, *J. Chromatogr.*, **200**, 185 (1980).
31. *Hering R., Heilmann K.*, Die trennung von Aminosäuren an Schwermetallformen des Sarkosin-Harztes durch Wasserelution, *J. Prakt. Chem.*, **4**, Reihe, **32**, 59 (1966).
32. *Синявский В. Г., Дзюбенко А. В.* Разделение нейтральных аминокислот на хелатирующем катионообменнике с иминодиацетатными функциональными группами при получении и анализе биологических препаратов. В сб.: Рефераты статей, — Рига: ВНИИТЭХИМ, 1977, с. 21.
33. *Muzzarelli R. A. A., Tanfani F., Muzzarelli M. G., Scarpini G., Rocchetti R.*, Ligand exchange chromatography of amino acids on copper loaded chitosan, *Sep. Sci. Technol.*, **13**, 869 (1978).
34. *Antonelli M. L., Marino A., Massina A., Petronio B. M.*, A proposal for the application of ligand exchange chromatography on thin layers, *Chromatographia*, **13**, 167 (1980).
35. *Doury-Berthod M., Poitrenaud C., Trémillon B.*, Ligand exchange separations of amino acids. I. Distribution equilibria of some amino acids between ammoniacal copper(II) nitrate solutions and phosphonic, carboxylic, and iminodiacetic ion exchangers in the copper(II) form, *J. Chromatogr.*, **131**, 73 (1977).
36. *Doury-Berthod M., Poitrenaud C., Trémillon B.*, Ligand exchange separation of amino acids. II. Influence of the eluent composition and of the nature of the ion exchanger, *J. Chromatogr.*, **179**, 37 (1979).
37. *Navratil J. D., Murgia E., Walton H. F.*, Ligand exchange chromatography of amino sugars, *Anal. Chem.*, **47**, 122 (1975).
38. *Sacco D., Dellacherie E.*, Ligand exchange chromatography of cephalosporin C on polystyrene resins containing copper complexes of lysine derivatives, *J. Liquid Chromatogr.*, **6**, 2543 (1983).
39. *Caude M., Foucault A.*, Ligand exchange chromatography of amino acids on copper(II) modified silica gel with ultraviolet spectrophotometric detection at 210 nanometers, *Anal. Chem.*, **51**, 459 (1979).
40. *Schmidt E., Foucault A., Caude M., Rosset R.*, Chromatographie d'échange de ligandes sur silice chargée en cuivre(II) — application a la separation d'acides amines, *Analysis*, **7**, 366 (1979).
41. *Foucault A., Caude M., Oliveros L.*, Ligand exchange chromatography of the enantiomeric amino acids on copper-loaded chiral bonded silica gel and of amino acids on copper(II) modified silica gel, *J. Chromatogr.*, **185**, 345 (1979).
42. *Guyon F., Foucault A., Caude M.*, Ligand exchange chromatography of small peptides on copper(II) modified silica gel — application to the study of the enzymatic degradation of methionine-enkephalin, *J. Chromatogr.*, **186**, 677 (1979).
43. *Guyon A., Roques B. P., Guyon F., Foucault A., Perdrisot R., Swerts J.-P., Schwartz J.-C.*, Enkephalin degradation in mouse brain studied by a new H.P.L.C. method: further evidence for the involvement of carboxypeptidase, *Life Sci.*, **25**, 1605 (1979).
44. *Caude M., Foucault A.*, Ligand exchange chromatography of amino acids, *Spectra Phys. Chromatogr. Rev.*, **6**(2), 4 (1980).
45. *Jennings E. C., Jr.*, Surface activity of silica as measured by a copper complex, 8th Int. Symp. Column Liquid Chromatography, May 20 to 25, 1984, New York, 2p-30.
46. *Foucault A., Rosset R.*, Ligand exchange chromatography on copper(II) modified silica gel — improvements and use for screening of protein hydrolyzate and quantitation of dipeptides and amino acid fractions, *J. Chromatogr.*, **317**, 41 (1984).
47. *Guyon F., Chardonnet L., Caude M., Rosset R.*, Study of silica gel and copper silicate gel solubilities in high performance liquid chromatography, *Chromatographia*, **20**, 30 (1985).
48. *Masters R. G., Leyden D. E.*, Ligand exchange chromatography of amino sugars and amino acids on copper loaded silylated controlled-pore glass, *Anal. Chim. Acta*, **98**, 9 (1978).
49. *Gimpel M., Unger K.*, Hydrolytically stable chemically bonded silica supports with metal complexing ligands — synthesis, characterization and use in high-performance ligand exchange chromatography (HPLEC), *Chromatographia*, **16**, 117 (1982).
50. *Dua V. K., Bush C. A.*, High-performance liquid chromatographic separation of amino sugars and peptides with metal ion modified mobile phases, *J. Chromatogr.*, **244**, 128 (1982).
51. *Cooke N. H. C., Viaoattene R. L., Ekstein R., Wong W. S., Davies G., Karger B. L.*, Use of metal ions for selective separations in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **149**, 391 (1978).
52. *Roumeliotis P.*, Complete analysis of native α -amino acid mixtures by means of ligand exchange column liquid chromatography, in 7th Int. Symp. on Column Liquid Chromatography, Baden-Baden, West Germany, **45**, 1983.
53. *Sugden K., Hunter C., Lloyd-Jones J. G.*, Separation of the diastereomers of pyroglutamyl-histidyl-3,3-dimethylprolineamide by ligand exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **204**, 195 (1981).
54. *Hunter C., Sugden K., Lloyd-Jones J. C.*, HPLC of peptides and peptide diastereomers on ODS- and cyanopropyl-silica gel column packing materials, *J. Liquid Chromatogr.*, **3**, 1335 (1980).
55. *Grushka E., Levin S., Gilon C.*, Separation of amino acids on reversed phase columns as their copper(II) complexes, *J. Chromatogr.*, **235**, 401 (1982).

56. *Grushka E., Atamna J., Gilon C., Chorly M.*, Liquid chromatographic separation and detection of N-methyl amino acids using mobile phases containing copper(II) ions, *J. Chromatogr.*, **281**, 125 (1983).
57. *Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.*, Metal chelate affinity chromatography — a new approach to protein fractionation, *Nature (London)*, **258**, 598 (1975).
58. *Lönnerdal B., Keen C. L.*, Metal chelate affinity chromatography of proteins, *J. Appl. Biochem.*, **4**, 203 (1982).
59. *Davankov V. A.*, Review of ligand exchange chromatography, in *Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, Vol. 1, Hancock W. S. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla., 1984, p. 393.
60. *Gozdzicka-Josefiak A., Augustyniak J.*, Preparation of chelating exchangers with a polysaccharide network and low cross-linkage, *J. Chromatogr.*, **131**, 91 (1977).
61. *Moroux Y., Boschetti E., Egly J. M.*, Preparation of metal-chelating trisacryl gels for chromatographic applications, *Sci. Tools*, **32**(1), 1 (1985).
62. *Варламов В. П., Лопатин С. А., Рогожин С. В.*, Лигандообменная хроматография ферментов. I. Синтез хелатирующих сорбентов и очистка эгзонуклеазы A5 от актиномицинов. *Биорг. химия*, **10**, 927 (1984).
63. *Fanou Aji L., Vijayalakshmi M.*, Metal-chelate affinity chromatography as a separation tool, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **413**, 300 (1983).
64. *Sulkowski E., Vastola K., Oleszek D., Von Muenchhausen W.*, Surface topography of interferons — a probe by metal chelate chromatography, in *Affinity Chromatography and Related Techniques*, Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F. (eds.), Elsevier, Amsterdam, 1982, p. 313.
65. *Sulkowski E.*, Purification of Proteins by IMAC, *Trends Biotechnol.*, **3**, 1 (1985).
66. *Nexo E.*, A new principle in biospecific affinity chromatography used for purification of cobalamin-binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 189 (1975).
67. *Nexo E.*, Purification of rabbit transcobalamin II by labile ligand affinity chromatography, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **55**, 923 (1977).
68. *Nexo E., Olesen H., Bucher D., Thomsen J.*, Purification and characterization of rabbit transcobalamin, II, *Biochim. Biophys. Acta*, **494**, 395 (1977).
69. *Nexo E.*, Transcobalamin I and other human R-binders — purification, structural, spectral, and physiological studies, *Scand. J. Haematol.*, **20**, 221 (1978).
70. *Lindemans J., Van Kapel J., Abels J.*, Purification of human transcobalamin II cyanocobalamin by affinity chromatography using thermolabile immobilization of cyanocobalamin, *Biochim. Biophys. Acta*, **579**, 40 (1979).
71. *Van Kapel J., Loeff B. G., Lindemans J., Abels J.*, An improved method for large scale purification of human holo-transcobalamin II, *Biochim. Biophys. Acta*, **676**, 307 (1981).
72. *Jacobsen D. W., Montejano Y. D., Huennekens F. M.*, Rapid purification of cobalamin-binding proteins using immobilized aminopropylcobalamin, *Anal. Biochem.*, **113**, 164 (1981).
73. *Nexo E., Olesen H.*, Purification and characterization of rabbit haptocorrin, *Biochim. Biophys. Acta*, **667**, 370 (1981).
74. *Bucher D., Thomsen J., Nexo E.*, Amino terminal sequence of hog intrinsic factor, *Comp. Biochem. Physiol.*, **62B**, 175 (1979).
75. *Porath J., Olin B.*, Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions, *Biochemistry*, **22**, 1621 (1983).
76. *Porath J., Olin B., Granstrand B.*, Immobilized-metal affinity chromatography of serum proteins on gel-immobilized group III A metal ions, *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**, 543 (1983).

77. *Ramadan N., Porath J.*, α -Aminoacyl hydroxamate adsorbents — a new type of immobilized chelator, *J. Chromatogr.*, **321**, 81 (1985).
78. *Ramadan N., Porath J.*, Fe³⁺-hydroxamate as immobilized metal affinity-adsorbent for protein chromatography, *J. Chromatogr.*, **321**, 93 (1985).
79. *Ramadan N., Porath J.*, Separation of serum proteins on a Fe³⁺-monohydroxamate adsorbent, *J. Chromatogr.*, **321**, 105 (1985).
80. *Bollin E., Sulkowski E.*, Metal chelate affinity chromatography of hamster interferon, *Arch. Virol.*, **58**, 149 (1978).
81. *Bollin E., Jr.*, Production, partial purification and characterization of syrian hamster interferon, *Methods Enzymol.*, **78**, 178 (1981).
82. *Edy V. G., Billiau A., De Sommer P.*, Purification of human fibroblast interferon by zinc chelate affinity chromatography, *J. Biol. Chem.*, **252**, 5934 (1977).
83. *Heine K. J. W., Billiau A.*, Purification of human fibroblast interferon by adsorption to controlled-pore glass and zinc-chelate chromatography, *Methods Enzymol.*, **78**, 448 (1981).
84. *Berg K., Heron J.*, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified human leucocyte interferon and the antiviral and anticellular activities of the different interferon species, *J. Gen. Virol.*, **50**, 441 (1980).
85. *Torres A. R., Peterson E. A., Evans W. H., Mage M. G., Wilson S. M.*, Fractionation of granule proteins of granulocytes by copper chelate chromatography, *Biochim. Biophys. Acta*, **576**, 385 (1979).
86. *Rijken D. C., Wijngaards G., Zaal-De Jong M., Welbergen J.*, Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue, *Biochim. Biophys. Acta*, **580**, 140 (1979).
87. *Lönnerdal B., Carlsson J., Porath J.*, Isolation of lactoferrin from human milk by metal-chelate affinity chromatography, *FEBS Lett.*, **75**, 89 (1977).
88. *Hansson H., Kagedal L.*, Adsorption and desorption of proteins in metal chelate affinity chromatography. Purification of albumin, *J. Chromatogr.*, **215**, 333 (1981).
89. *Porath J.*, Explorations into the field of charge-transfer adsorption, *J. Chromatogr.*, **159**, 13 (1978).
90. *Khazeli M. B., Mitra R. S.*, Cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accommodation to low levels of this ion, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 46 (1981).
91. *Weerasinghe K., Scully M. F., Kakkar V. V.*, Purification of human clotting factor XII by Zn²⁺ chelate chromatography, *Biochem. Soc. Trans.*, **9**, 336 (1981).
92. *Scully M. F., Kakkar V. V.*, Zn²⁺ chelate chromatography of human fibrinogen, *Biochem. Soc. Trans.*, **9**, 335 (1981).
93. *Ohkubo J., Kondo T., Taniguchi N.*, Purification of nucleoside diphosphates of rat liver by metal-chelate affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta*, **616**, 89 (1980).
94. *Salier J. P., Martin J. P., Lambin P., McPhee H., Hochstrasser K.*, Purification of the human serum inter- α -trypsin inhibitor by zinc chelate and hydrophobic interaction chromatography, *Anal. Biochem.*, **109**, 273 (1980).
95. *Ryley H. C.*, Isolation and partial characterization of a thiol proteinase inhibitor from human plasma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 871 (1979).
96. *Kurecki T., Kress L. F., Laskowski M.*, Purification of human plasma α 2 macroglobulin and α 1 proteinase inhibitor using zinc chelate chromatography, *Anal. Biochem.*, **99**, 415 (1979).
97. *Wunderwald P., Schrenk W. J., Port H., Kresze G.*, Removal of endoproteinases from biological fluids by «sandwich affinity chromatography» with α 2-macroglobulin bound to zinc chelate-sepharose, *J. Appl. Biochem.*, **5**, 31 (1983).
98. *Bunning R. A. D., Murphy G., Kumar S., Phillips P., Reynolds J. J.*, Metallo-

- proteinase inhibitors from bovine cartilage and body fluids, *Eur. J. Biochem.*, **139**, 75 (1984).
99. Galloway W. A., Murphy G., Sandy J. D., Gavrilovic J., Cawston T. E., Reynolds J. J., Purification and characterization of a rabbit bone metalloproteinase that degrades proteoglycan and other connective-tissue components, *Biochem. J.*, **209**, 741 (1983).
 100. Horlein D., Gallis B., Brautigan O. L., Bornstein P., Partial purification and characterization of phosphotyrosyl-protein phosphatase from Ehrlich ascites tumor cells, *Biochemistry*, **21**, 5577 (1982).
 101. Lebreton J. P., Purification of the human plasma α_2 -SH glycoprotein by zinc chelate affinity chromatography, *FEBS Lett.*, **80**, 351 (1977).
 102. Horie N., Fukuyama K., Ito Y., Epstein W. L., Detection and characterization of epidermal proteinases by polyacrylamide gel electrophoresis, *Comp. Biochem. Physiol.*, **77B**, 349 (1984).
 103. Smarrelli J., Campbell W. H., Heavy metal inactivation and chelator stimulation of higher plant nitrate reductase, *Biochim. Biophys. Acta*, **742**, 435 (1983).
 104. Feldman S. R., Gonias S. L., Neg K. A., Pratt S. W., Pizzo S. V., Identification of «embryonin» as bovine α_2 -macroglobulin, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4458 (1984).
 105. Kikuchi H., Watanabe M., Significance of use of amino acids and histamine for the elution of nonhistone proteins in copper-chelate chromatography, *Anal. Biochem.*, **115**, 109 (1981).
 106. Mathur R., Balasubramanian A. S., Cobalt-ion chelate affinity chromatography for the purification of brain neutral α -D-mannosidase and its separation from acid α -D-mannosidase, *Biochem. J.*, **222**, 261 (1984).
 107. Borrebaeck C. A. K., Lonnerdal B., Eitzler M. E., Metal chelate affinity chromatography of the dolichos biflorus seed lectin and its subunits, *FEBS Lett.*, **130**, 194 (1981).
 108. Andersson L., Fractionation of human serum proteins by immobilized metal affinity chromatography, *J. Chromatogr.*, **315**, 167 (1984).
 109. Diwan A. M., Joshi P. N., Fractionation of histones on a metal ion equilibrated cation exchanger. I. Chromatographic profiles on an Amberlite IR-120 (Al^{3+}) column, *J. Chromatogr.*, **173**, 373 (1979).
 110. Abraham K. I., Joshi P. N., Isolation of calotropain FI, *J. Chromatogr.*, **168**, 284 (1979).

РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ

В. А. Даванков

5.1. Введение и основные понятия;
трехточечное взаимодействие

Триумфом лигандообменной хроматографии стало разделение оптических изомеров немодифицированных α -аминокислот, представляющее очень важную, но исключительно трудную проблему.

Оптические изомеры абсолютно идентичны друг другу по своим физическим и химическим свойствам; разница в их пространственных структурах может проявить себя только через взаимодействие с дополнительной хиральной структурой или полем (оптически активным веществом, хиральной поверхностью, циркулярно-поляризованным излучением). Таким образом, как и в любом процессе хирального распознавания и разделения двух энантиомерных структур, хроматографическое разделение двух энантиомерных молекул предполагает наличие специального разделяющего хирального агента, вступающего во взаимодействие с этими энантиомерами.

Чисто геометрическое рассмотрение проблемы однозначно показывает, что два энантиомера можно распознать хиральным расщепляющим агентом только в том случае, когда по меньшей мере три активных центра агента (A, B, C) одновременно взаимодействуют с подходящими активными центрами (A', B' и C') одного из энантиомеров. В этом случае соответствующие центры (A'', C'' и B'') второго энантиомера предстанут в нарушенной последовательности по отношению к тому же хиральному реагенту, как показано на рис. 5.1. Это обуславливает определенную разницу в общей энергии взаимодействия хирального реагента с указанными выше энантиомерами, т. е. энантиоселективность реагента, которая позволяет осуществлять разделение энантиомеров.

Двухточечного взаимодействия хирального агента с энантиомерными структурами в принципе недостаточно для их хирального распознавания (рис. 5.1).

Энантиоселективность хирального расщепляющего агента может быть кинетической или термодинамической природы. Со времени открытий Луи Пастера оба этих типа энантиоселективных процессов успешно используют для практического расщепления рацемических соединений на оптически активные состав-

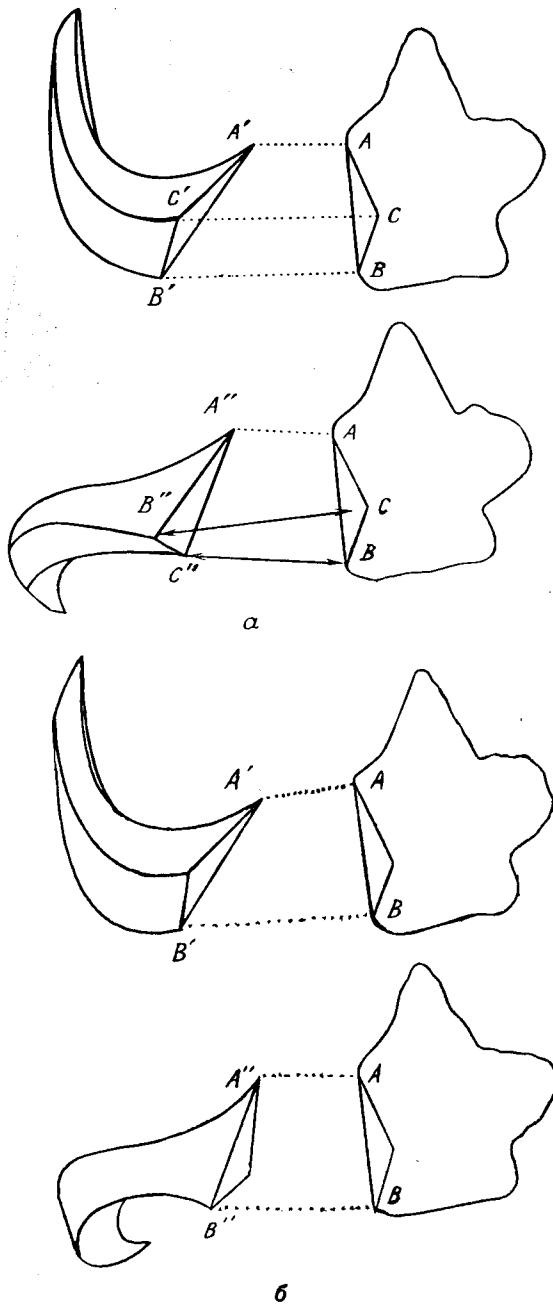


Рис. 5.1. Хиральное распознавание предполагает трехточечное взаимодействие хирального расщепляющего агента с одним из энантимеров (а); двухточечного взаимодействия недостаточно (б) [202].

ляющие. Без превращения в смесь диастереомерных соединений два энантиомера можно разделить с помощью кинетически энантиоселективной катализируемой ферментами реакции или путем термодинамически энантиоселективных кристаллизационных процессов. В этих процессах расщепляющими агентами являются соответственно активный центр ферментного катализатора и элементарная ячейка растущего хирального кристалла.

Для того чтобы достичь существенного разделения энантиомеров в описанных «одноступенчатых» процессах взаимодействия с разделяющими агентами, энантиоселективность последних должна быть очень высокой. Для получения одного из энантиомеров 99%-ной оптической чистоты (т. е. разделения с селективностью $\alpha=100$) разность свободной энергии взаимодействия $\delta\Delta G$ между двумя энантиомерами и расщепляющим агентом должна составлять 11,3 кДж/моль при 25 °С. Только ограниченное число кристаллизующихся систем может проявлять такую высокую селективность. Гораздо чаще химик вынужден повторять кристаллизацию десятки раз, для того чтобы получить более или менее чистый продукт. Ферментные реакции ограничены встречающимися в живой природе органическими соединениями. В то же время с помощью предложенной русским ученым Цветом хроматографии — одного из наиболее мощных методов разделения — можно полностью разделить соединения, свободная энергия взаимодействия которых с неподвижной фазой различается не более чем на 40 Дж/моль (селективность $\alpha=1,01$). В системах с величинами $\delta\Delta G$ порядка 1 кДж/моль ($\alpha=1,5$) легко осуществить препаративное разделение. Успех хроматографического разделения обусловлен тем, что в процессе перемещения энантиомеров вдоль хиральной неподвижной фазы взаимодействие разделяемых энантиомеров с расщепляющим агентом повторяется многократно, причем каждое взаимодействие способствует увеличению расстояния между двумя молекулами энантиомеров.

Хроматография позволяет эффективно использовать огромное число слабых межмолекулярных взаимодействий, характеризующихся относительно низкой энантиоселективностью, и применять один и тот же хиральный расщепляющий агент для разделения целого ряда различных рацемических соединений.

Более того, хроматография обеспечивает еще одно принципиально важное преимущество перед всеми классическими «одноступенчатыми» методами расщепления рацематов. В хроматографическом процессе можно получить количественно и в оптически чистом состоянии оба энантиомера даже в том случае, когда оптическая чистота самого расщепляющего агента не достигает 100%. Это утверждение, сформулированное Даванковым [1—3] в ходе теоретического рассмотрения проблемы,

известно сегодня каждому хроматографисту, но все еще приводит в замешательство многих исследователей в области стереохимии, знающих, что недостаточная оптическая чистота расщепляющего агента обязательно приводит к такому же ухудшению чистоты или снижению выхода разделенных продуктов [4]. Через десять лет Бейтлер и Фейбуш [5] вывели и подтвердили экспериментами следующее соотношение между селективностью разделения энантиомеров α и α^x на хиральных неподвижных фазах оптической чистоты соответственно P и 100%:

$$\alpha^x = \frac{(\alpha + 1)P + (\alpha - 1)100}{(\alpha + 1)P - (\alpha - 1)100}$$

Естественно, лучше использовать хиральный расщепляющий агент высокой оптической чистоты, но единственным теоретическим требованием, необходимым для полного хроматографического разделения, является условие, чтобы $\alpha^x > 1$ и $P > 0$. Практически селективность α , однако, не должна быть меньше 1,01, если число теоретических тарелок в колонке не превышает 10^5 .

В качестве аналитического метода определения энантиомерного состава хирального соединения хроматография выгодно отличается высокой чувствительностью, универсальностью и экспрессностью, а также тем, что результаты анализа не зависят от наличия посторонних примесей в разделяемых соединениях.

В качестве препаративного метода получения оптически чистых соединений хроматография отличается исключительно высокими выходами разделенных энантиомеров и минимальными потерями дорогих хиральных расщепляющих агентов, входящих в состав хиральной неподвижной фазы.

В ряде обзорных статей описываются многочисленные неудачные или частично удачные попытки провести аналитическое или препаративное расщепление рацематов хроматографическими методами [6—21]. Последние семь обзоров, посвященные главным образом лигандообменной хроматографии оптических изомеров, рассматривают в основном достижения последнего десятилетия, особенно плодотворного в развитии теории и практики лигандообменной хроматографии.

Возвращаясь к модели трехточечного взаимодействия, следует подчеркнуть, что она не уточняет природу взаимодействия между соответствующими активными центрами хирального расщепляющего агента и энантиомеров. Любой вид притяжения или отталкивания в смеси диастереомерных аддуктов должен быть продуктивным в плане хирального распознавания. В ЛОХ роль расщепляющего агента играет хиральный лиганд, координированный с ионом переходного металла, причем по меньшей мере одна из его связей с энантиомерами является координаци-

онной. Таким образом, это взаимодействие ведет к образованию разнолигандных комплексов.

Включающие хиральный расщепляющий агент определенной стерической конфигурации и одну из двух энантиомерных молекул два возможных разнолигандных комплекса представляют собой диастереомерные структуры. Эти диастереомерные структуры могут иметь неодинаковую стабильность, если расщепляющий агент благодаря совокупности взаимодействий распознает конфигурацию второго лиганда. Различие в энергии связывания двух энантиомерных молекул с расщепляющим лигандом составляет необходимое условие их разделения. Таким образом, ЛОХ оптических изомеров основана на термодинамической энантиоселективности при образовании кинетически лабильных разнолигандных комплексов.

В зависимости от того, связан ли расщепляющий агент с матрицей сорбента или добавлен в элюент, в литературе описаны два основных варианта ЛОХ. В одном из них используются хиральные сорбенты, в другом — хиральный элюент.

5.2. Хиральные неподвижные фазы

5.2.1. Хиральные полимерные лигандообменники

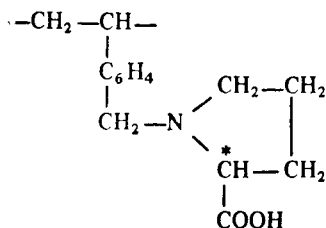
5.2.1.1. Синтез хиральных смол. Первые хиральные лигандообменники, на которых была практически осуществлена ЛОХ энантиомеров, были получены Даванковым и Рогожиным из сшитого хлорметилированного полистирола и природных α -аминокислот. На первый взгляд может показаться несложным сохранение координационной способности как α -аминогрупп, так и карбоксильных функциональных групп исходных хиральных компонентов лигандообменника в процессе простого алкилирования аминогрупп хлорметильными группами полимера. Однако создание удобного метода синтеза потребовало больших усилий, поскольку необходимо было получить смолу с высокой обменной емкостью и хиральными хелатообразующими лигандами строго определенной структуры. Необходимо было исключить возможность рацемизации асимметрического α -углеродного атома.

Прежде всего для введения хлорметильных групп исключительно в *para*-положение фенильных колец сшитого полистирола температура хлорметилирования не должна превышать 25°C [22]. Как было найдено [23], количественное хлорметилирование сополимеров, содержащих от 0,3 до 5% дивинилбензола, в присутствии SnCl_4 в качестве катализатора монохлордиметилэфиром в дихлорэтано при комнатной температуре занимает от 2 до 10 сут соответственно.

Поскольку хлорметилированный полистирол слишком медленно алкилирует аминокислоты в мягких условиях, для начала были синтезированы более реакционноспособные [24] иодметилированный и бромметилированный сополимеры [23, 24]. Позднее был разработан исключительно простой метод получения *n*-бром- и *n*-иодметилированного полистирола [26, 27], который состоял в кипячении хлорметилированного продукта с бромидом лития в смеси ацетона с диоксаном или иодида натрия в ацетоне. Конверсия в последнем случае достигала 75—96% в зависимости от степени сшивки сополимеров и содержания хлора. В синтез лигандообменников было также введено и другое существенное улучшение: было показано, что иодид натрия является превосходным катализатором в реакциях хлорметилированного стирольного полимера с нуклеофильными соединениями в смесях диоксана и метанола (6:1) при 50 °С [24, 28]. В связи с этим не требуется специально превращать хлорметилированные сополимеры в иодметилированные.

Тем не менее прямое взаимодействие активированного иодидом натрия хлорметилированного полистирола с аминокислотами сопровождается нежелательным частичным алкилированием карбоксильной функциональной группы аминокислот. Это происходит потому, что в полярных органических растворителях и воде аминокислоты преимущественно находятся в форме цвиттер-ионов с пассивированными за счет протонирования аминогруппами и активированными за счет депротонирования карбоксильными группами.

Из множества исследованных природных аминокислот только пролин реагирует исключительно по аминогруппе. Лигандообменники с привитым γ -пролином (обменная емкость 2,0—2,8 ммоль/г сухого вещества) стали первыми хиральными сорбентами [29], нашедшими применение в ЛОХ оптических изомеров. Структура повторяющегося звена сорбента приведена ниже:

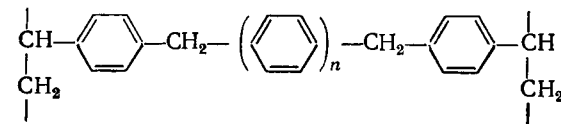


Другие аминокислоты могут легко реагировать с галогенметилированными стирольными сополимерами в форме эфиров или амидов [28]. Эти производные аминокислот обычно доступ-

ны в виде стабильных гидрохлоридов. В присутствии NaHCO_3 гидрохлориды аминоэфиров можно эффективно использовать в реакциях с хлорметилполистиролом [30]. Таким образом, из *n*-хлорметилированного полистирола и гидрохлоридов аминоэфиров, взятых в молярных соотношениях 1,0:1,1, можно получать хиральные смолы с высокой обменной емкостью в очень мягких условиях, практически исключая рацемизацию [2].

Ситуация не так благоприятна при удалении защитных группировок карбоксильных групп в смоле, поскольку гидролиз сложных эфиров требует длительного кипячения в щелочных растворах. Другой проблемой является плохая набухаемость лигандообменных смол в цвиттер-ионной форме или форме хелатов металлов. Напротив, в кислой или щелочной средах слабосшитые смолы набухают слишком сильно, и поэтому изменение pH элюента часто нарушает однородность насадки хроматографических колонок. Только использование «макросетчатых изопористых» полистирольных матриц помогает решить эти две проблемы.

Даванков и сотр. [31] предложили проводить поперечную сшивку линейных полистирольных цепей в растворенном состоянии с помощью различных бифункциональных соединений. Поскольку при этом подходе сшивающие агенты в начале реакции равномерно распределены по всему раствору полимера, сшивающие мостики в синтезируемой трехмерной сетке также распределены равномерно. Полученная таким образом структура относится к изопористому типу. Взаимодействие 4,4'-бис(хлорметилдифенила) (ХМДФ) или *n*-ксилилендихлорида (КДХ) с полистиролом по реакции Фриделя—Крафтса приводит к образованию сшивающих мостиков между двумя цепями, которые на два фенильных кольца длиннее, чем исходные сшивающие агенты:



В качестве сшивающего агента можно также аналогичным образом использовать строго определенное количество монохлордиметилового эфира (МХДЭ). Во всех случаях размеры сшивающих мостиков существенно превосходят размеры дивинилбензола (ДВБ) — стандартного сшивающего агента для стирольных мономеров. Таким образом, описанные гели справедливо отнести к макросетчатым структурам.

Для получения макросетчатой изопористой матрицы в форме однородных гранул необходимо использовать гранулированный сополимер стирола с незначительным количеством ДВБ

(0,3—2,0%) в максимально набухшем состоянии. Поперечную сшивку удобно проводить в кипящем дихлорэтано с последующим хлорметилированием в том же самом реакционном сосуде при комнатной температуре после добавления необходимого количества МХДЭ и хлорида олова (IV).

Из всех специфических свойств макросетчатых изопористых сополимеров стирола, детально описанных в обзорах Даванкова и сотр. [32—34], к наиболее важным для ЛОХ следует отнести высокую набухаемость этих трехмерных сеток [35—39]. Замечательной особенностью сильносшитых (сверхсшитых) полистирольных гелей является способность сохранять пространственную структуру и большой объем, в котором была образована и зафиксирована их жесткая сетка. В отличие от обычных сополимеров стирола и ДВБ сверхсшитый полистирол способен набухать не только в растворителях, таких, как, например, толуол, но и в жидкостях, которые не растворяют линейный полистирол — метаноле, гексане, воде и т. п.

Эта тенденция заметно улучшает характеристики набухаемости хиральных сорбентов, приготовленных на основе макросетчатых изопористых сополимеров стирола. Повышение их проницаемости становится очевидным уже из того факта, что гидролиз сложноэфирных групп в продуктах реакции эфиров аминокислот с хлорметилированным макросетчатым изопористым полистиролом стал возможен уже при комнатной температуре. Это позволяет получать широкий спектр хиральных лигандообменников с различными привитыми аминокислотами. Кроме того, благодаря сравнительно высокой степени поперечной сшивки получаемые насадки механически устойчивы и в минимальной степени изменяют свой объем при изменении рН элюента (табл. 5.1), что делает очень удобным их использование в колоночной хроматографии. Данные табл. 5.1 ценны еще и тем, что опровергают установившееся мнение, будто увеличение степени поперечной сшивки сополимера должно уменьшать их способность к набуханию. Очевидно, что дополнительная поперечная сшивка сильно набухших сополимеров, как это происходит при получении макросетчатой изопористой матрицы полистирола, приводит к противоположному эффекту [39].

В табл. 5.2 представлены данные о хиральных лигандообменниках, синтезированных и изученных в условиях ЛОХ Даванковым и сотр. [40]. В большинстве случаев метиловые эфиры аминокислот вводили в катализируемую иодидом натрия реакцию с хлорметилированными макросетчатыми изопористыми сополимерами стирола. Валин и изолейцин (2 и 3) брали в форме трет-бутиловых сложных эфиров, гидролиз которых проводили кипячением в смеси диоксана и 20%-ной соляной кислоты [41].

Ряд трудностей возник в случае трифункциональных аминокислот. Например, диметилглутамат при гидролизе сложноэфирных групп в полимере с помощью щелочи циклизуется. Образующийся остаток пироглутаминовой кислоты (11) представляет собой монодентатный лиганд, не способный образовывать хелат с ионами металла; к сожалению, его нельзя вновь превратить в остаток глутамата [42]. Сходная реакция циклизации протекает с метиловым эфиром 2,4-диаминомасляной кислоты, приво-

Таблица 5.1. Увеличение набухаемости хиральных лигандообменников при дополнительной сшивке их полистирольных матриц [39]

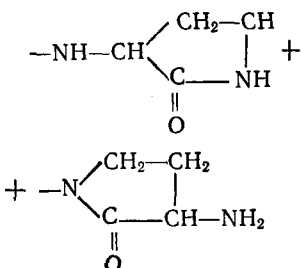
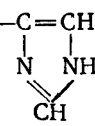



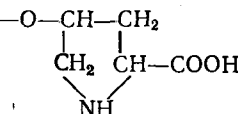
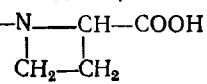
Фиксированный лиганд	Степень сшивки матрицы	Обменная емкость, ммоль/г	Поглощение растворителя, г/г				
			вода	0,5 н. HCl	0,5 н. KOH	диоксан	метанол
$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{—COOH} \end{array}$	0,8% ДВБ	2,4	0,16	0,40	0,41	0,42	0,31
	0,8% ДВБ	2,1	1,39	1,55	1,66	1,10	1,05
	5% ХМДФ ⁺						
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—N—C—CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH—CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	0,8% ДВБ	1,6	0,19	0,27	0,46	0,70	0,40
	0,8% ДВБ	2,0	0,95	1,32	1,45	1,00	0,83
	5% ХМДФ ⁺						

дя к образованию смеси структур с двумя типами лигандов (12). Однако в этом случае удастся провести кислотный гидролиз циклических амидных связей с образованием линейных тридентатных привитых к полимеру лигандов (13) [43].

Как карбоксильную, так и α-аминогруппу лизина можно эффективно защитить путем комплексообразования с ионами меди (II), что дает возможность селективно алкилировать ε-аминогруппы [44]. Комплекс Cu(Lys)₂ растворим только в воде, поэтому для алкилирования комплекса вместо хлорметилированного сополимера используют продукт его взаимодействия с диметилсульфидом [45]. Медные комплексы 2,4-диаминомасляной кислоты инертны в этой реакции, а комплексы меди с орнитино реагируют очень медленно. Очевидно, что γ-аминогруппы в 2,4-диаминомасляной кислоте блокированы ионами меди, в то время как δ-аминогруппы орнитина хелатированы только частично [44].

Таблица 5.2. Хиральные хелатообразующие макросетчатые изопористые полистирольные смолы с привитыми α -аминокислотами

№	Фиксированный лиганд	Литература	Емкость, ммоль/г	Набухаемость, вес. %			
				вода	0,5 н. HCl	0,5 н. KOH	Этанол
1	Аланин —NHCH(COOH)CH ₃	[30]	2,2	89	102	122	108
2	Валин —NHCH(COOH)CH(CH ₃) ₂	[41]	2,3	84	118	156	117
3	Изолейцин —NHCH(COOH)CHCH ₃ C ₂ H ₅	[41]	2,5	54	82	132	101
4	Пролин $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	[40]	2,3	88	135	130	98
5	Серин —NHCH(COOH)CH ₂ OH	[30]	3,0	93	108	127	91
6	Треонин	[30]	2,9	94	109	149	113
7	—NHCH(COOH)CH(OH)CH ₃ Гидроксипролин	[30]	2,2	81	88	109	76
8	—NHCH(COOH)CH ₂ C ₆ H ₄ OH Гидроксипролин $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{OH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	[30]	3,0	136	165	211	76
9	Аллогидроксипролин $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{OH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	[40]	3,2	149	170	210	84
10	Аспарагиновая кислота —NHCH(COOH)CH ₂ COOH	[42]	2,5	139	155	166	94
11	Пироглутаминовая кислота $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C}-\text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	[42]	2,2	95	151	132	80

№	Фиксированный лиганд	Литература	Емкость, ммоль/г	Набухаемость, вес. %			
				вода	0,5 н. HCl	0,5 н. KOH	Этанол
12	Диаминомасляная кислота (цикл.) 	[43]	2,3	83	97	83	73
13	Диаминомасляная кислота $-\text{NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 +$ $+ -\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	[43]	2,2	143	112	156	76
14	Лизин $-\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	[44]	1,7	120	130	127	102
15	Гистидин 	[46]	2,0	110	131	122	92
16	Метионин $-\text{NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$	[47]	2,1	100	105	129	82
17	Метионин-(d, l)-сульфоксид $-\text{NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 	[56]	2,1	131	133	160	92
18	Метионин-(d)-сульфоксид $-\text{NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 	[57]	2,2	85	—	—	—
19	Метионин-(l)-сульфоксид $-\text{NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 	[57]	2,2	80	—	—	—
20	Цистеин $-\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	[45]	2,3	98	90	114	34
21	Цистеиновая кислота $-\text{NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	[49]	1,2	112	108	127	105
22	О-Гидроксипролин 	[40]	1,0	17	20	19	53
23	Азетидинкарбоновая кислота 	[58]	2,4 ^a	140	—	—	—

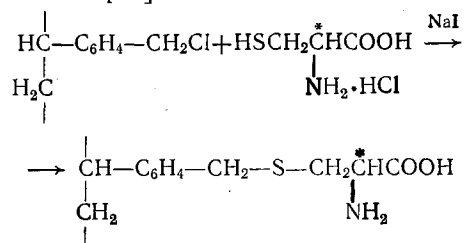
№	Фиксированный лиганд	Литература	Емкость ммоль/г	Набухаемость, вес. %			
				Вода	0,5 н. HCl	0,5 н. KOH	Этанол
24	Фенилаланин —NHCH(COOH)CH ₂ C ₆ H ₅	[50]	2,1 ^a	51	53	59	32
25	Арилфенилаланин —C ₆ H ₄ —CH ₂ CH(NH ₂)COOH	[50]	1,1 ^a	95 ^b	100	110	55
26	N-Карбоксиметилвалин	[59]	1,5	100	83	120	112
27	N-Карбоксиметиласпарагиновая кислота —N(CH ₂ COOH)CH(COOH)CH ₂ COOH	[59]	1,2	44	28	62	68
28	S-(2-Аминоэтил)цистеин —NHCH(COOH)CH ₂ SCH ₂ CH ₂ NH ₂	[51]	1,8 ^a	240	240	270	230
29	S-Карбоксиметилцистеин —NHCH(COOH)CH ₂ SCH ₂ COOH	[51]	1,6 ^a	82	94	86	58
30	S,S'-Этиленбисцистеин $\begin{array}{c} \text{COOH} \quad \text{HOOC} \\ \quad \quad \\ \text{—NHCH} \quad \quad \text{CHNH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2 \end{array}$	[51]	1,1 ^a	55	65	75	67
31	N,N'-Этиленбисметионин $\begin{array}{c} \text{—N—CH}_2\text{CH}_2\text{—NH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH} \quad \quad \text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{HOOC} \quad \quad \text{COOH} \end{array}$	[51]	0,9 ^a	53	58	59	46
32	α-Аминобензилфосфоновая кислота —NHCH(C ₆ H ₅)P(O)(OH) ₂	[52]	2,0 ^b	57	56	129	50
33	Моноэтиловый эфир α-аминобензилфосфоновой кислоты —NHCH(C ₆ H ₅)P(O)(OH)OC ₂ H ₅	[52]	2,2 ^b	67	54	101	65
34	α-Амино-α-метилбензилфосфоновая кислота —NHC(CH ₃)(C ₆ H ₅)P(O)(OH) ₂	[53]	0,9	45	48	45	46
35	α-Амино-α-метилпропилфосфоновая кислота —NHC(CH ₃)(C ₂ H ₅)P(O)(OH) ₂	[53]	0,6	42	41	45	47
36	α-Амино-α-метилпентилфосфоновая кислота —NHC(CH ₃)(C ₄ H ₉)P(O)(OH) ₂	[53]	0,8	64	60	52	65
37	Моноэтиловый эфир α-амино-α-метилпентилфосфоновой кислоты —NHC(CH ₃)(C ₄ H ₉)P(O)(OH)(OC ₂ H ₅)	[53]	1,3	45	48	52	61

^a Степень сшивки 10% (моноклордиэтиловый эфир).

^b Смолы дополнительно сульфированы (1,3 ммоль/г).

^c Степень сшивки 7,5% [0,5% ДВВ+7% ксиллендихлорида]; степень сшивки остальных смол 6% (0,8% ДВВ+5% ХМДФ).

Метилловые эфиры гистидина и метионина реагируют с хлорметилированным полистиролом в мягких условиях каталитического алкилирования только по своим α -аминогруппам более нуклеофильным, чем имидазольные и сульфидные группы (15 и 16) [46, 47]. Напротив, в случае цистеина для синтеза лигандообменных смол можно использовать нуклеофильность группы $-SH$ (20) более простым способом [45], чем это сделали Робертс и Хейг [48].



Цистеиновую кислоту (21) вводят в реакцию с хлорметилированным сополимером в присутствии 2 моль этилдиизопропиламина, необходимого для нейтрализации двух кислотных функциональных групп. Как можно было ожидать, определенная часть этой аминокислоты оказалась связанной с полимерной матрицей через сложноэфирные группы [49].

Были предприняты попытки направить процесс алкилирования по гидроксильным группам гидроксипролина (его аминокислотные группы были защищены соответственно путем введения формильной группы и образования сложного эфира) [40], а также по ароматическому кольцу фенилаланина (22 и 25) [50].

Синтез хиральных лигандообменников с полифункциональными лигандами, в особенности с серусодержащими полифункциональными лигандами типа (28—31), достаточно трудоемок, поскольку требуется несколько селективных защитных групп для предотвращения нежелательного направления реакций с хлорметилированным сополимером [51].

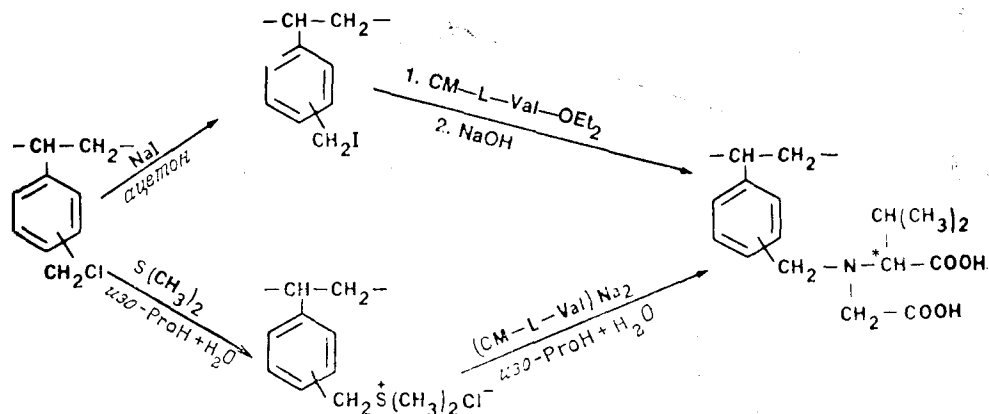
Больших усилий также требует синтез хиральных смол, содержащих оптически активные остатки α -аминофосфоновых кислот (32—37) [52, 53], поскольку разделение энантиомеров рацемических аминокислот достаточно трудоемко [54, 55].

Даванковым и сотрудниками было получено и изучено в общей сложности около сорока хиральных хелатообразующих смол на основе полистирола и α -аминокарбоновых, а также α -аминофосфоновых кислот. Хотя свойства многих из этих смол были далеки от оптимальных, но такое обширное исследование было необходимо для выбора структур, подлежащих детально-

му изучению. Далее будет показано, что прививка к полистирольной матрице первого лиганда — L -пролина неожиданно привела к получению одного из наиболее эффективных лигандообменников среди описанных смол с привитыми аминокислотами.

Несколько других исследовательских групп также синтезировали хиральные лигандообменники на основе природных аминокислот и поперечно сшитого стирольного сополимера. Эти сополимеры, однако, относились к традиционному стиролдивинилбензолному типу, а не макросетчатому изопористому типу, чем, вероятно, можно объяснить более низкую обменную емкость полученных в таких синтезах смол по сравнению с сорбентами, представленными в табл. 5.2.

В 1971 г. Ангеличи, Снайдер и Мек [60, 61] приготовили сорбент, содержащий 0,5 ммоль/г остатков N -карбоксиметил- L -валина в сополимере стирола с 0,8% дивинилбензола [в макросетчатых изопористых матрицах со степенью сшивки до 6% содержание этих остатков 1,5 ммоль/г (26 в табл. 5.2)]. Хлорметильные группы исходного сополимера перед алкилированием аминных компонентов требовали активации путем конверсии в иодметильные группы или в группы диметилсульфония:



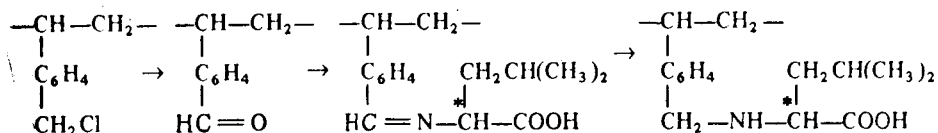
Второй путь оказался предпочтительным. Следует, однако, обратить внимание на тот факт, что в отсутствие защиты у карбоксильных групп в карбоксиметил- L -валине часть хиральных лигандов полученной смолы была привита, вероятнее всего, через сложноэфирные группы.

Французские исследователи [62, 63] пришли к аналогичным выводам путем подбора оптимальных условий для связывания различных аминокислот (фенилаланина, пролина, аланина, треонина, глутаминовой кислоты и гидроксипролина) с сополиме-

рами стирола и 1—8% ДВБ. Наилучшим их результатом было введение 1,5 ммоль L-пролина на грамм сополимера с 1% ДВБ (4 в табл. 5.2; 2,3 ммоль/г). И снова иодметилированные сополимеры дали более низкий выход при прививке, чем их аналоги с сульфоний-группами в реакциях со свободными неэтерифицированными аминокислотами.

Другой группе французских исследователей удалось привить 0,6 ммоль L-гистидина на грамм обычного сополимера стирола с 2% ДВБ (15 в табл. 5.2; 2,0 ммоль/г). Несколько большее содержание гистидина (0,8 ммоль/г) было получено при сополимеризации метилового эфира N-*n*-винилбензил-L-гистидина с гидроксипропанметакрилатом и этилендиметакрилатом [64].

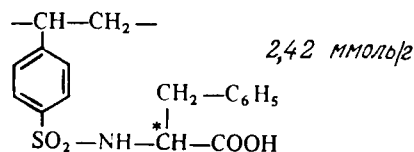
Цучида и сотр. [65, 66] выбрали другой путь приготовления полистирольных смол с привитыми L-лейциновыми лигандами:



Обменная емкость полученного ими полимера достигала 1,48 ммоль/г, но так как все превращения были сделаны с линейным полистиролом, то конечный продукт был порошкообразным и малоприспособен в качестве сорбента для заполнения колонок.

Таким образом, к основным трудностям получения хиральных сорбентов с аминокислотами, привитыми к поперечно сшитой полистирольной матрице, следует отнести низкую обменную емкость и, следовательно, низкую набухаемость, а также недостаточный быстрый массоперенос. Только применение макросетчатых изопористых полистирольных матриц позволяет решить эти проблемы.

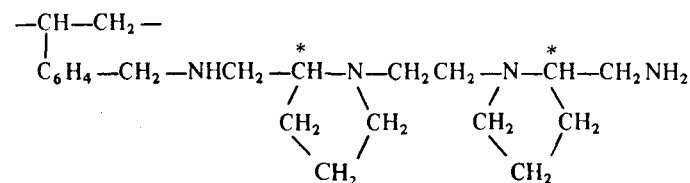
Увеличение поглощения воды хиральными полистирольными смолами можно добиться их частичным сульфированием, как это было сделано с сорбентом (25), содержащим L-фенилаланин, связанный с матрицей через ароматическое кольцо [50]. Частично сульфированные матрицы можно получать автоматически по методу Весы [67], если проводить реакцию хлорсульфированного полистирольного сополимера с L-фенилаланином, в результате чего образуется структура



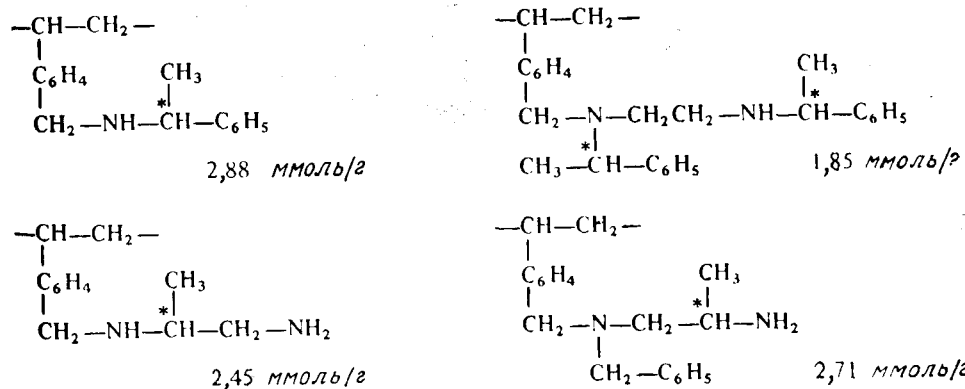
К хлорсульфированному полистиролу было также успешно привито несколько других хиральных аминокислот [62, 68]. У сульфамидных групп способность вступать в координационное взаимодействие с ионами металла ниже, чем у аминогрупп описанных выше сорбентов. Тем не менее это не значит, что легкодоступные сорбенты на основе хлорсульфированных стирольных сополимеров не надо тщательно исследовать в ЛОХ оптических изомеров.

Последнюю рассматриваемую группу полистирольных хиральных лигандообменников составляют системы с привитыми оптически активными аминами и полиаминами.

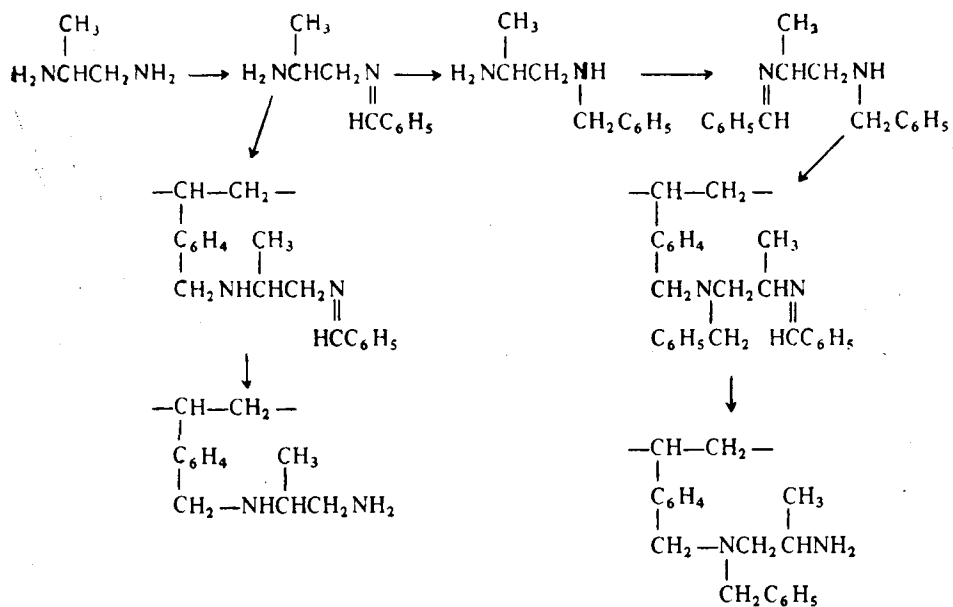
Разделение на оптические изомеры рацемических аминокислот с помощью хиральных тетраминовых комплексов металлов заявлено в патентах [69, 70]. В качестве примера можно привести разделение D,L-аланина (на 81—86%) с помощью хелата никеля(II) в фазе полистирольной смолы, содержащей 2,5 ммоль/г привитого лиганда:



Курганов и сотр. [71] описали синтез четырех хиральных анионообменников на основе макросетчатого изопористого стирольного сополимера и производных (S)-1-фенилэтиламина или (R)-1,2-пропандиамина. Повторяющиеся звенья этих сорбентов представлены следующими структурами:



Первые два сорбента проявили неожиданно низкое сродство к ионам металлов возможно вследствие стерической перегруженности и низкой основности бензилированного азота. Напротив, два последних сорбента, которые благодаря хелатообразованию достаточно прочно удерживают ионы меди (II), оказались достаточно эффективными в хроматографическом расщеплении рацемических аминокислот [71]. Хотя пропилендиамин является бифункциональным соединением, сорбент на его основе имеет четко определенную структуру активных центров благодаря селективной защите атомов N¹ или N² пропандиамина бензальдегидом, образующим основания Шиффа с первичными аминогруппами, что предохраняет их от алкилирования. Авторы работы [72] случайно обнаружили, что реакция 1,2-пропандиамина с бензальдегидом может протекать селективно, приводя к соотношению N¹/N² изомеров моно-N-бензилиден-1,2-пропандиамина 9 : 1. На основании этого наблюдения были осуществлены следующие направления синтеза:



Полученные таким способом смолы легко сорбируют ионы меди (II) из растворов в ацетатном буфере. Наибольшую величину сорбции, соответствующую образованию комплексов состава 1 моль диамина на 1 моль меди (II) в фазе сорбента, легко достичь при сравнительно низких концентрациях меди (II) в растворе. Сорбционная емкость смол в присутствии NH₃ не-

ожиданно резко падает (рис. 5.2), а при более высоких концентрациях аммиака ионы меди не сорбируются вообще. При использовании сорбентов аминокарбоксилатного типа, напротив, присутствие аммиака в высоких концентрациях не оказывает влияния на сорбцию (60—70% от теоретически рассчитанной

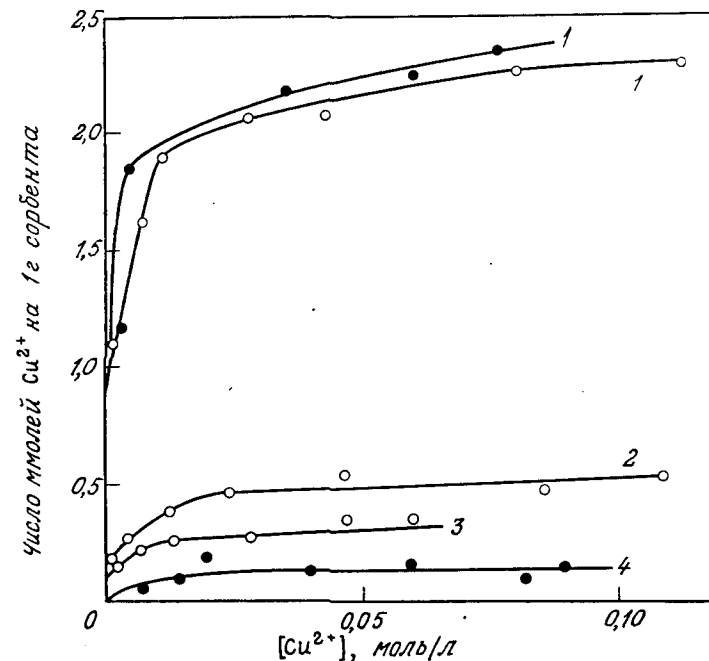


Рис. 5.2. Изотермы сорбции меди (II) хиральным анионообменником, содержащим остатки 1,2-пропандиамина (○) и N'-бензил-1,2-пропандиамина (●): 1 — 1 М ацетат натрия, pH 6; 2 — 0,2 М NH₄OH; 3 — 0,4 М NH₄OH; 4 — 0,5 М NH₄OH [71].

емкости для комплексов 2 : 1 даже в 2—3 М аммиаке). Такое резкое различие в поведении по отношению к меди (II) связано в основном с неблагоприятным зарядом анионообменника при хелатообразовании: диаминовый полимерный комплекс с медью имеет положительный заряд, что приводит к вытеснению положительно заряженных ионов меди (II) и Cu(NH₃)₄²⁺ из фазы сорбента. При использовании сорбентов с привитыми аминокислотами их отрицательный заряд в щелочной среде усиливает комплексообразующие свойства. В ацетатном буфере большинство ионов меди существует в форме электрически нейтральных ацетатных комплексов, которые легко проникают в фазу анионообменника.

каких-либо изменений после 7 лет эксплуатации. Химическая и конфигурационная стабильность сорбентов на основе сульфированного полистирола, а также полиакриламида ждет своего изучения.

Последнее замечание этого раздела относится к способности хиральных смол удерживать ионы переходных металлов. Относительная стабильность комплексов металлов с карбоксильными и аминными донорами уменьшается в следующем ряду двухзарядных ионов: $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Cd}$. За исключением монодентатных привитых лигандов, таких, как пироглутаминовая кислота и 1-фенилэтиламин, большинство остальных изученных лигандов связывали ионы металлов достаточно прочно, особенно при высокой концентрации фиксированных лигандов в неподвижной фазе. Трифункциональные и полифункциональные лиганды проявляют повышенную способность к связыванию ионов металла (лизин, метионин и метионинсульфоксид ведут себя как бидентатные лиганды). Следует отметить исключительно сильное удерживание никеля (II) цистеином и цистеиновой кислотой и железа (III) аминокислотными кислотами.

5.2.1.2. Хроматографическое расщепление рацемических аминокислот. Лигандообменная хроматография на хиральных сорбентах была предложена в 1968 г. Даванковым и Рогожиным как общий метод расщепления рацематов веществ, способных образовывать комплексы с ионами переходных металлов [79]. Уже в первых публикациях [80—83] было описано полное полупрепаративное разделение 0,5 г D,L-пролина на полистирольном лигандообменнике с остатками L-пролина в качестве привитого к матрице хирального лиганда (см. гл. 1). Сегодня никто не станет изучать новый хроматографический метод, начиная с таких больших загрузок, но в то время, когда сложное хроматографическое оборудование было трудно доступным, было распространено использование больших колонок и значительных загрузок, позволявших проводить количественный анализ многочисленных фракций элюата. Путем измерения их оптической активности и зная количество введенного в колонку рацемата и теоретическую оптическую активность чистых энантиомеров, легко было подсчитать «степень расщепления» [84]. В настоящее время этот параметр позволяет выбирать тот или иной сорбент для препаративного разделения.

Как было показано в работе [85], десорбцию веществ с насадки в лигандообменной хроматографии можно осуществить несколькими способами: 1) элюированием вытесняющим лигандом (аммиаком, пиридином, этилендиамином); 2) элюированием комплексообразующим ионом металла; 3) понижением pH элюента; 4) повышением температуры колонки. Элюирование

удобно начинать с пропускания чистой воды и постепенно поднимать концентрацию аммиака в элюенте до тех пор, пока оба энантиомера исходного рацемата не будут вытеснены из колонки. Насадки чаще всего насыщали медью (II) или никелем (II), реже — цинком (II) и кадмием (II). Удерживание большинства энантиомеров, как было найдено, уменьшается в том же порядке в соответствии с понижением стабильности аминокислотных комплексов с ионами этих металлов.

Как легко заметить из табл. 5.3, в большинстве разделений бифункциональных аминокислот и миндальной кислоты (2-гидроксипрокси-2-фенилуксусной кислоты) наилучшие результаты были получены с ионами меди (II). С тридентатными привитыми и подвижными лигандами октаэдрические ионы никеля (II) часто проявляют более высокую энантиоселективность по сравнению с медью. Очевидно, что разделение оптических изомеров становится наиболее эффективным, когда число координационных связей, образуемых неподвижными и подвижными лигандами, равно координационному числу центрального иона металла. В этом случае подвижные лиганды могут координироваться только одним способом, и сорбционный комплекс имеет наиболее простую структуру.

Хиральные смолы, содержащие $\bar{R}Ala$, $\bar{R}Pro$, $\bar{R}Anp$, $\bar{R}Tyr$, $\bar{R}Met$, $\bar{R}MetSO$, $\bar{R}His$ и $\bar{R}Asp$ в качестве привитых к полистиролу лигандов L-конфигурации, обычно образуют более стабильные медные (II) комплексы с L-энантиомерами бидентатных подвижных аминокислотных лигандов, чем с D-энантиомерами. Напротив, разнолигандные сорбционные комплексы с трифункциональными подвижными лигандами (треонином, аспарагиновой кислотой, орнитинном), так же как с объемными неподвижными лигандами ($\bar{R}Val$, $\bar{R}Ile$), часто оказываются более стабильными, когда оба составляющих лиганда принадлежат одному конфигурационному ряду (см. подчеркнутые номера в табл. 5.3). Что касается N-карбоксиметил-L-валиновых насадок, то данные табл. 5.3 согласуются с более ранними результатами Снайдера и сотр. [61] в том отношении, что D-валин и D-пролин выходят из колонки перед L-энантиомерами, причем более высокая селективность была найдена для пролина. (Помимо этих двух рацематов такой же порядок элюирования энантиомеров и снижения разрешения был отмечен [61] для изолейцина, норвалина, аминокислотной кислоты и аланина.)

Хотя трудно найти однозначные правила изменения эффективности расщепления, тем не менее можно отметить рост энантиоселективности с увеличением размера α -радикалов в неподвижных и подвижных лигандах. Аминокислоты с дополнительными функциональными группами, не взаимодействующими с центральным ионом металла, как в случае лизина и глутамино-

№	Смола	Металл-тип ^а	Me ²⁺	Ala	Val	Iva	Ile	Pro	Ser	Thr	Asp	Orn	His	α Thr	Met	Минимальная нагрузка ^б
	Аминофосфоновые кислоты															
32	Бензил	[52]	Cu	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—
33	Бензил OC ₂ H ₅	[52]	Cu	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—
34	Метил, бензил	[53]	Cu	—	—	—	—	9	—	—	—	—	—	—	—	—
35	Метил, пропил	[53]		—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—
36	Метил, пентил	[53]	Cu	—	—	—	—	34	—	—	1	0	—	—	—	1
37	Метил, пентил OC ₂ H ₅	[53]	Cu	—	—	—	—	12	—	—	—	—	—	—	—	—

^аПодчеркнутые числа соответствуют системам с обратным порядком элюирования энантиомеров (D перед L).

^бРазмер частиц 100—200 мкм.

^вСкорость потока 10—15 мл/ч.

Г См. табл. 5.2.

вой кислоты, разделяются в меньшей степени, чем их аналоги с неполярными алифатическими боковыми цепями.

α -Аминофосфоновые кислоты, привитые к полистирольной матрице в качестве неподвижных хиральных лигандов, по расщепляющей способности заметно уступают лигандам аминокарбоксильного типа. Из сорбентов, представленных в табл. 5.3, наиболее перспективны системы, содержащие пролин, гидроксипролин, аллогидроксипролин, метионинсульфоксид, изолейцин и гистидин. Это тем не менее не предполагает, что на других матрицах и с другими привитыми лигандами не будет найдено каких-либо иных закономерностей разделения.

Природные аминокислоты в ряде случаев настолько сильно взаимодействуют с ионами металла насадки, что частично десорбируют их и выносят из колонки. Для поляриметрических измерений, однако, необходимы элюаты, не содержащие металла, в связи с чем после основной колонки ставят небольшую колонку, заполненную той же хиральной насадкой или, еще лучше, дауэксом А-1 без металла [79, 80]. Позднее выяснилось, что элюирование (частичное) аминокислот в форме хелатов металлов обеспечивает возможность детектирования элюатов с помощью обычного УФ-детектора при 206 нм [58, 86, 87] или 254 нм [71, 88, 89]. Это позволяет использовать значительно меньшие количества как рацематов, так и хиральных насадок и оценивать энантиоселективность как отношение элюируемых (исправленных) объемов (т. е. коэффициентов емкости) $\alpha = k'_D/k'_L$ двух энантиомеров, введенных в колонки порознь или в виде смеси рацемата.

В таком общепринятом виде в табл. 5.4 представлены результаты определения энантиоселективности α при расщеплении рацематов аминокислот на различных полистирольных хиральных сорбентах. Если ν -энантиомеры удерживаются сильнее своих ι -антиподов на насадках с привитыми остатками ι -аминокислот в качестве фиксированных лигандов, то $\alpha > 1$. Соответственно $\alpha < 1$, когда $k'_D < k'_L$. И в этом случае при разделении бифункциональных подвижных лигандов на сорбентах с бидентатными фиксированными лигандами типа ι -фенилаланина, привитыми к полистиролу через α -амино- или фенильные группы, следует использовать ионы меди(II), а не никеля(II). Только тридентатный гистидин проявляет лучшее разрешение с ионами никеля(II). Ситуация становится совершенно иной, когда фиксированные лиганды потенциально тридентатны (S-аминоэтилцистеин и S-карбоксиметилцистеин) или гексадентатны (S,S'-этиленбисметионин и N,N'-этиленбисметионин). В этом случае ионы металлов с координационным числом шесть имеют преимущества перед ионами меди(II).

Исключительно высокую разрешающую способность хираль-

ных сорбентов, функционирующих по лигандообменному механизму, иллюстрирует тот факт, что во многих системах энантио-селективность превышает предел ($\alpha \geq 1,5$ или $\alpha \leq 0,67$), обычно используемый как критерий возможности разделения двух компонентов в препаративном масштабе. Это тем более справедливо для пяти наиболее эффективных хиральных сорбентов на основе полистирола, описанных ранее. Они содержат циклические аминокислоты L-пролин, L-гидроксипролин, (его диастереомер) L-аллогидроксипролин и L-азетидинкарбоновую кислоту, а также (R)-N'-бензил-1,2-пропандиамин в качестве хиральных расщепляющих лигандов. Эти сорбенты можно широко применять в сочетании с медью(II) в качестве комплексообразующего иона. В табл. 5.5 представлены полученные величины энантиоселективности, свидетельствующие о том, что все рацематы природных аминокислот можно успешно разделить, используя какой-либо из указанных пяти лигандообменных сорбентов.

На рис. 5.3 изображены хроматограммы разделения 13 типичных аминокислот на макросетчатой изопористой полистирольной смоле, содержащей 3,86 ммоль/г остатков L-гидроксипролина. Для этого использовали колонку длиной 14 см, достаточно короткую для частиц размером 50 мкм неправильной формы. Полученные результаты [88] показывают, что ЛОХ может быть очень полезным методом быстрого определения энантиомерного состава аминокислот. Описываемый метод имеет существенные преимущества перед известным газохроматографическим методом, поскольку отпадает необходимость готовить летучие производные и очищать аминокислоты от минеральных солей и других сопутствующих веществ.

Это последнее утверждение требует дополнительных разъяснений. Далее будет показано, что ионы меди(II), так же как и ионы других металлов, всегда распределяются между фазой сорбента и элюентом в зависимости от их состава. Способные к комплексообразованию побочные продукты, нейтральные соли в элюенте, а также pH могут влиять на коэффициент распределения. Поэтому, если анализируемая проба содержит большое количество сопутствующих компонентов, нулевая линия на хроматограмме не будет такой же стабильной, как в калибровочных экспериментах. Минеральные соли, повышая ионную силу элюента, вызывают дополнительную десорбцию ионов меди, которую УФ-детектор регистрирует в виде отдельного пика, что сопровождается падением нулевой линии, соответствующим восстановлению равновесия в распределении. Путем изменения концентрации ионов меди в исходном элюенте можно влиять на положение «отрицательных пиков», поскольку эти пики могут накладываться на пики разделяемых энантиомеров и исказить

Таблица 5.4. Величины селективности ($\alpha = k_2/k_1$) расщепления рацемических аминокислот на полистирольном хиральном лигандообменнике (см. табл. 5.2) при элюировании водой или растворами аммиака [50, 51, 57, 71]

№	Смола ^а	Me ²⁺	Ala	Val	Leu	Pro	Phe	His	Thr	Ser	Met
18	RMetSOd	Cu Ni	1,07 1,00	1,25 1,00	1,30 1,11	1,35 1,38	1,48 1,21	0,65 0,45	1,24 1,14	—	1,09 —
19	RMetSOl	Cu Ni	1,19 1,00	1,29 1,03	1,21 1,07	1,78 1,07	1,40 1,19	0,55 0,81	1,27 1,20	—	1,28 —
24	RPhe	Cu Ni	1,11 —	1,19 1,06	1,32 1,11	1,72 1,23	2,00 1,54	0,67 1,64	1,35 —	0,74 —	0,88 —
25	RarPhe	Cu Ni	1,16 —	1,40 1,12	0,67 0,90	0,76 0,83	0,70 0,80	0,79 0,73	0,77 —	1,46 —	0,59 —
28	RAECys	Cu Ni	1,19 1,11	0,74 1,14	1,31 1,43	1,31 1,18	0,74 0,63	0,52 1,82	1,49 1,04	—	0,86 0,57
29	RCMCys	Cu Ni	0,96 0,90	1,16 1,14	0,90 1,18	1,18 1,41	1,58 0,87	1,75 0,57	1,31 0,88	—	0,77 0,79
30	REBCys	Cu Ni	1,14 0,93	1,35 1,16	1,54 1,26	1,33 0,83	1,69 1,56	2,02 0,50	0,77 1,19	—	1,33 1,58
31	REBMet	Cu Ni	0,98 0,79	1,19 0,63	0,87 1,41	1,11 1,35	1,62 0,63	1,69 2,15	0,33 0,82	—	1,09 0,54
	Rpn ^б		1,05	1,22	—	1,28	—	0,87	—	—	—

^а См. табл. 5.2.

^б Смола с привитым лигандом R — 1,2-пропандиамином; элюент 1 М раствор ацетата натрия, pH 6.

Таблица 5.5. Величины селективности ($\alpha=k'_D/k'_L$) расщепления рацемических аминокислот на полистирольных смолах, заряженных медью(II), с привитыми остатками L-пролина [58], L-гидроксипролина [86], аллогидроксипролина [87], L-азетидинкарбоновой кислоты [58] и N¹-бензил-R-пропандиамина-1,2 [93]

Рацемическая аминокислота	$\bar{R}Pro$	$\bar{R}Hyp$	$\bar{R}\alpha Hyp$	$\bar{R}AzCA$	$\bar{R}Bzepn$
Аланин	1,08	1,04	1,04	1,06	0,70
Аминомасляная кислота	1,17	1,22	1,18	1,29	0,49
Норвалин	1,34	1,65	1,42	1,24	0,48
Норлейцин	1,54	2,20	1,46	1,40	0,49
Валин	1,29	1,61	1,58	1,76	0,31
Изовалин	—	1,25	—	—	—
Лейцин	1,27	1,70	1,54	1,24	0,49
Изолейцин	1,50	1,89	1,74	1,68	0,62
Серин	1,09	1,29	1,24	2,15	0,62
Треонин	1,38	1,52	1,48	0,78	0,44
Аллотреонин	1,55	1,45	—	—	—
Гомосерин	—	1,25	—	—	—
Метионин	1,04	1,22	1,52	1,29	0,60
Аспарагин	1,18	1,17	1,20	1,44	0,70
Глутамин	1,20	1,50	1,40	1,25	—
Фенилглицин	1,67	2,22	1,78	1,38	0,49
Фенилаланин	1,61	2,89	3,10	1,86	0,52
α -Фенил- α -аланин	—	1,07	—	—	0,38
Тирозин	2,46	2,23	2,36	1,78	—
Фенилсерин	—	1,82	—	—	—
Пролин	4,05	3,95	1,84	2,48	0,47
Гидроксипролин	3,85	3,17	1,63	2,25	—
Аллогидроксипролин	0,43	0,61	1,48	1,46	—
Азетидинкарбоновая кислота	—	2,25	—	—	—
Орнитин	1,0	1,0	1,20	1,0	1,0
Лизин	1,10	1,22	1,33	1,06	1,0
Гистидин	0,37	0,36	1,32	0,56	0,85
Триптофан	1,40	1,77	1,10	1,13	—
Аспарагиновая кислота	0,91	1,0	0,81	0,88	1,0
Глутаминовая кислота	0,62	0,82	0,69	0,77	—

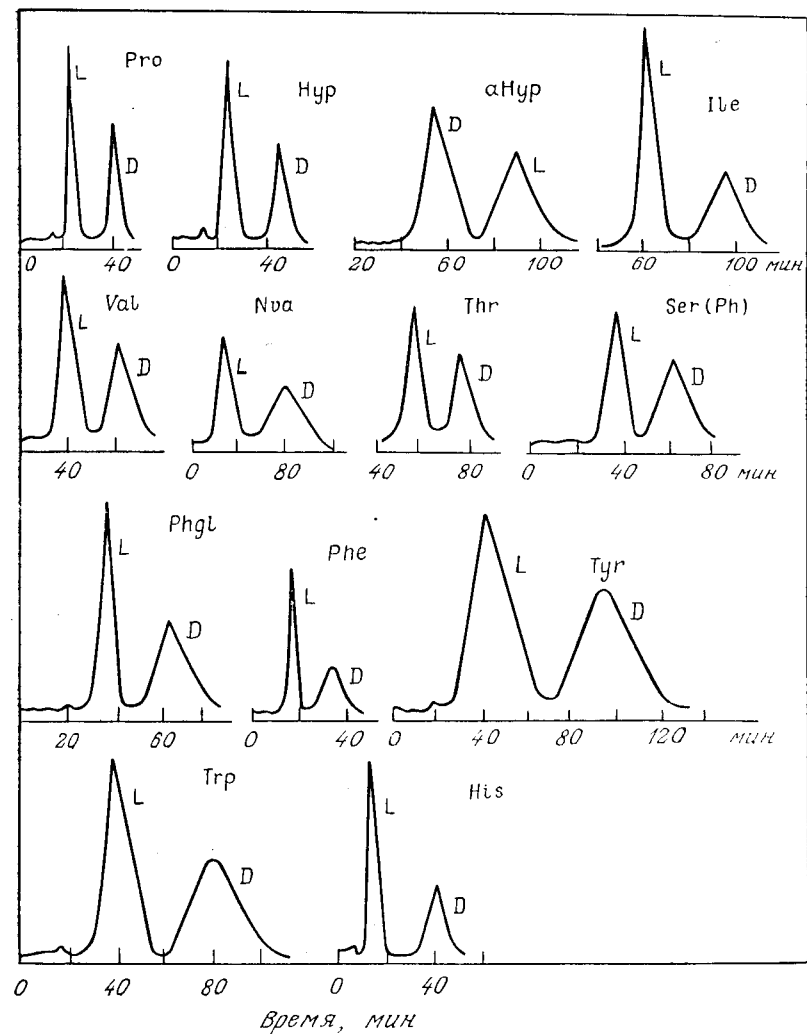
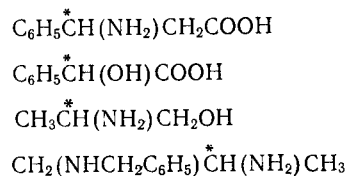


Рис. 5.3. Хроматограммы продуктов расщепления приблизительно 1 мг рацемических аминокислот на колонке (7,8×140 мм), содержащей 6,3 мл полистирольной смолы с L-гидроксипролиновыми лигандами, насыщенными медью (емкость 3,86 ммоль/г, степень шивки 6%, частицы неправильной формы размером приблизительно 50 мкм). Детектор увикорд 1 без светофильтра [88]. Пролин: 65% меди, 1,0 М NH₄OH, 20 мл/ч. Гидроксипролин и аллогидроксипролин: 65% меди, 0,5 М NH₄OH, 20 мл/ч. Изолейцин: 65% меди, 0,1 М NH₄OH, 13 мл/ч. Валин: 65% меди, 0,1 М NH₄OH, 13 мл/ч. Норвалин: 65% меди, 0,05 М NH₄OH, 16 мл/ч. Треонин: 80% меди, 0,05 М NH₄OH, 20 мл/ч. Фенилсерин: 45% меди, 0,05 М NH₄OH, 14 мл/ч. Фенилглицин: 65% меди, 0,1 М NH₄OH, 13 мл/ч. Фенилаланин: 45% меди, 0,1 М NH₄OH, 20 мл/ч. Тирозин: 65% меди, 0,1 М NH₄OH, 16 мл/ч. Триптофан: 30% меди, 0,4 М NH₄OH, 20 мл/ч. Гистидин: 30% меди, 0,5 М NH₄OH, 25 мл/ч [88].

хроматограмму. Для подавления флуктуаций нулевой линии в ходе анализа гидролизатов белков и других загрязненных проб [94] лучше всего использовать элюенты достаточно большой ионной силы и буферной емкости. Все эти меры нужны, таким образом, для улучшения условий детектирования, а не разделения энантиомеров. Работа [94] интересна также тем, что ее авторы использовали очень короткие колонки длиной от 1 до 2 см для сокращения до нескольких минут времени анализа энантиомерного состава триптофана, валина, пролина, фенилаланина и тирозина (а также их эфиров). В этой же работе были найдены условия для селективного анализа ароматических аминокислот в смеси с другими аминокислотами и пептидами, которые единым пиком элюируются раньше ароматических аминокислот.

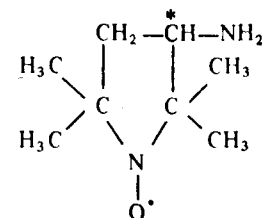
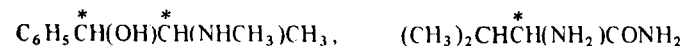
Помимо аналитических приложений, сорбенты на основе полистирола с привитыми L-гидроксипролиновыми группами можно с успехом использовать для препаративных разделений. В колонке объемом 1 л (около 300 г сорбента с набухаемостью 250%) можно полностью разделить за один цикл до 20 г D,L-пролина ($\alpha=3,95$), 5 г D,L-треонина ($\alpha=1,52$) или 5 г D,L-миндальной кислоты ($\alpha=1,65$) на оптически чистые энантиомеры [89]. Детально описаны микропрепаративное разделение D,L-лейцина [95], а также меченных тритием D,L-[^3H]-валина [96, 97] и D,L-[^3H]-гистидина [97]. Лигандообменная хроматография перспективна для препаративного получения оптически чистых меченных тритием аминокислот с высоким уровнем радиоактивности, поскольку эти продукты нельзя подвергать кристаллизации ввиду их быстрого разложения в конденсированном состоянии или в концентрированных растворах. Целесообразно упомянуть и несколько более ранних публикаций [1, 63, 79, 83] по препаративному разделению D,L-пролина на полистирольных сорбентах с привитыми L-пролиновыми лигандами.

В статье [89] описаны примеры полного расщепления рацематов не только α -аминокислот, но и органических соединений других классов: β -фенил- β -аланина, миндальной кислоты, 2-аминопропанола-1 и N'-бензил-1,2-пропандиамина, со следующими структурными формулами:



На сорбентах с привитыми L-пролиновыми группами были рас-

щеплены рацематы эфедрина, валинамида и стабильного радикала [79, 84, 89]:



Таким образом, аминокислоты не являются единственным объектом приложения ЛОХ и выступают скорее в качестве удобной модели для дальнейшего развития этого метода.

Для того чтобы понять механизм хирального распознавания энантиомеров аминокислот хиральными сорбентами полистирольного типа, необходимо учитывать, что образование тройных сорбционных комплексов происходит в фазе набухшего в воде сорбента. На основании ряда примеров было замечено, что чем больше обменная емкость и набухаемость полистирольных сорбентов, тем выше их расщепляющая способность и хроматографическая эффективность [63, 88]. Это наводит на мысль, что ни структура макромолекулярной матрицы, ни соседние сегменты цепи или ее звенья не влияют на стереохимическую ситуацию на уровне отдельного диастереомерного тройного сорбционного комплекса. Если это верно, то структуру сорбционного комплекса в фазе сорбента можно представить в виде низкомолекулярной модели, включающей аминокислоту, ион меди и N-бензил-L-пролин, представляющий собой полистирольный сорбент с привитыми L-пролиновыми группами.

Медные комплексы N-бензилпролина [98—103] наряду с другими N-алкилпроизводными аминокислот были тщательно изучены Даванковым и Кургановым. Оставим стереохимические аспекты этих исследований для последующего обсуждения и остановимся лишь на результатах, связанных с термодинамикой. Было найдено, что из двух диастереомерных бис-комплексов Cu^{II} и Cu^{I} , где буквами d и l обозначены N-бензилпролиновые лиганды противоположных конфигураций, второй комплекс на $4,8 \pm 0,8$ кДж/моль более стабилен. Это первый случай [98], когда термодинамическая энантиоселективность была обнаружена в бискомплексах меди с бидентатными аминокислотными лигандами. Энтропийный вклад для этого конкретного комплекса во всем исследованном интервале темпера-

тур неожиданно оказался больше энтальпийного вклада в общую энантиоселективность, поэтому избыточная стабильность комплекса C_{57} еще более возрастает с повышением температуры [103]. Увеличение энантиоселективности с ростом температуры согласуется с результатами ЛОХ: рацемический *N*-бензилпролин расщепляют на сорбентах с *l*-пролиновыми привитыми группами с более высокими величинами α при повышении температуры, причем *d*-изомеры всегда удерживаются сильнее.

Аналогично, для нескольких тщательно изученных систем было установлено хорошее количественное соответствие между порядком элюирования двух энантиомеров и разницей в стабильностях двух соответствующих диастереомерных комплексов в растворе. Так, например, *d*-валин [104], *d*-пролин [104—106] и *l*-гистидин [105—107] удерживаются сильнее как на сорбенте с *l*-пролиновыми группами, так и в тройных модельных комплексах с *N*-бензил-*l*-пролином. Более стабильными оказываются медные комплексы *N*-бензил-*l*-валиновых лигандов как в фазе полимерного сорбента [15], так и в фазе раствора [108]. Преимущественная координация *l*-изомеров валина, лейцина, фенилаланина и аланина отмечена в тройных комплексах с *N*-карбоксиметил-*l*-валином и в полистирольных смолах, содержащих эти лиганды [61, 109, 110]. Установлено хорошее количественное соответствие между более высокой энергией сорбции (на 3,6 кДж/моль) *d*-пролина в заряженных медью сорбентах с привитыми *l*-пролиновыми группами [58] и величиной энантиоселективности (на $3,8 \pm 1,0$ кДж/моль), определенной для соответствующих тройных модельных комплексов с *N*-бензил-*l*-пролином и *d*- или *l*-пролином [104].

Цуцида с сотр. [65] столкнулись с противоположными знаками энантиоселективности в тройных комплексах меди, содержащих полимерные или растворимые лиганды типа *N*-бензил-*l*-лейцина: сорбенты с привитым *l*-лейцином более сильно удерживали *d*-изомеры валина, лейцина и аланина, тогда как *N*-бензил-*l*-лейцин проявлял большее сродство к *l*-изомерам. В связи с этим авторы были вынуждены предположить, что фиксированные лиганды в их сорбенте имеют структуру, отличную от предполагаемой, а именно структуру *N,N*-добензил-*l*-лейцина.

Французские авторы [105, 106] сообщили об отсутствии какой-либо энантиоселективности при хроматографировании *d,l*-фенилаланина на полистирольном сорбенте с привитыми *l*-пролиновыми группами, заряженном медью (II), а также об одинаковых константах устойчивости двух тройных комплексов энантиомеров фенилаланина с *N*-бензил-*l*-фенилаланином. Группа советских исследователей [58], напротив, обнаружила достаточно высокую расщепляющую способность у своего аналогич-

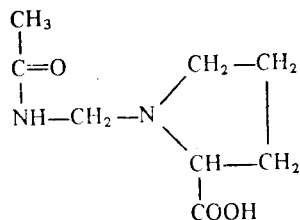
ного сорбента по отношению к тому же рацемату ($\alpha = 1,63$). Это кажущееся противоречие можно объяснить разницей в качестве использованных сорбентов: в первом случае матрица содержала 1% ДВБ, 1,53 ммоль *l*-пролина на грамм сухого вещества насадки, набухаемость в воде составляла приблизительно 60% [63, 106]; во втором случае матрица была макросетчатого изопористого типа со степенью сшивки 11%, обменной емкостью 2,78 ммоль/г и набухаемостью до 170% [58]. Величина энантиоселективности $\alpha = 1,63$ должна соответствовать разнице в константах устойчивости двух диастереомерных тройных комплексов, равной приблизительно 0,20 логарифмических единиц, что едва ли превышает пределы погрешностей потенциметрического определения энантиоселективности в лабильных комплексах.

Спаский и сотр. [64] еще раз испытали сорбенты полистирольного типа, содержащие *l*-гистидин в качестве фиксированного лиганда. Насыщенный ионами никеля (II) лигандообменник проявил большее сродство к *d*-изомерам гистидина в полном соответствии с ранее опубликованными результатами [92]. Этот частный случай интересен тем, что как фиксированный, так и подвижный лиганды были тридентатными в соответствии с координационным числом шесть октаэдрического иона никеля (II).

В ходе испытаний хиральных сорбентов, полученных реакцией хлорсульфированного полистирола с *l*-фенилаланином, Веса [67] частично расщепил в присутствии меди рацематы пролина, валина, серина, треонина и в меньшей степени некоторых других аминокислот. Недавно [111] была обнаружена энантиоселективность тройных комплексов меди (II), содержащих наряду с *N*-бензилсульфонил-*l*-фенилаланином валин, фенилаланин или пролин. В соответствии с опубликованными хроматографическими данными предпочтительно образование диастереомерных комплексов, содержащих *l*-валин, *d*-пролин и *l*-фенилаланин.

Ряд авторов столкнулись с относительно низкой эффективностью колонок, заполненных полистирольными хиральными сорбентами. Это, однако, ни в коем случае не является общим недостатком сорбентов, а скорее всего касается использования оборудования и методик. На первых этапах развития ЛОХ оптических изомеров исследователи считали более важным определить возможные области применения нового метода и понять механизм распознавания подвижных лигандов, а не тратить энергию на увеличение числа теоретических тарелок в колонке. Возможность решения этой проблемы с помощью макросетчатых изопористых матриц была проиллюстрирована на примере анионообменника [71], содержащего 2,7 ммоль/г (R)-*N*-бензил-1,2-пропандиамина, привитого к полистирольной

тельно низкую скорость лигандного обмена в тройных сорбционных комплексах. Эффективность колонки можно существенно увеличить, повысив температуру колонки до 50—60 °С [74]. Следует отметить, что для макросетчатых изопористых полистирольных сорбентов аналогичная температурная зависимость выражена гораздо слабее [95, 117]. Интересно отметить, что на полиакриламидных сорбентах наблюдался обратный порядок элюирования энантиомеров бифункциональных аминокислот (*D* перед *L*) по сравнению с полистирольными лигандообменниками с привитыми *L*-пролиновыми группами. Недавно [118] с помощью низкомолекулярной модели было показано, что *L*-изомеры валина и фенилаланина действительно предпочтительны при комплексообразовании с *N*-ацетиламинометил-*L*-пролином, играющим роль повторяющегося звена полиакриламидного хирального сорбента



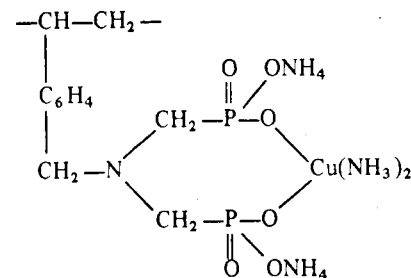
Более того, было отмечено хорошее соответствие между соотношением констант устойчивости $\beta_{CuLL'}$ и $\beta_{CuLD'}$ двух диастереомерных модельных комплексов и селективностью расщепления α при хроматографировании рацематов валина и фенилаланина: $\Delta \lg \beta \approx \lg \alpha$. В то же время в тройных модельных комплексах с пролином энантиоселективности обнаружено не было, хотя пролин легко расщепляется хроматографически ($\alpha = k'_D/k'_L = 1,53$). Таким образом, низкомолекулярная модель не всегда адекватно отражает стереохимическую ситуацию в фазе сорбента, что будет рассмотрено более подробно в следующих разделах. Естественно, более надежно сравнивать растворимый линейный полиакриламид с привитыми *L*-пролиновыми группами со шшитыми полимерными сорбентами [119]. Способность различать энантиомеры валина и пролина при образовании разнолигандных комплексов меди в растворимом полимере ($\beta_D/\beta_L = 0,67$ и 1,25 соответственно) хорошо коррелирует с хроматографическим разрешением этих энантиомеров при использовании шшитых полимерных сорбентов ($\alpha = 0,57$ и 1,25 соответственно). Однако полимерные модели дают лишь минимальные преимущества при изучении стереохимической ситуации по сравнению с нерастворимыми сорбентами.

Помимо пролина, ставшего наиболее распространенным расщепляющим лигандом в различных хиральных лигандообменных системах, к полиакриламидным гелям был привит ряд других *L*-аминокислот [75]. Наиболее высокая разрешающая способность была проявлена сорбентами с циклическими привитыми лигандами — пролином, гидроксипролином, азетидинкарбоновой кислотой, пипеколиновой кислотой. Примечательно, что по отношению к лейцину ни один из них не проявил расщепляющей активности.

Отрицательные результаты были получены при попытках хроматографически расщепить рацематы пролина, валина и фенилаланина на полиакриламидных гелях, модифицированных *L*-фенилаланином и *L*-фенилглицином [75]. В отличие от этого группа советских исследователей [97] получила хорошие результаты на сорбентах, содержащих 1,4 ммоль *L*-фенилаланиновых остатков на грамм полиакриламидных гранул (биогель Р-4 фирмы Serva, $d_p = 64$ мкм). Для всех исследованных 20 аминокислот, включая основные (Lys, Orn), кислые (Asp, Glu) и наиболее трудно расщепляемые нейтральные аминокислоты (Ala, Met, Ser, Leu), были получены величины энантиоселективности, равные 1,25—1,30. Было проведено также препаративное расщепление меченных тритием *D,L*-[³H]-аланина [97] и *D,L*-[³H]-глутаминовой кислоты [120] на заряженном медью сорбенте. *L*-Энантиомеры выходили из колонки всегда перед своими *D*-антитапами в отличие от порядка элюирования на полиакриламидном сорбенте с привитыми *L*-пролиновыми группами.

В меньшей степени, чем полистирольные и полиакриламидные сорбенты, были изучены хиральные полимерные лигандообменники, приготовленные на основе гидрофильных TSK-2000 PW-гелей [77] и полигидроксиэтилметакрилата [76], на которых были расщеплены рацематы ряда аминокислот.

Следует упомянуть один курьезный случай: в статье [121] было описано расщепление ряда рацемических аминокислот с помощью ЛОХ на нехиральном полистирольном сорбенте с насыщенными медью привитыми остатками иминоди(метанфосфоновой) кислоты:

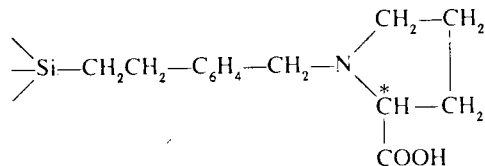


Приведенные результаты находились в очевидном противоречии с основным принципом стереохимии, в соответствии с которым расщепление энантиомеров предполагает использование хирального расщепляющего агента.

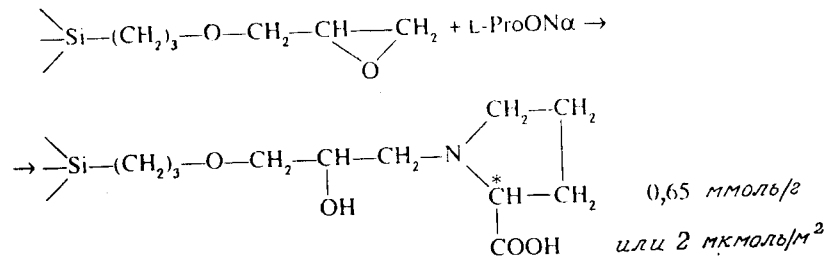
5.2.2. Хиральные фазы на основе силикагеля

Хотя хиральные полимерные сорбенты характеризуются высокой обменной емкостью и прекрасной химической устойчивостью, их сопротивление давлению хуже, чем у пористого силикагеля. Этот параметр очень важен для достижения высокой эффективности насадок в колонках, поскольку они должны состоять из маленьких частиц и, следовательно, подвергаться воздействию высокого давления, прикладываемого к элюенту, скорость которого при прохождении через колонку должна быть достаточно высокой. В связи с этим актуальной и важной задачей было привить хиральные лиганды на поверхность микрочастиц пористого силикагеля. В 1979 г. три группы исследователей [122—124] опубликовали первые результаты получения силикагельных хиральных фаз. Очевидно, что химическое модифицирование поверхности силикагеля предполагает высокий экспериментальный уровень, так что первые попытки не были особенно впечатляющими. Реальный успех пришел позднее.

Группа советских исследователей [122], получивших хорошие результаты на сорбентах полистирольного типа, испытывали определенные трудности в достижении аналогичных результатов на силикагельных лигандообменниках такой структуры:



Гюбитц и сотр. [123] получили хиральную привитую фазу обработкой силикагеля лихросорб Si 100 с размером частиц



10 мкм сначала 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом в кипящем бензоле, а затем L-пролином натрия в диметилформамиде или метаноле при комнатной температуре.

На полученном сорбенте, заряженном медью(II), была достигнута высокая селективность при разделении энантиомеров тирозина и триптофана, но для полного разделения двух

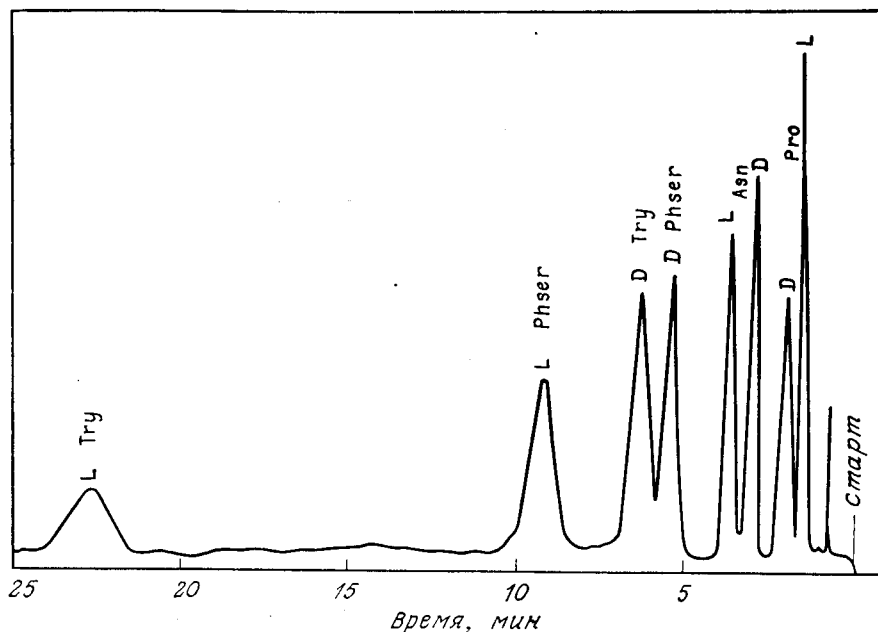


Рис. 5.5. Хроматограмма продуктов расщепления D,L-пролина, D,L-аспарагина, D,L-фенилсерина и D,L-триптофана. Колонка размером 4,6×250 мм с силикагелем с привитыми L-пролиновыми лигандами, насыщенными медью(II), ($d_p = 10$ мкм) элюент 0,05 М раствор KH_2PO_4 , pH 4,6, расход 5 мл/мин, температура 50 °С [126].

изомеров требовалось 2—3 ч. Позднее хроматографические условия были оптимизированы [125—127], и большинство аминокислот (за исключением аланина, лейцина, глутаминовой кислоты и цистина) можно было разделить за несколько минут. Даже смеси четырех-пяти рацемических аминокислот практически полностью разделялись на энантиомеры (рис. 5.5) за 25—40 мин [126]. К наиболее важным факторам улучшения эффективности следует отнести повышение температуры колонки до 60—80 °С, использование нейтрального или даже кислого фосфатного буфера и относительно высокую ионную силу элюента. Сорбент обладал хорошей химической стабильностью при pH 4—9, но при повышении температуры до 80 °С время

жизни колонки сокращалось. На колонках с л-пролиновыми фиксированными лигандами л-энантимеры аминокислот всегда имели более высокие значения величин k' (исключение составлял пролин). На аналитической колонке длиной 25 см и внутренним диаметром 0,46 см без заметных изменений величин k' и разрешения можно разделить до 1,5 мг рацемической аминокислоты [125]. Удерживание аминокислот уменьшается при

Таблица 5.6. Влияние природы лиганда, привитого к силикагелю, на селективность расщепления аминокислот ($\alpha = k'_D/k'_L$) [126, 127] подвижной фазой, содержащей 0,05 М KH_2PO_4 , 0,1 мМ меди(II), рН 4,5—4,6, при 25—55 °С

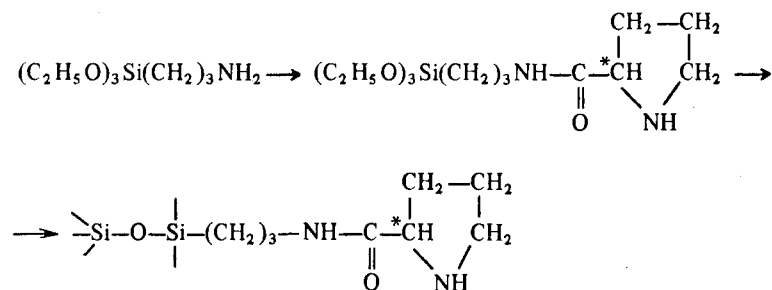
Рацемическая аминокислота	Неподвижный лиганд						
	L-Ala	L-Pro	L-Hyp	L-Pip	L-Val	L-His	L-Phe
Валин	1,00	0,67	0,83	0,55	0,69	1,00	1,00
Пролин	2,50	1,62	2,38	1,32	1,00	1,00	1,52
Треонин	0,85	0,62	0,69	0,61	0,80	1,00	1,14
Лизин	1,00	0,91	1,00	0,71	—	—	1,00
Аспарагиновая кислота	1,00	0,77	0,82	0,81	—	—	1,25
Гистидин	—	0,56	0,43	0,64	0,50	1,00	—
Фенилаланин	0,60	0,34	0,43	0,44	0,59	1,25	1,00
Тирозин	0,42	0,32	0,24	0,30	0,56	1,52	1,00
Триптофан	0,40	0,29	0,23	0,39	0,54	1,32	1,00
Метионин	1,00	0,91	1,00	0,75	—	—	1,12

увеличении ионной силы элюента, понижении рН и добавлении органических растворителей в элюент. Аминокислоты с ароматическими α -заместителями характеризуются наибольшим удерживанием и энантиоселективностью (α до 3,5 для триптофана).

В качестве металлов-комплексообразователей опробовали медь(II), кобальт(II), никель(II) и цинк, но приемлемые результаты были получены только с медью [126]. К силикагелю, обработанному 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом, помимо л-пролина прививали и другие аминокислотные хиральные лиганды [126, 127]. Циклические аминокислоты в роли фиксированных лигандов проявляли более высокую разрешающую способность, чем алициклические соединения, возрастающую в ряду азетидинкарбоновая кислота < пролин < гидроксипролин < пипеколиновая кислота (табл. 5.6).

Гюбитц и сотр. [128], используя фазы с привитыми л-гидроксипролиновыми остатками, успешно разделили ряд энантимеров 2-гидроксикислот, в том числе миндальной кислоты, ее 4-гидрокси-, 3-гидрокси-, 3,4-дигидроксипроизводных, 3-фенилмолочной кислоты, атрولاктиновой кислоты и 2-гидроксикапроновой кислоты. В качестве элюента использовали чистую воду с добавлением 10^{-4} М сульфата меди. Применение в качестве элюентов буферов вызывало снижение удерживания и разрешения. Этот же эффект наблюдали при добавлении ацетонитрила. Хотя эффективность системы при комнатной температуре была сравнительно низкой, высокая энантиоселективность (α от 0,3 до 0,8) позволяла достичь четкого разрешения каждой пары энантимеров и детектировать компоненты при 223 нм. Следует отметить, что на хиральных фазах с привитыми лигандами других типов (пролин, валин, гистидин, фенилаланин, азетидинкарбоновая кислота, пипеколиновая кислота, пропилендиамин, эфедрин и винная кислота) наблюдалось лишь незначительное разделение изомеров гидроксикислот или оно вообще не шло. Замена меди(II) ионами других переходных металлов также приводила к ухудшению разрешения.

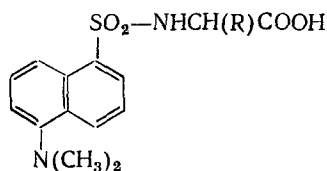
Фуко и сотр. [124] использовали карбоксильную группу л-пролина для образования связи с силикагельной матрицей. 3-Аминопропилтриэтоксисилан ацилировали л-пролином и прививали к поверхности силикагеля:



Несмотря на участие в образовании амидной связи, остаток л-пролина сохранял способность вступать в координационное взаимодействие с медью(II) и через нее удерживать подвижные аминокислотные лиганды. Энантиоселективность полученного сорбента была достаточно высокой, но из-за относительно низкой эффективности колонки при использовании в качестве элюента смеси водный ацетонитрил (47:53)—0,17 М раствор аммиака из восьми исследованных аминокислот были частично разделены только триптофан, фенилаланин и тирозин, причем D-изомеры выходили перед л-антиподами.

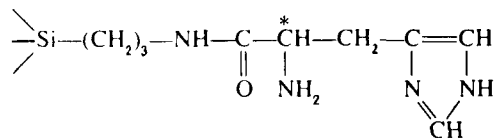
Линднер [129] более детально исследовал этот сорбент.

Он провел реакцию между силикагелем с 3-аминопропильными группами, лихросорбом NH_2 , и гидроксисукцинимидным эфиром *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*l*-пролина и затем обработкой трифторуксусной кислотой удалял защитные *трет*-бутилоксикарбонильные группы (*трет*-БОК). Кроме того, Линднер использовал для разделения и другие сорбаты, в частности 5-диметиламино-нафталин-1-сульфониламино кислоты (дансилпроизводные аминокислот):



При использовании в качестве элюента смеси ацетонитрил — 0,1 М аммиак при pH 9,0 удалось разделить все (за исключением пролина) дансилпроизводные аминокислот с селективностью от 1,04 (Тур) до 3,16 (Асп), причем, когда сорбент был заряжен медью (II), *l*-изомеры выходили из колонки первыми. Когда роль иона-комплексообразователя играл кадмий (II), порядок элюирования энантиомеров менялся на обратный с одно-временным ухудшением разрешения; селективность изменялась от 1,08 (аллоизолейцин) до 1,61 (метионин). Тем не менее в последнем случае в *l*-продукте удавалось вполне надежно детектировать даже 0,2%-ную примесь дансил-*D*-Met. При повышении температуры до 50°C эффективность колонки несколько повышалась при одновременном ухудшении селективности. Замена ацетонитрила в элюенте на метанол приводила к некоторому снижению селективности.

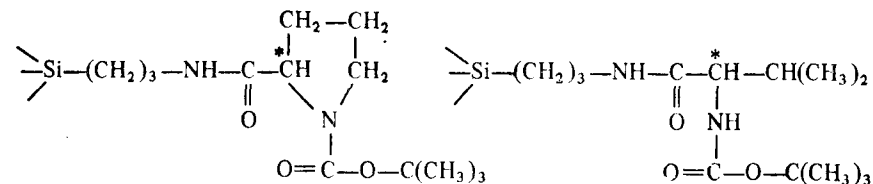
Применение 1,1'-карбонилдиимидазола делает метод прививки *трет*-БОК-защищенных хиральных аминокислот к аминофазе [130] более универсальным и удобным, чем использование гидроксисукцинимидных эфиров *N*-БОК-аминокислот. БОК-His(tosyl) присоединяют к аминопропильной группе, получая хиральную привитую фазу следующей структуры [после удаления защитных БОК-групп трифторуксусной кислотой и толуолсульфонильных (тозилных, tosyl) групп гидроксibenзотриазолом]:



При использовании в качестве элюента 0,066 М фосфатного буфера с pH 4,56, содержащего 10^{-4} М сульфата меди, описан-

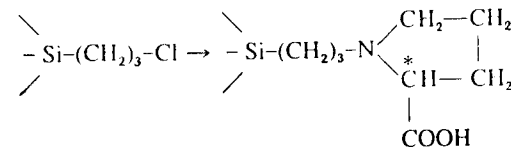
ный выше сорбент проявляет энантиоселективность по отношению ко всем исследованным аминокислотам с незащищенными амино- и карбоксильными группами. Селективность $\alpha = k'_D/k'_L$ изменялась от 1,03 (Асп) до 1,79 (Тур). Миндальную кислоту также можно расщепить на энантиомеры с селективностью $\alpha = 1,08$. Примечательно, что в этих экспериментах использовали кислый элюент, что увеличивало время жизни колонки, а при повышении pH было отмечено быстрое возрастание удерживания аминокислот.

В качестве самостоятельного хирального сорбента использовали промежуточный продукт, образующийся при получении описанного выше *l*-пролинамидного сорбента, содержащего *трет*-БОК защитные группы, а также его аналог, содержащий *l*-валин [131, 132]:



Как карбоксильная, так и аминогруппа этих лигандов были переведены в амидные группы, и тем не менее сорбенты выступают в роли лигандообменников, связывая медь (II) из элюента ацетонитрил — 0,1 М ацетат аммония (30:70) с pH 6,9, и эффективно разделяют дансиламино кислоты. В табл. 5.7 и на рис. 5.6 представлены данные по селективности и эффективности колонок, заполненных этими сорбентами.

Одним из предпочтительных способов получения энантиоселективных привитых фаз на основе силикагеля считается ковалентное связывание оптически активных лигандов на поверхности оксида кремния через алкиленовую группу. Сугден и др. [133] обрабатывали лихросорб Si-60 (5 мкм) 3-хлорпропилтрихлорсиланом, а затем *l*-пролином в кипящей смеси хлороформа и метанола (85:15) в присутствии иодида натрия и диизопропилэтиламина:



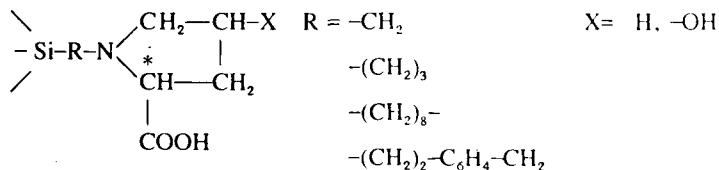
Полученный сорбент позволяет полностью расщепить рацематы пролина и 3,3-диметилпролина, а также частично фенила-

ланина при использовании в качестве элюента 1,0М раствора ацетата меди с рН 4,6. Гистидин, аланин и глутаминовую кислоту расщепить на энантимеры не удалось ввиду низкой эффективности и образования хвостов у пиков на колонке длиной 25 см. Предел обнаружения L-пролина составил 400 нг при 240 нм (максимум поглощения комплексов меди).

Таблица 5.7. Расщепление рацемических дансиламинокислот на хиральных фазах с привитыми амидами, содержащих остатки БОС—L-PRO и БОС—L-Val (элюент: ацетонитрил—0,1 М ацетат аммония (30 : 70), рН 6,9, 10^{-5} М CuSO_4 , температура 55 °С) [131]

Дансиламинокислота	Si—C ₃ NH—Pro—BOC			Si—C ₃ NH—Val—BOC		
	k'_D	k'_L	α	k'_D	k'_L	α
Серин	1,49	1,10	1,35	4,97	3,03	1,64
Треонин	1,68	1,19	1,41	2,96	2,46	1,20
Лейцин	3,29	2,71	1,21	4,60	4,23	1,08
Глутаминовая кислота	1,40	1,07	1,31	3,58	1,98	1,80
Норлейцин	3,80	3,06	1,24	—	—	1,00
Метионин	3,00	2,26	1,33	5,93	5,01	1,18
Фенилаланин	4,56	3,71	1,23	6,78	6,35	1,07
Норвалин	2,71	2,18	1,24	—	—	1,00
Валин	2,26	1,95	1,16	—	—	1,00
Аминомасляная кислота	2,12	1,71	1,24	—	—	1,00
Триптофан	—	—	1,00	8,88	6,20	1,43

Хиральные насадки такой же химической структуры были детально изучены исследовательскими группами Унгера и Даванкова [134], наряду с другими хиральными привитыми фазами, отличающимися длиной и природой углеводородного мостика между остатками L-пролина или L-гидроксипролина и поверхностью силикагеля лихросорб Si-100 ($d_p = 10$ мкм):



Исходными силилирующими агентами были соответственно хлорметилтриметоксисилан, 3-хлорпропилтриэтоксисилан, ω -

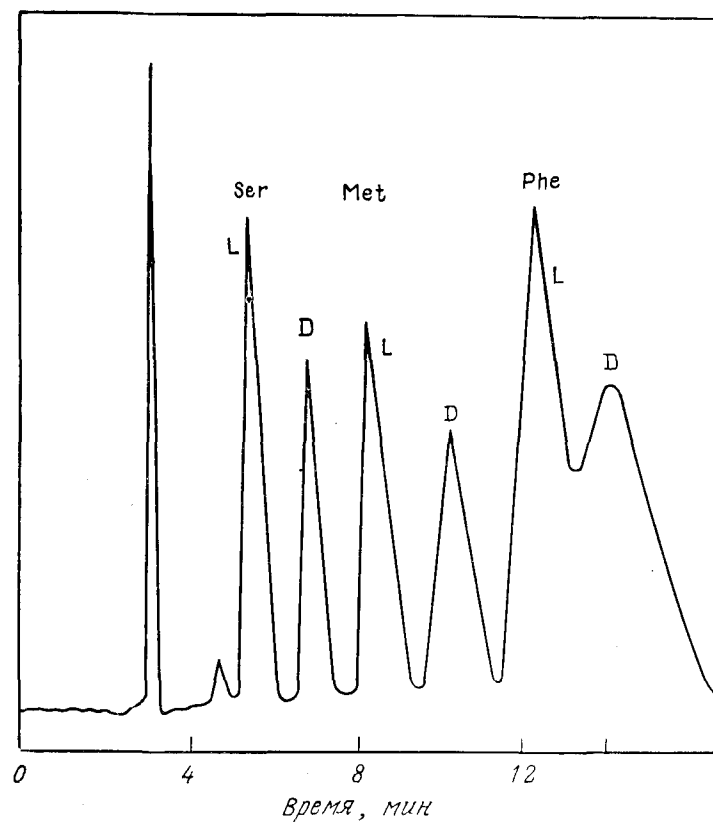


Рис. 5.6. Хроматограмма продуктов расщепления дансилпроизводных рацемических серина, метионина и фенилаланина. Насадка с привитыми трет-БОК-L-пролинамидными группами. Колонка размером 4,1×300 мм, $d_p = 10$ мкм, элюент 10^{-5} М сульфат меди в смеси ацетонитрил—0,1 М ацетат аммония (30 : 70), рН 6,9, расход 1 мл/мин; температура 55 °С [131].

бромоктилтрихлорсилан, 2-(*n*-хлорметилфенил)этилдиметилхлорсилан, которые прививали к поверхности силикагеля обычным способом, а затем атом галогена замещали на метиловый эфир L-пролина или L-гидроксипролина в присутствии иодида натрия. По другому варианту вначале проводили реакцию хлоралкилтриалкоксисилана с метиловым эфиром аминокислоты, а затем связывали полученный хиральный силоксан с силикагелем. Удовлетворительные результаты дает также и объединение двух описанных выше реакций замещения галогена на азот в силилирующем агенте и прививки полученного продукта к силикагелю. В оптимальных условиях с помощью любого из

описанных выше путей синтеза можно легко получить поверхностную концентрацию функциональных групп, равную 3 мкмоль/м². Удаление защитных сложноэфирных групп происходит при обработке сорбента раствором ацетата меди автоматически, причем его окраска постепенно из зеленой становится голубой, что указывает на образование аминокислотных комплексов меди.

Хиральные привитые фазы характеризуются хорошей энантиоселективностью по отношению ко всем α-аминокислотам. В табл. 5.8 приведены примеры расщепления различных пар энантиомеров. Исследование влияния состава элюента и температуры колонки на удерживание и хиральное распознавание энантиомеров аминокислот [135—137] показывает, что поведением энантиомеров управляет комплекс гидрофобных, электростатических и координационных взаимодействий с лигандообменным сорбентом. С повышением гидрофобности сорбента в указанном ряду вследствие увеличения длины алкиленовой мостиковой группы (метилен→пропилен→октилен→*n*-этиленбензил) постепенно возрастает удерживание ароматических аминокислот и аминокислот с большими алифатическими заместителями. Одновременно удерживание этих соединений сильно зависит от содержания органического компонента в элюенте (добавление метанола или ацетонитрила снижает удерживание гидрофобных веществ). Напротив, удерживание полярных аминокислот (например, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, гистидина и серина) при добавлении в элюент метанола остается практически без изменений. При разделении на слабо гидрофобном сорбенте, у которого γ-гидроксипропиловые лиганды связаны с силикагелем через метиленовые мостики, добавление в элюент органических растворителей вызывает увеличение удерживания полярных аминокислот. В этой системе гидрофобные взаимодействия играют минимальную роль и удерживание в основном определяется полярными и координационными взаимодействиями, которым благоприятствует частичная замена воды в элюенте органическим растворителем.

Образование разнолигандного сорбционного комплекса с хиральными лигандами, привитыми к силикагелю, составляет наиболее важный механизм удерживания аминокислот. Комплексы аминокислот с медью диссоциируют при pH ниже 3,5. В соответствии с этим удерживание всех аминокислот постепенно уменьшается при изменении pH элюента с 7 до 4.

Чисто электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными поверхностными силанольными группами характерно для сорбентов с короткой цепью (C₁ и C₃) между функциональной группой и поверхностью. Благодаря этому типу взаимодействия положительно заряженные аргинин и лизин

Таблица 5.8. Расщепление рацемических аминокислот на силикагеле с привитыми хиральными фазами общей формулы Si—R—L-Нур, различающимися пространственными группами R. Элюент: 10⁻² M NH₄OAc, 10⁻⁴ M Cu(OAc)₂, pH 5,0, температура 40 °C [134]

Аминокислота	R = —CH ₂ —			R = —(CH ₂) ₃ —			R = —(CH ₂) ₈ —			R = —(CH ₂) ₁₂ —		
	k'L	k'D	α	k'L	k'D	α	k'L	k'D	α	k'L	k'D	α
Asp	1,10	1,03	0,94	2,38	2,22	0,93	2,01	2,13	1,06	16,83	16,53	0,98
Glu	1,02	1,13	1,11	1,93	2,02	1,05	1,57	1,57	1,00	12,37	14,72	1,19
His	3,80	2,33	0,61	4,13	2,48	0,60	2,22	1,92	0,86	18,50	6,53	0,35
Ala	1,40	1,47	1,05	1,33	1,60	1,20	0,40	0,58	1,45	5,50	5,70	1,04
Asn	2,05	1,76	0,86	2,52	2,35	0,93	0,89	0,82	0,92	8,58	8,28	0,97
Ser	1,72	1,46	0,85	2,12	1,67	0,79	0,82	0,74	0,92	7,36	6,25	0,85
Pro	1,93	2,51	1,30	1,93	3,15	1,63	1,07	2,06	1,93	16,43	16,33	0,99
Thr	2,14	1,94	0,91	2,78	2,32	0,83	1,14	1,16	1,02	11,73	11,50	0,98
Val	2,10	2,12	1,01	3,00	2,52	0,84	2,81	2,71	0,96	14,38	10,80	0,75
Lys	2,77	2,61	0,94	1,67	1,83	1,10	0,07	0,06	0,86	2,05	2,23	1,09
Tyr	2,30	1,52	0,66	5,85	3,67	0,63	12,25	9,72	0,79	28,58	19,73	0,69
Met	2,87	2,82	0,98	4,12	3,90	0,95	4,65	4,56	0,98	19,18	16,85	0,88
Arg	3,40	3,44	1,01	2,58	2,78	1,08	0,31	0,39	1,26	3,80	3,50	0,92
Ile	2,45	2,52	1,02	4,25	3,82	0,90	5,86	5,94	1,01	21,95	14,43	0,41
Phe	3,35	2,87	0,86	8,32	5,78	0,69	17,60	15,45	0,88	33,18	29,10	0,88
Leu	2,83	3,02	1,07	3,50	3,45	0,99	4,80	5,14	1,07	20,46	14,43	0,71
Trp	4,69	2,69	0,57	16,12	9,37	0,58	—	—	—	100,70	28,87	0,29

удерживаются сильнее всех аминокислот. Напротив, они плохо удерживаются на сорбентах с октиленовыми и этиленбензильными мостиковыми группами, которые экранируют поверхностные силанольные группы гораздо более эффективно, чем метиленовые мостики.

Добавление ацетата аммония в элюент снижает величины k' для большинства систем. Это можно объяснить тем, что молекулы аммиака и ацетат-ионы конкурируют с подвижными аминокислотными лигандами в процессе комплексообразования. Добавление соли снижает также вклад всех электростатических взаимодействий.

Влияние изменения параметров хроматографического эксперимента на хиральное распознавание энантиомеров будет рассмотрено в другом месте. В общем энантиоселективность рассмотренных силикагельных хиральных фаз не очень высока (табл. 5.8). Тем не менее благодаря довольно хорошей эффективности колонок при температурах 40 °С и выше смесь из пяти-шести рацемических аминокислот можно расщепить на составляющие ее энантиомеры, как это показано на рис. 5.7 и 5.8.

Общее направление развития синтеза силикагельных хиральных сорбентов четко отражает основную тенденцию современной жидкостной хроматографии, состоящую в повышении эффективности хроматографических систем. Применительно к ЛОХ энантиомеров эта тенденция привела к реальной возможности анализировать энантиомерный состав почти всех хиральных соединений, способных вступать в координационное взаимодействие с ионами переходных металлов. Уже в наших первых публикациях [138], а также в обзорной работе, посвященной вопросам энантиоселективности координационных соединений [139], вопреки установившемуся мнению было высказано утверждение, что энантиоселективность в лабильных хиральных комплексах скорее правило, чем исключение. В связи с этим при увеличении эффективности хроматографических колонок найдут практическое применение новые системы, в том числе и с очень низкой энантиоселективностью. Чем выше эффективность колонки, тем шире ее применение, поскольку эффективность в значительной мере компенсирует низкую селективность системы.

В настоящее время мы знаем, что лигандообменные процессы в некоторых лабильных комплексах могут протекать слишком медленно [140], не удовлетворяя требованиям современной высокоскоростной хроматографии. В большинстве случаев и селективность, и эффективность колонки, функционирующей по лигандообменному механизму, можно регулировать путем изменения тех же параметров, что и в других видах хроматогра-

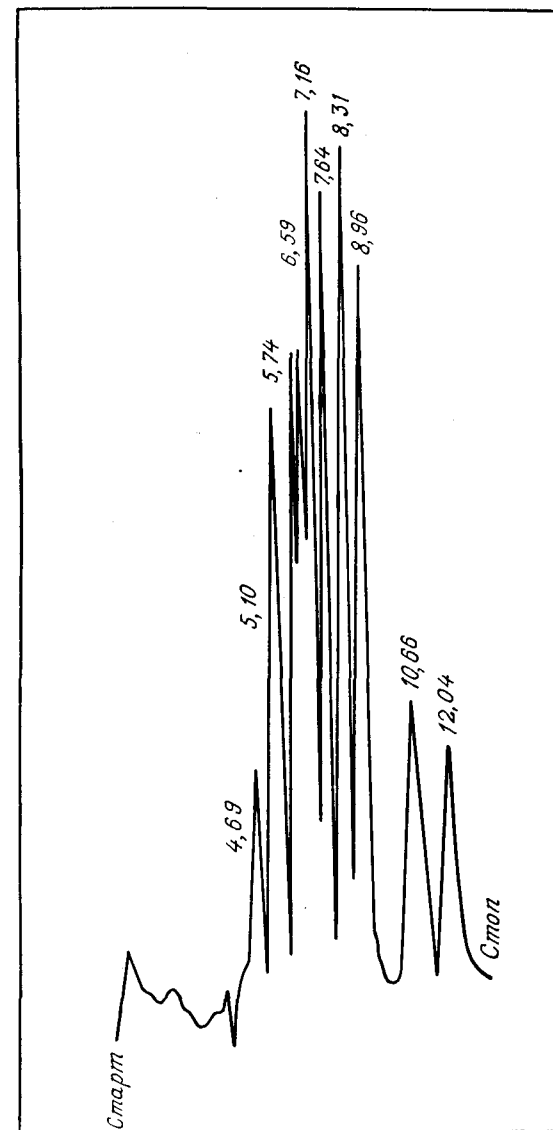


Рис. 5.7. Хроматограмма продуктов расщепления рацемических аминокислот на сорбенте с привитыми *N*-пропил-*L*-гидроксипропиловыми группами на колонке размером 4,0×250 мм, $d_p=10$ мкм, элюент 10^{-4} М ацетат меди(II), 0,01 М ацетат аммония, pH 4,3, расход 0,75 мл/мин, температура 50 °С. Последовательность элюирования: D,L-Gln, L-Ala, D-Ala, D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-Phe, L-Phe [135].

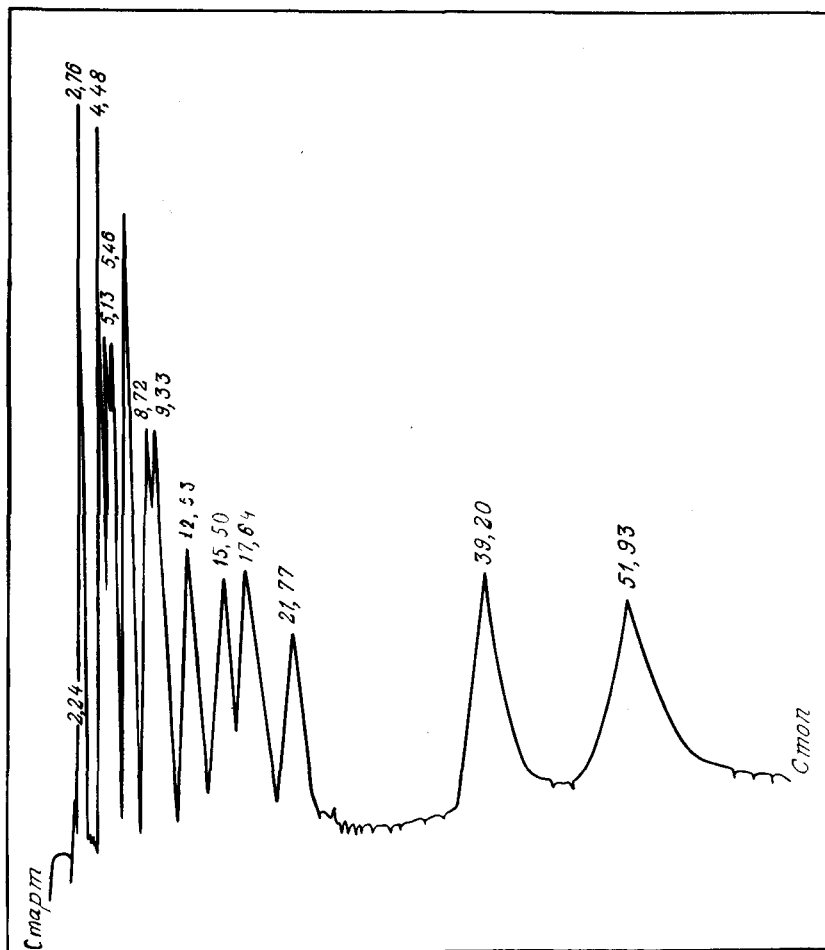


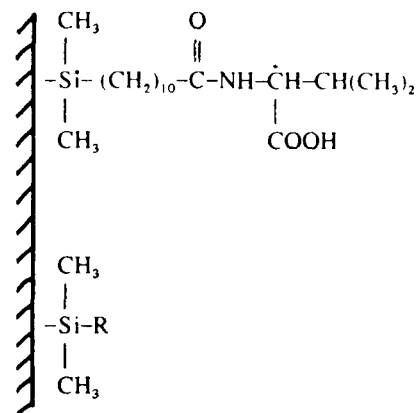
Рис. 5.8. Хроматограмма продуктов расщепления шести рацемических аминокислот на сорбенте с привитыми N-октил-L-гидроксипропиловыми группами на колонке размером $4,6 \times 100$ мм, $d_p = 10$ мкм, элюент 10^{-4} М ацетат меди(II), 0,01 М ацетат аммония, pH 4,8, метанол — вода (30 : 70), расход 1,5 мл/мин, температура 50°C . Последовательность элюирования: D,L-Arg, L-Pro, D-Ser, L-Ser, D-Pro, D-Gln, L-Gln, D-Tyr, L-Tyr, D-Phe, L-Phe, D-Trp, L-Trp [136].

фии. К числу наиболее важных из таких параметров следует отнести температуру колонки и состав подвижной фазы (величину pH, содержание и тип органического растворителя, содержание и тип неорганических или органических солей). Естественно, исключительно важна эффективность матриала насадки колонки. Здесь требуется такая же оптимизация условий при-

готовления хиральных лигандообменников, как и при приготовлении всех современных хроматографических сорбентов.

В дополнение к хорошо известным механическим, химическим и структурным параметрам, которым должен удовлетворять сорбент для получения высокоэффективной и селективной колонки, Каргер и сотр. [141] указали на концентрацию хиральных лигандов в химически привитой фазе как на важную переменную, оказывающую сильное влияние на поведение силикагельных лигандообменников. Авторы провели сравнение хиральных привитых фаз двух типов. В первом из них к силикагелю в форме сферических частиц диаметром 5 мкм прививали N-ω-(диметилсилоксил)ундеканоил-L-валин. После зарядки медью(II) сорбент проявлял высокую энантиоселективность при разделении целого ряда рацемических дансилпроизводных аминокислот [141], а также оснований Шиффа, полученных из салицилового альдегида и первичных аминоспиртов, включая катехоламиноспирты [142].

При приготовлении сорбентов второго типа [141] монохлорсилан того же ундеканойл-L-валина прививали в различных соотношениях с другими хлорсиланами, которые могли выполнять функцию разбавителей по отношению к лигандообменным центрам сорбции. Были привиты такие инертные группы, как бутильная, децильная, эйкозильная 3-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]пропильная



R = C₄H₉

C₁₀H₂₁

C₂₀H₄₁

(CH₂)₃O(CH₂CH₂O)₂CH₃

Эти разбавители в зависимости от их химической структуры и концентрации изменяют пространственное окружение вокруг привитых лигандообменных групп, тем самым изменяя дополнительные взаимодействия разнолигандных сорбционных комплексов с близлежащими участками привитого слоя. В ряде

случаев было найдено, что удерживание и селективность α -дансил-аминокислот при разделении на хиральных фазах, разбавленных децильными группами, являются значительно большими, чем на неразбавленных фазах, несмотря на то что количество удерживаемой меди (II) в неразбавленных фазах намного выше [141].

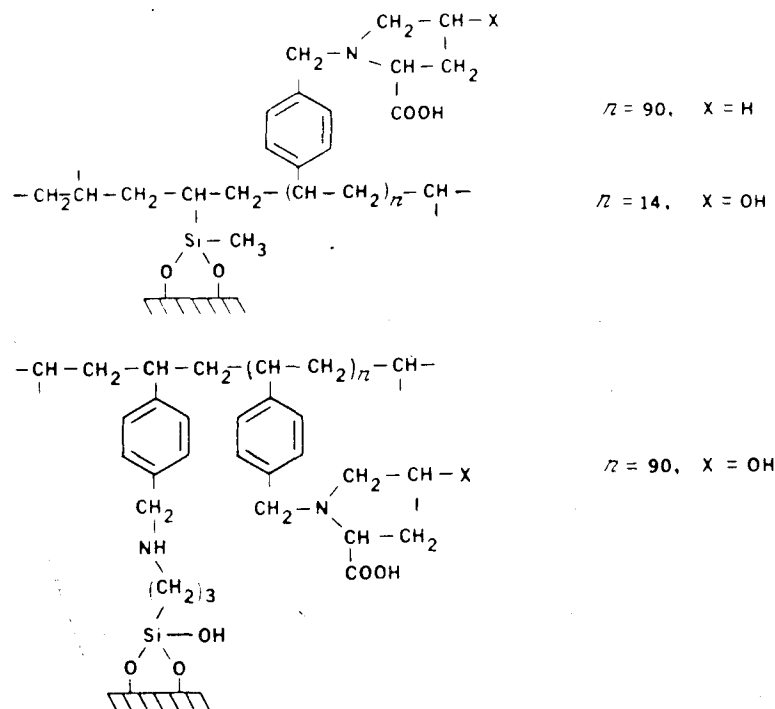
Исключительно важна химическая стабильность хиральных фаз на основе силикагеля. Хотя полистирольные лигандообменники, вероятно, по-прежнему превосходят в этом отношении силикагельные сорбенты, время жизни большинства сорбентов на основе оксида кремния должно быть достаточно большим. Только хиральные фазы с поверхностными 3-аминопропилсилановыми группами оказываются сравнительно лабильными при их эксплуатации в области рН выше 5—6 и повышенных температурах. Благодаря гибкости триметиленовых групп аминогруппы могут достигать соседних привитых групп и действовать как внутренний катализатор при их отрыве от силикагельной матрицы.

Для увеличения гидролитической стабильности силикагельных привитых фаз недавно к силикагелю стали прививать промежуточный слой органического полимера, связанный с ним в нескольких местах. Частичный гидролиз таких связей еще не означает потерю привитой фазы. При первой попытке реализации этой идеи полистирольные цепи, содержащие остатки ϵ -пролина и γ -гидроксипролина, прививали к поверхности микрочастиц силикагеля [143].

В соответствии с одной из методик, разработанных для химической прививки коротких полистирольных цепей длиной 100—250 мономерных единиц к поверхности лихросорба Si-100, был приготовлен сополимер стирола с небольшим количеством метилвинилдиметоксисилана. Этот сополимер хлорметилировали, а затем вводили в реакцию с силанольными группами носителя, после чего известным способом, разработанным для полистирольных сорбентов, проводили замещение хлора на остатки хиральных аминокислот. Во втором методе хлорметилированный полистирол вводили в реакцию с небольшим количеством 3-аминопропилтриэтоксисилана, а затем прививали его к поверхности силикагеля. Таким способом были получены привитые слои с различной длиной групп между полимерной цепью и поверхностью матрицы [143] (см. схему реакции на стр. 153).

Помимо химических связей в плотное покрытие поверхности силикагеля цепями полистирола вносит свой вклад и адсорбция. Все попытки заблокировать оставшиеся на поверхности силанольные группы обработкой триметилхлорсиланом (как до, так и после замещения хлорметильных групп полистирола на остатки аминокислот) приводили к возрастанию общего содержания

углерода менее чем на 1% (содержание углерода в сорбенте достигает 17—20%, что соответствует 1,4—1,6 ммоль стирольных звеньев на 1 г сорбента). Концентрация фиксированных на полимере аминокислотных лигандов составляет приблизительно 0,6 ммоль/г. Как и ожидали, силикагельные лигандообменники с промежуточным полимерным слоем обладают хорошей стабильностью даже при температурах 50—65 °С.



Благодаря высокой поверхностной плотности частично незамещенных стирольных звеньев описанная выше привитая фаза проявляет гидрофобные свойства. В связи с этим удерживание гидрофобных аминокислот (Trp, Phe, Leu, Tyr) оказалось особенно сильным, но оно резко уменьшается при добавлении в водный элюент 20—30% органического растворителя. Показательно, что основная аминокислота лизин имеет наименьшее удерживание в исследованном интервале рН от 4,6 до 5,0, когда лизин заряжен положительно и должен активно взаимодействовать с поверхностными силанольными группами, если они стерически не заблокированы промежуточным слоем полистирола.

Как показано на рис. 5.9, по эффективности силикагельные хиральные фазы с промежуточным полимерным слоем не усту-

пают мономерным привитым хиральным фазам, что позволяет разделить на энантиомеры смесь нескольких рацемических аминокислот. При проведении ЛОХ на этих сорбентах неожиданно было обнаружено, что на плотно прилегающей к поверхности силикагеля хиральной фазе (короткие мостиковые группы и небольшое расстояние между двумя соседними связями с поверх-

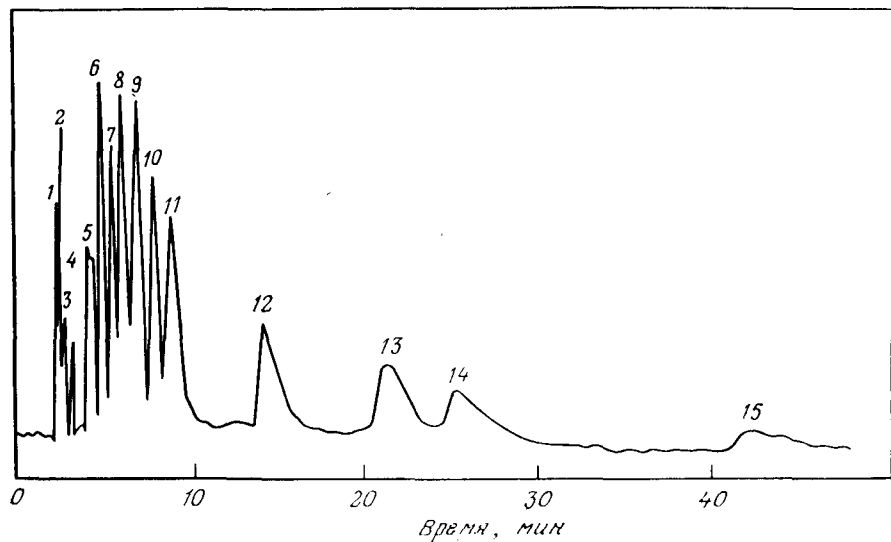


Рис. 5.9. Хроматограмма продуктов расщепления рацемических аминокислот на силикагельном сорбенте с полистирольным покрытием с привитыми L-гидроксипролиновыми группами на колонке размером $4,2 \times 250$ мм, $d_p = 10$ мкм, элюент 10^{-4} М ацетат меди, $0,05$ М $N(Bu)_4OAc$, pH 4,6, расход 1 мл/мин, температура $65^\circ C$. Порядок элюирования: 1 — D,L-Lys; 2 — D,L-Arg; 3 — неизвестное вещество; 4 — D-Ala; 5 — L-Ala; 6 — D-Ser; 7 — L-Ser; 8 — D-His; 9 — D-Thr; 10 — L-Thr; 11 — L-His; 12 — D-Met; 13 — L-Met; 14 — D-Eth; 15 — L-Eth [143].

ностью матрицы) получен обратный порядок элюирования энантиомеров аминокислот по сравнению с полимерной фазой, менее плотно прилегающей к поверхности силикагеля. В последнем случае D-изомеры выходят из колонки после L-изомеров, что также характерно для полистирольных сорбентов с L-пролиновыми и L-гидроксипролиновыми лигандами. Это явление можно объяснить (см. далее) стерическим взаимодействием поверхности силикагеля с разнолигандными сорбционными комплексами, образующимися в непосредственной близости от поверхности.

Завершая раздел о полимерных хиральных привитых фазах, целесообразно привести пример хроматографического разделения смеси 11 рацемических аминокислот на силикагельных сор-

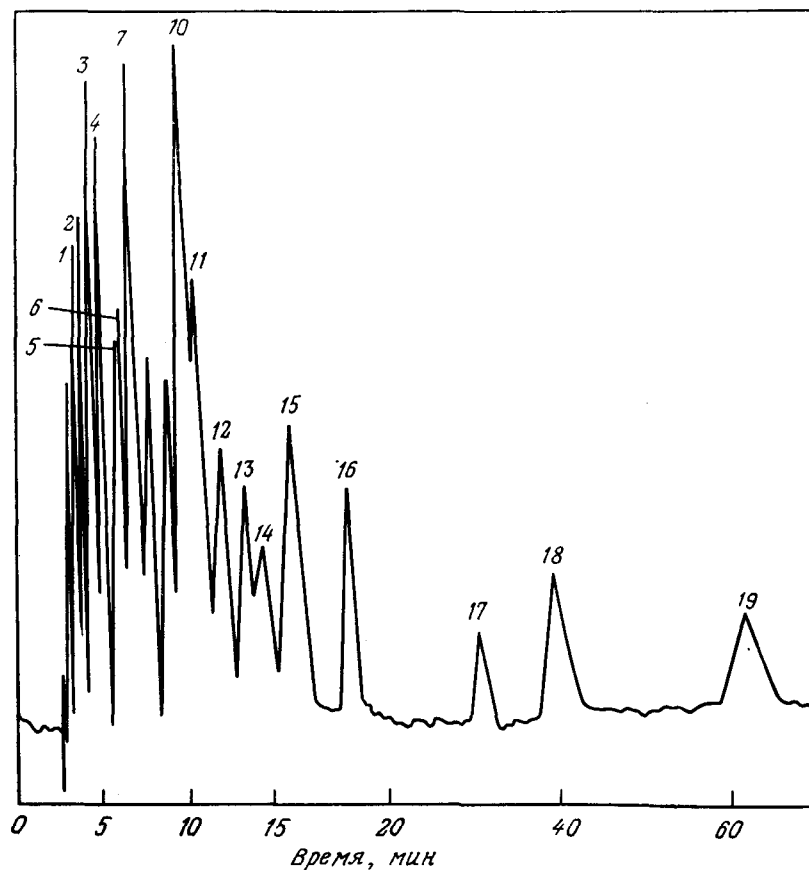
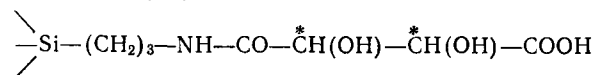


Рис. 5.10. Хроматограмма продуктов расщепления 11 рацемических аминокислот на N' -бензил-1,2(R)-пропандиаминосодержащем силикагельном сорбенте с полистирольным покрытием. Колонка размером $4,2 \times 250$ мм, $d_p = 10$ мкм, элюент 10^{-4} М ацетат меди, $0,01$ М ацетат аммония, вода — ацетонитрил (70 : 30), pH 4,0, расход $0,5$ мл/мин, температура $75^\circ C$. Порядок элюирования: 1 — D-Pro; 2 — L-Pro; 3 — D-Ala; 4 — L-Ala; 5 — D-Ser; 6 — L-Ser; 7 — D-Val; 8 — D-Thr; 9 — L-Thr; 10 — D-Leu+D-Met+D-Ile; 11 — L-Val; 12 — D-Tyr; 13 — L-Met; 14 — L-Leu; 15 — L-Tyr+L-Ile; 16 — D-Phe; 17 — L-Phe; 18 — D-Trp; 19 — L-Trp.

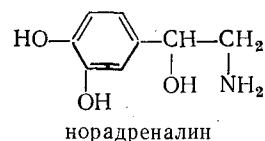
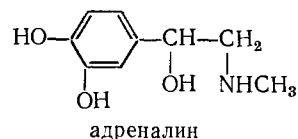
бентах с промежуточным полимерным слоем из полистирола с привитыми хиральными лигандами N',N' -дибензил-1,2-пропандиамина, свидетельствующий о высокой эффективности и широких возможностях использования этих сорбентов (рис. 5.10).

В дополнение к описанным выше многочисленным хиральным фазам аминокислотного и N',N' -дибензил-1,2-пропандиами-

нового типов недавно был синтезирован сорбент на основе силикагеля с привитой L-(+)-винной кислотой:



Синтез проводили [144] путем прививки амида N-[3-(триметоксисилилпропил)]-L-(+)-диацетилвинной кислоты к поверхности силикагеля с последующим удалением защитных ацетильных групп. В этом случае важно, чтобы карбоксильная группа привитой винной кислоты была свободна для комплексообразования с ионами меди (II). Только в такой форме хиральный лигандообменник проявляет способность расщеплять энантиомеры катехоламинов

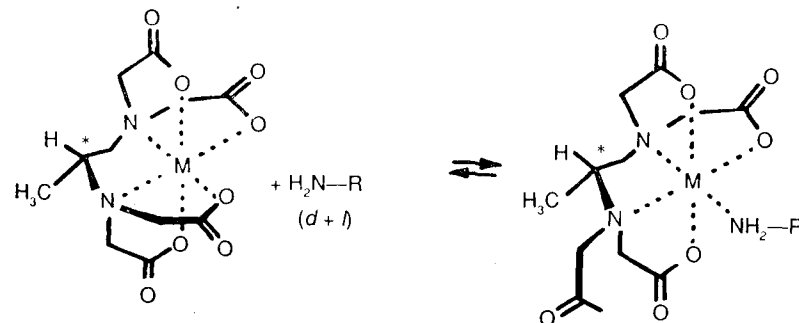


ароматических аминокислот (фенилаланина, триптофана, 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА), метил-ДОФА, 3-О-метил-ДОФА) и миндальную кислоту [145]. Крайне интересно, что в аммиачно-ацетатном буфере (pH 5,5—7,5) D-энантиомеры удерживаются сильнее, чем соответствующие L-энантиомеры, тогда как при использовании фосфатного буфера (pH 4,5—5,5) отмечен обратный порядок выхода. В фосфатном буфере достигнута более высокая эффективность колонки. Насыщение сорбента ионами никеля (II) и кобальта (II) не приводит к разрешению энантиомеров.

5.2.3. Покрытие силикагеля хиральными лигандами

Одну из первых попыток использовать энантиоселективные эффекты при образовании лабильных разнолигандных комплексов для хроматографического расщепления рацемических соединений предприняли Бернауэр и Фондершмит с сотр. [146—148]. Исследователи насыщали ионообменную смолу дауэкс 1×2 оптически активными анионными комплексами и использовали полученную систему для разделения рацематов. Таким способом можно определить разницу во взаимодействии анионного комплекса железа (III) — (D-ОПТА)⁻, где D-ОПТА — D-β-гидроксиэтилпропилендиаминтриацетат, с энантиомерными формами N-ацетил и N-бензоилпроизводных аланина, фенилаланина, лейцина и метионина [147]. Эта разница приводит к частичному расщеплению рацематов, причем максимальная оптическая чистота фракций элюата составляла 4,8—25,8%. Общая селективность

сорбции изменялась от 1,025 до 1,063. Поскольку измерения проводились с различными растворителями, изменявшими величины α, стереоселективность можно было объяснить разностью энергий сольватации диастереомерных разнолигандных комплексов. Более сильные селективные эффекты отмечены [148] для никелевых, медных и цинковых комплексов D-(—)-пропилендиаминтетраацетата M^{II}(ПДТА)²⁻ с 1-фенилэтиламином с селективностью α, равной соответственно 1,7, 1,6 и 1,4. В этом примере разделение можно проводить в чистой воде, поскольку фенилэтиламин не может вытеснить двухзарядный хиральный расщепляющий комплекс из анионообменника. Даже на сравнительно коротких колонках (37 см) было достигнуто приблизительно 60%-ное расщепление 1-фенилэтиламина. Помимо этого практического результата работы [146—148] интересны еще с двух точек зрения: 1) было показано, что сорбционное модифицирование нехиральных сорбентов хиральными расщепляющими лигандами или комплексами является перспективным направлением получения хиральных насадок; 2) впервые было показано, что монодентатный лиганд может энантиоселективно координироваться в хиральную тройную структуру:



Используя ту же самую идею превращения коммерческих нехиральных сорбентов в хиральные лигандообменники, обращенно-фазовый силикагельный сорбент лихросорб RP-18 динамически покрывали N-алкилпроизводными L-гидроксипролина [149]. Привитые N-алкильные группы (n-C₇H₁₅, n-C₁₀H₂₁ и n-C₁₆H₃₃) L-гидроксипролина обеспечивали прочную адсорбцию расщепляющего хирального агента на гидрофобном поверхностном слое обращенно-фазового сорбента. N-Алкильные остатки хирального модификатора тем или иным образом распределены между C₁₈H₃₇-цепями, привитыми к поверхности силикагеля. Содержание органического растворителя в элюенте не должно быть выше определенного предела, чтобы не вызывать вымывания из колонки хирального модификатора. Поскольку гидро-

фильная аминокислотная часть N-алкил-L-гидроксипролина направлена в сторону полярной подвижной фазы, она доступна для образования тройных комплексов с ионами меди(II) и подвижными лигандами. Энантиоселективность подобных систем оказалась очень высокой: для D,L-пролина $\alpha = 16,4$, для D,L-валина

Таблица 5.9. Представительные коэффициенты емкости k'_L и k'_D , а также энантиоселективность α для аминокислот на колонке^а с лихросорбом RP-18 с хиральным модификатором C₁₆-L-Нур и колонке^б с зорбаксом C₈ с хиральным модификатором C₁₀-L-His [149, 150]

Аминокислота	C ₁₆ -L-Нур			C ₁₆ -L-His		
	k'_L	k'_D	α	k'_L	k'_D	α
Аспарагиновая кислота	0,08	0,10	1,17	0,86	0,63	0,73
Глутаминовая кислота	0,13	0,17	1,33	2,39	2,39	1,00
Гистидин	0,97	0,57	0,59	0,50	0,50	1,00
Аланин	0,58	0,91	1,56	2,48	3,55	1,35
Аспарагин	0,66	0,66	1,00	0,63	0,63	1,00
Гидроксипролин	0,65	1,24	1,91	—	—	—
Глутамин	0,68	0,85	1,25	—	—	—
Серин	0,73	0,73	1,00	1,23	1,54	1,25
Пролин	0,81	6,10	7,54	4,66	6,70	1,44
Цитруллин	0,86	1,06	1,29	2,00	2,00	1,00
Треонин	0,83	0,85	1,02	1,03	1,33	1,29
Аминомасляная кислота	1,00	2,49	2,49	7,20	11,60	1,61
Валин	1,63	7,42	4,55	19,33	35,33	1,83
Норвалин	2,33	7,94	3,41	—	—	—
Тирозин	2,51	7,01	2,79	31,78	44,22	1,39
Метионин	2,54	5,06	1,99	34,00	43,00	1,26
Аргинин	2,97	3,67	1,24	4,77	4,77	1,00
Лейцин	5,01	17,82	3,56	—	—	—
Фенилаланин	10,33	38,30	3,71	—	—	—
Триптофан	21,52	54,22	2,52	—	—	—

^а Элюент 10⁻⁴ М Cu(OAc)₂ в водном метаноле 85 : 15, 25 °С.

^б Элюент 10⁻⁴ М Cu(OAc)₂ в воде, 35 °С.

$\alpha = 6,9$. За исключением гистидина D-аминокислоты удерживаются сильнее L-энантиомеров. Из 26 различных исследованных аминокислот (табл. 5.9) только аспарагин, серин и орнитин, имеющие полярные боковые цепи, нельзя разделить на колонке длиной 10 см. Как показано на рис. 5.11, для полного расщепления рацематов шести аминокислот достаточно колонки длиной 10 см с насадкой, покрытой N-гексадецил-L-гидроксипролином. Предел обнаружения обычным УФ-детектором при 254 нм составляет приблизительно 10⁻¹⁰ моль, т. е. 10⁻⁸—10⁻⁹ г аминокислоты с коэффициентом емкости k' , приблизительно равным двум. Данные табл. 5.9 и рис. 5.11 показывают, что гидрофобное взаи-

модействие вносит существенный вклад в удерживание подвижных лигандов в описываемых системах: сильнее других удерживаются триптофан, фенилаланин и норлейцин. Энантиоселективность расщепления этих и других аминокислот, способных вступать в гидрофобное взаимодействие с обращенно-фазовой

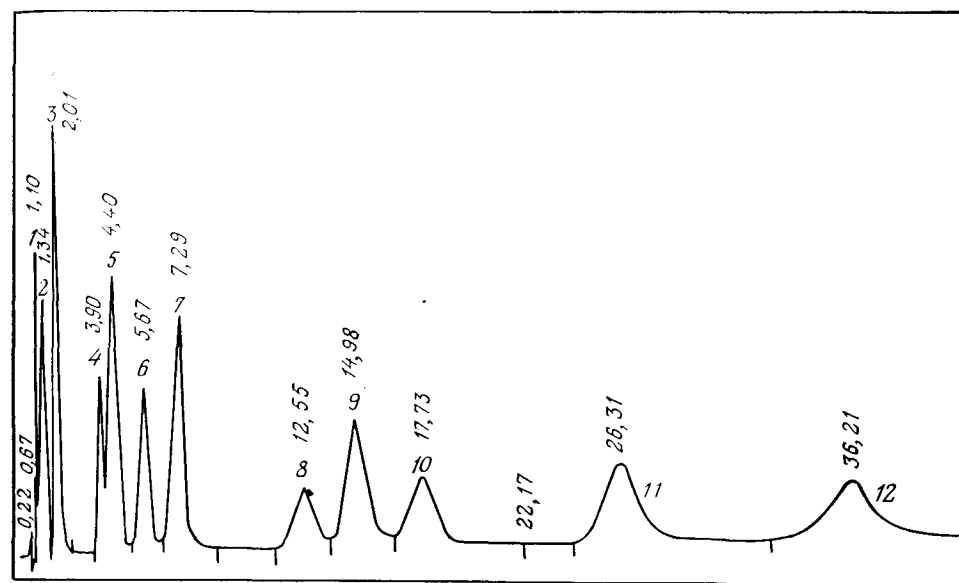
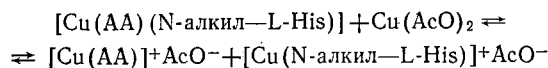


Рис. 5.11. Хроматограмма продуктов расщепления шести рацемических аминокислот на лихросорбе RP-18 с C₁₆-L-гидроксипролиновым покрытием. Колонка размером 4,2×100 мм, $d_p = 5$ мкм, элюент 10⁻⁴ М ацетат меди, метанол—вода (15 : 85), pH 5,0 расход 2,0 мл/мин, температура 20 °С. Последовательность элюирования: 1—L-Ala; 2—D-Ala; 3—L-Nva; 4—L-Leu; 5—L-Nle; 6—D-Nva; 7—L-Phe; 8—D-Leu; 9—L-Trp; 10—D-Nle; 11—D-Phe; 12—D-Trp [149].

насадкой, исключительно высока, что позволяет проводить препаративное разделение.

При аналитическом применении обращенно-фазовых сорбентов, модифицированных N-алкилпроизводными хиральных аминокислот, в качестве расщепляющего агента, по-видимому, удобнее использовать N-алкил-L-гистидин [150]. В этом случае энантиоселективность расщепления аминокислот не превышает двух ($\alpha = 2$), что благоприятствует количественному сравнению площадей двух пиков и снижает погрешность количественного определения энантиомерного состава аминокислот. Из 23 исследованных рацемических аминокислот 17 можно расщепить на энантиомеры в водном элюенте, не содержащем никаких других

добавок, кроме ацетата меди (10^{-4} М), на колонке длиной 10 см. В отношении хроматографических параметров, влияющих на удерживание и расщепление энантимеров аминокислот, покрытие из *N*-децил-*L*-гистидина ведет себя аналогично *N*-алкил-*L*-гидроксипролиновому покрытию. Увеличение содержания органического растворителя в элюенте и уменьшение рН подвижной фазы приводят к снижению удерживания и энантиоселективности, тогда как повышение температуры колонки и концентрации меди в элюенте снижает только удерживание аминокислот, но не селективность. Это наблюдение требует небольшого разъяснения, поскольку оно справедливо для всех лигандообменных систем, в которых удерживание подвижного лиганда связано с образованием тройных комплексов. В соответствии с равновесием

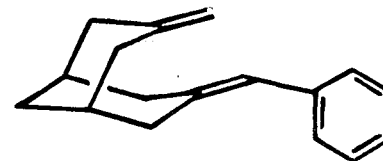


повышение концентрации $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ в элюенте благоприятствует образованию разнолигандных аминокислотно-ацетатных медных комплексов и облегчает элюирование аминокислот (АА).

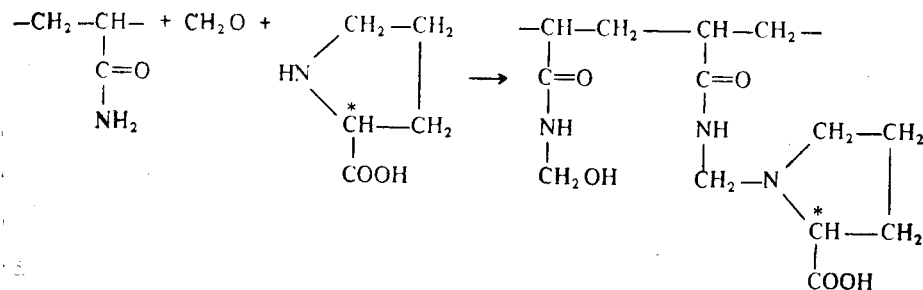
Очень простую методику модифицирования насадки колонки путем сорбции хиральных лигандов можно легко распространить на различные новые системы. На обращенно-фазовых сорбентах из водных растворов сорбируется даже *L*-фенилаланин [151] в количествах, достаточных для превращения их в хиральные лигандообменники. На обработанной таким способом насадке из μ -бондапака С-18 с размером частиц 10 мкм (колонка длиной 540 мм, диаметром 4,6 мм) в водном элюенте, содержащем $5 \cdot 10^{-4}$ М CuSO_4 , было достигнуто хорошее расщепление на энантимеры смеси *n*-гидроксиминдальной, *m*-гидроксиминдальной и миндальной кислот. Левовращающие энантимеры образуют более прочные сорбционные комплексы. Более сильное удерживание изомеров незамещенной миндальной кислоты по сравнению с гидроксизамещенными аналогами указывает на то, что модифицированный фенилаланином сорбент сохраняет свою в целом гидрофобную природу. Аналогичным образом, в системе, полученной сорбцией комплекса палладия(II) с *S*-этил-*L*-цистеином на сорбенте μ -бондапак С-18, *L*-метионин удерживается сильнее *D*-метионина при элюировании водным метанолом (60:40) с рН 3, полученным добавлением ортофосфорной кислоты [152]. Следует отметить, что в этом эксперименте в элюент не добавляли ионов металла.

Простое препаративное разделение энантимеров 3-метил-7-бензилденбицикло[3,3,1]нона было проведено на силикагеле, обработанном 7,5% *d*-камфор-10-сульфонатом серебра [153]. В неполярном элюенте гексан—метанол (96:4) на

поверхности сорбента образуются π -комплексы ионов серебра с диеновыми молекулами.



Очевидно, что хиральное полимерное покрытие имеет преимущество перед низкомолекулярным покрытием в том отношении, что энергия адсорбции полимерных цепей на поверхности силикагеля достаточно высока, чтобы предотвратить унос покрытия элюентом. Буэ и др. [119] нашли применение этому преимуществу хиральных хелатообразующих полимеров. Реакцией между линейным растворимым полиакриламидом ($M_n = 23\,000$) с формальдегидом и *L*-пролином в водном щелочном растворе им удалось привить до 4,2 ммоль хирального лиганда на грамм полимера (т. е. степень замещения p изменялась от 0 до 0,90):



Сферосил ХОА 600 с размером частиц 5—7 мкм легко сорбировал полученный полимерный продукт из водного раствора в количестве 6—7 вес.%. Правда, исходная эффективность колонки длиной 10 см в 7000—8000 теоретических тарелок снижалась при этом до 1200 тарелок (пик нафталина, элюируемый *n*-гексаном). Эффективность 10-см колонки, заряженной ионами меди, при элюировании аминокислот водным элюентом снижалась еще сильнее до 100 теоретических тарелок, и поэтому, несмотря на высокую энантиоселективность насадки, полностью расщеплялись только отдельные рацематы. Для триптофана α составляла 2,45 при элюировании 0,1 М раствором KNO_3 в присутствии $2 \cdot 10^{-5}$ М соли меди. Интересно, что удерживание аминокислот изменялось пропорционально выражению $p(1-p)^2$, описывающему вероятность обнаружения одиночной привитой хиральной группы в составе полиакриламидной цепи. Эти оди-

ночные хиральные лиганды ответственны за удерживание подвижных лигандов путем образования тройных сорбционных комплексов, тогда как «визинальные» привитые группы, вероятно, образуют неподвижные комплексы с ионами меди (II) состава 2:1, которые могут оказаться слишком устойчивыми для участия в лигандном обмене. Это предположение достаточно убедительно подтверждается тем фактом, что величины k' достигают максимума при степени замещения полимера $p=0,33$ (около 2 ммоль L-Рго на грамм полимера).

В рассматриваемой системе удерживание подвижных лигандов заметно падает с увеличением количества вводимой пробы, тогда как, если колонка не перегружена, соотношение коэффициентов емкости двух энантиомеров $\alpha = k'_D/k'_L$ остается практически постоянным [119]. Аналогичная зависимость была отмечена [76] для хиральных систем, приготовленных прививкой L-пролина к поли(2,3-эпоксипропилметакрилату). Для других хиральных лигандообменных насадок, включая сорбирующие системы, полученные покрытием инертных матриц производными хиральных аминокислот, как k' , так и α практически не зависят от размера пробы.

Завершая рассмотрение хиральных комплексобразующих неподвижных фаз в ЛОХ энантиомеров, следует подчеркнуть, что благодаря превосходной химической стабильности и высокой обменной емкости в препаративном разделении превалируют полимерные насадки, и в особенности сорбенты на основе макропорчатого изопористого полистирола. Преимущественной областью применения химически и адсорбционно модифицированных силикагельных насадок является энантиомерный анализ сложных смесей, когда особенно важна эффективность колонки.

После того как аналитические возможности силикагельных сорбентов, покрытых хиральными лигандами, стали общепризнанными, было естественным распространить этот метод на тонкослойную хроматографию, что недавно двумя способами было проделано с обращенно-фазовыми тонкослойными пластинками.

В ходе экспериментов немецких исследователей [154] ТСХ-пластинки RP-18 погружали на 1 мин в 0,25%-ный раствор ацетата меди в смеси метанол—вода (1:9), высушивали на воздухе, вновь помещали в 0,8%-ный раствор (2S, 4R, 2'RS)-4-гидрокси-1-(2'-гидроксидодецил)пролина в метаноле и снова высушивали. После этого пластинка была готова к разделению энантиомеров аминокислот, поскольку на поверхности сорбента присутствуют медные комплексы L-гидроксипролина, к атому азота которого присоединена гидрофобная 2-гидроксидодецильная цепь. Ряд аминокислот были расщеплены на энантиомеры (Phe, Phe, Tug, Trp, Pro, Gln и 3-тиазолидин-4-карбоновая кислота) при помощи соответствующего элюента (метанол—вода—

ацетонитрил) с последующим проявлением зон 1%-ным раствором нингидрина. Как можно было ожидать в соответствии с закономерностями, установленными для колоночной хроматографии с аналогичными хиральными расщепляющими системами [149], D-изомеры аминокислот (за исключением тирозина) удерживались сильнее, чем L-антиподы, которые характеризовались большими значениями R_f .

Хиральные пластинки, приготовленные описанным способом, в настоящее время выпускаются фирмой Machery Nagel (ФРГ) под коммерческим названием Chiral-Plate. Область их применения была распространена [155] на синтетические аминокислоты, N-метилированные аминокислоты, N-формиламинокислоты и другие производные аминокислот; даже дипептиды и производные лактонов были расщеплены на энантиомеры (табл. 5.10).

Согласно другому варианту приготовления хиральных ТСХ-пластинок, RP ТСХ-пластинки (RP—обращенно-фазовые) опускали в $4 \cdot 10^{-3}$ М раствор бис(диметил-L-аланината) меди в ацетонитриле с 2,5% воды. После высушивания на пластинке легко разделялись дансилпроизводные всех обычных аминокислот при использовании в качестве элюента 0,3 М буферного раствора ацетата натрия с pH 7 в смеси с 25—40% ацетонитрила. Определение проводили на УФ-детекторе.

Разделение смесей нескольких дансилпроизводных аминокислот проводили методом двумерной RP-ТСХ [157]. В первом направлении разделение рацемических дансилпроизводных аминокислот шло в ходе градиентного элюирования водным буферным раствором ацетата натрия с возрастающей концентрацией ацетонитрила. Перед разделением во втором направлении пластинку опрыскивали 4 мМ раствором бис(дипропил-L-аланината) меди в смеси вода—ацетонитрил (5:95). В качестве элюента применяли систему вода—ацетонитрил (5:95) с добавлением 0,3 М ацетата натрия; разделение проводили в температурном градиенте. Таким способом были получены индивидуальные энантиомеры дансилпроизводных аспарагиновой кислоты, серина, метионина, аланина и фенилаланина.

Разрешение энантиомеров в обеих системах было настолько хорошим, что оно позволило определить соответствующие антиподы в следовых количествах (приблизительно 1%) [150]. Следует отметить, однако, что гидрофобность N,N-диметил-L-аланина и N,N-ди-n-пропил-L-аланина недостаточна для удерживания хирального расщепляющего лиганда на обращенно-фазовом сорбирующем слое. Хиральные комплексы меди обычно перемещаются с фронтом элюента по ТСХ-пластинке. Поэтому описанная методика примыкает к другому варианту лигандообменной хроматографии, который получил название «метода хирального элюента» (см. след. раздел).

5.3. Хиральные комплексы в подвижной фазе

Впервые хиральные хелатирующие сорбенты поступили в продажу в 1983 г., когда фирма Serva (ФРГ) наладила выпуск силикагельных сорбентов с привитыми L-пролиновыми и L-валиновыми группами. До этого ЛОХ энантиомеров занималось ограниченное число исследовательских групп с высоким эксперимен-

Таблица 5.10. Расщепление рацематов с помощью ТСХ (длина пути разделения 13 см, камера насыщения, пластинки с хиральным сорбентом) [155]

Рацемат	R_f (в скобках указана конфигурация)		Элюент ^a
Валин	0,54(D)	0,62(L)	A
Метионин	0,54(D)	0,59(L)	A
Аллоизолейцин	0,51(D)	0,61(L)	A
Норлейцин	0,53(D)	0,62(L)	A
2-Аминомасляная кислота	0,48	0,52	A
O-Бензилсерин	0,54(D)	0,65(L)	A
3-Хлораланин	0,57	0,64	A
S-(2-Хлорбензил)цистеин	0,45	0,58	A
S-(3-Тиабутил)цистеин	0,53	0,64	A
S-(2-Тиапропил)цистеин	0,53	0,64	A
цис-4-Гидроксипролин	0,41(L)	0,59(D)	A
Фенилглицин	0,57	0,67	A
3-Циклопентилаланин	0,46	0,56	A
Гомофенилаланин	0,49(D)	0,58(L)	A
4-Метоксифенилаланин	0,52	0,64	A
4-Аминофенилаланин	0,33	0,47	A
4-Бромфенилаланин	0,44	0,58	A
4-Хлорфенилаланин	0,46	0,59	A
2-Фторфенилаланин	0,55	0,61	A
4-Иодфенилаланин	0,45(D)	0,61(L)	A
4-Нитрофенилаланин	0,52	0,61	A
O-Бензилтирозин	0,48(D)	0,64(L)	A
3-Фтортирозин	0,64	0,71	A
4-Метилтриптофан	0,50	0,58	A
5-Метилтриптофан	0,52	0,63	A
6-Метилтриптофан	0,52	0,64	A
7-Метилтриптофан	0,51	0,64	A
5-Бромтриптофан	0,46	0,58	A
5-Метокситриптофан	0,55	0,66	A
2-(1-Метилциклопропил)глицин	0,49	0,57	A
N-Метилфенилаланин	0,50(D)	0,61(L)	A
3-Амино-3,5,5-триметилбутиролак-тон·НСI	0,50	0,59	A
N-Формил-трет-лейцин	0,48(+)	0,61(-)	A
N-Глицилфенилаланин	0,51(L)	0,57(D)	B

^a А — метанол — вода — ацетонитрил 50 : 50 : 200 (по объему); Б — метанол — вода — ацетонитрил 50 : 50 : 30 (по объему).

тальным уровнем в области макромолекулярной химии или модифицирования силикагелей, поскольку для получения хиральных сорбентов приемлемой эффективности необходим немалый опыт. В 1979 г. в качестве нового подхода к ЛОХ энантиомеров [158, 159] было предложено добавлять в элюент хиральные комплексы металлов. Этот метод «хирального элюента» родственнее предложенному Крамом и сотр. [160] методу расщепления рацемических аминокислот на целите или оксиде алюминия путем добавления в элюент хирального краун-эфира, который позволяет расщеплять рацемические соединения с помощью обычных нехиральных сорбентов. Расщепляющий хиральный агент — оптический активный комплекс переходного металла — непрерывно вводят в хроматографическую колонку с подвижной фазой. Достижимое при этом разрешение основано на энантиоселективности образования тройных комплексов металла, содержащих один из расщепляемых энантиомеров и расщепляющий хиральный лиганд. Новым здесь является то, что теперь тройные диастереомерные комплексы могут находиться как на поверхности сорбента, так и (или) в подвижной фазе.

Легко заметить, что в методе хирального элюента расщепляющий хиральный агент потребляется в количествах, далеко превосходящих сумму разделяемых энантиомеров. Более того, избыток хирального расщепляющего агента выходит из хроматографической колонки вместе с разделенными D- и L-изомерами. Поэтому, за исключением тех случаев, когда хотят получать небольшие количества очень дорогих оптически активных соединений, метод хирального элюента непригоден в качестве препаративного.

Напротив, аналитические приложения метода разнообразны и многообещающи, поскольку высокоэффективную нехиральную аналитическую колонку можно использовать в сочетании с различными оптически активными хелатирующими соединениями. Более того, легкость замены расщепляющего агента на его оптический антипод или рацемическую форму дает уникальную возможность проводить надежную идентификацию хиральных компонентов в сложных смесях с нехиральными соединениями [159, 161, 162]. Указанные операции изменяют положение пиков, соответствующих хиральным компонентам, в то время как удержание нехиральных подвижных лигандов не зависит от конфигурации хелатирующих добавок. Необходимо, однако, учитывать и трудности детектирования вследствие присутствия в элюате хирального компонента. Разделенные энантиомеры попадают в ячейку детектора в виде тройного комплекса с хиральным расщепляющим агентом. Эти комплексы диастереомерны и поэтому имеют разные молекулярные коэффициенты экстинкции, а также отличаются друг от друга и другими свойствами, что вызы-

Таблица 5.11. Расщепление немодифицированных аминокислот методом хирального элюента на обращенно-фазовых сорбентах

Хиральный расщепляющий лиганд	Литература	Ион металла	Расщепляемые рацематы, максимум селективности	Порядок элюирования энантиомеров	Условия эксперимента
L-Пролин	[161]	Cu ²⁺	19 аминокислот; $\alpha=6,5$ (Val)	D, L, за исключением His, Asp, Thr	4—8 мМ Cu(L-Pro) ₂ pH ≤ 5 для Glu, pH 7—8 для Asp, Thr
L-Фенилаланин	[162]	Cu ²⁺	Трп, α -Метил-ДОФА, 5-гидрокси-триптофан	D, L	4 мМ Cu(L-Phe) ₂ , 20%-ный MeOH, 20—25 °С
L-Фенилаланин	[163]	Cu ²⁺	α -Метил-ДОФА	D, L	4 мМ Cu(L-Phe) ₂ , MeOH/H ₂ O, 1:5
L-Фенилаланин	[164]	Cu ²⁺	21 аминокислота; $\alpha=5,2$ (Pro)	D, L, за исключением Thr, Ser, His, Asn	1 мМ Cu(L-Phe) ₂ , 5 мМ NH ₄ OAc, pH 4,5
L-Фенилаланин	[190]	Cu ²⁺	<i>n</i> -Этилфенилаланин	D, L	4 мМ Cu(L-Phe) ₂ , 45%-ный MeOH
N,N-Дипропил-L-аланин	[165—167]	Cu ²⁺	19 аминокислот; $\alpha=2,7$ (Ileu)	D, L	4 мМ Cu(Pr ₂ -L-Ala) ₂ , 0,14%-ный MeCN
N,N-Диалкил-L-аланин и L-валин: алкил — Me, Et, Pr, Bu, Pent	[167]	Cu ²⁺	6 аминокислот	D, L, за исключением Val (для Et ₂ Ala и Et ₂ Val) и His (для Me ₂ Ala и Me ₂ Val)	4 мМ Cu(Alk ₂ -L-Ala) ₂ или Cu(Alk ₂ -L-Val) ₂
N,N-Диметил-L-валин	[168]	Cu ²⁺	8 α -метиламинокислот		4 мМ Cu(Me-L-Val) ₂ , pH 5,5—7,0
N,N-Диметил-L-лейцин	[20, 202]	Cu ²⁺	Ala, Val, Ser, Thr, Asp, Asn, Glu, Lys, His, Arg	D, L	4 мМ Cu(Me ₂ -L-Ileu) ₂ H ₂ O, pH 5,3
N,N-Диметил-D-фенилглицин	[20]	Cu ²⁺	Ala, Val, Ser, Lys, Arg	L, D	4 мМ Cu(Me ₂ -D-Phgly) ₂ , H ₂ O, pH 5,1—5,5
N,N-Диметил-L-метионинсульфоксид	[20]	Cu ²⁺	Ala, Val, Glu, Tyr, Abu, His	D, L, за исключением His	4 мМ Cu(Me ₂ -L-MeSO) ₂ , H ₂ O, pH 5,4
L-Пипеколиновая кислота	[20]	Cu ²⁺	Ala, Val, <i>trans</i> -Leu, Tyr, Abu	D, L	4 мМ Cu(L-Pip) ₂ H ₂ O, pH 5,0
N-Метил-L-пролин	[20]	Cu ²⁺	Ala, Val, <i>trans</i> -Leu, Tyr, Abu	D, L	4 мМ Cu(Me-L-Pro) ₂ , H ₂ O, pH 5,0—5,7
N-Бензил-L-пролин	[202]	Cu ²⁺	Val, Pro, Нур, $\alpha=3,7$ (Pro)	L, D, за исключением α Нур	1 мМ Cu(Bzl-L-Pro) ₂ , H ₂ O
N-Метил-L-валин, L-пролилглицин, L-пролил-L-валин, L-пролил-L-тирозин	[161]	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ и Hg ²⁺	Аминокислоты		
Метилловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина (аспартам)	[169, 184, 191]	Cu ²⁺	Тур, Phe, Трп, ДОФА, 7 алифатических аминокислот, $\alpha=2$ (Ileu)	L, D	1 мМ Cu(аспартам)+ 0—10%-ный MeCN, 32 °С
Метилловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина (аспартам)	[169]	Zn ²⁺	Тур, Phe, Трп, $\alpha=1,9$ (Phe)	L, D	0,5 мМ Zn(аспартам)+
L-Аспартилциклогексил-амид	[170—173]	Cu ²⁺	11 аминокислот, $\alpha=3,9$ (Pro)	L, D, за исключением His	0,1—1,0 мМ Cu(L-AspNH-цикло-Гек) ₂ 5%-ный MeCN для Трп
L-Аспартилциклогексил-амид	[171]	Ni ²⁺	Pro, Val, Тур, $\alpha=3,9$ (Pro)	L, D	0,3 мМ Ni(L-AspNH-цикло-Гек) ₂
L-Аспартилэтилаид, L-аспартилбутилаид, L-аспартилгексилаид, L-аспартилоктилаид	[171]	Cu ²⁺	Pro, Тур, Val, Leu, Met, ДОФА	L, D	0,3 мМ Cu(L-AspNH-Алк) ₂ , фосфатный буфер, pH 5,0
N-Тозил-L-фенилаланин	[174—176]	Cu ²⁺	18 аминокислот, за исключением Gln; $\alpha=3,9$ (Pro)	L, D для нейтральных аминокислот; D, L для Ser, Asp, Asn, Glu, His, Lys, Arg	0,5 мМ Cu(Tos-L-Phe) ₂ , 0—15%-ный MeCN, pH 6, 30 °С

Хиральный расщепляющий лиганд	Литература	Ион металла	Расщепляемые рацематы, максимум селективности	Порядок элюирования энантиомеров	Условия эксперимента
N-Тозил-D-фенилглицин	[176, 177]	Cu ²⁺	19 аминокислот $\alpha=2,6$ (PhGly)	D, L для нейтральных аминокислот; L, D для Ser, Asp, Asn, Glu, His, Lys, Arg, Gln	0,5 mM Cu (Tos-D-PhGly) ₂ , 0—15%-ный MeCN, pH 6
N-Метил-L-фенилаланин	[164]	Cu ²⁺	19 аминокислот $\alpha=2,9$ (Pro)	D, L, за исключением Thr, Ser, His	1 mM Cu (Me-L-Phe) ₂ , pH 4,5
N,N-Диметил-L-фенилаланин	[164]	Cu ²⁺	23 аминокислоты, (трет-Leu) $\alpha=4,8$	D, L, за исключением His	1 mM Cu (Me ₂ -L-Phe) ₂ , pH 4,5
N,N,N',N'-Тетраметил-R-пропандиамин-1,2	[178]	Cu ²⁺	PhSer, Phe, Tyr, Trp, ДОФА; $\alpha=1,14$ (Trp)	L, D	0,5 mM [Cu (Me ₄ pn) ₂] ²⁺ , 15%-ный MeCN

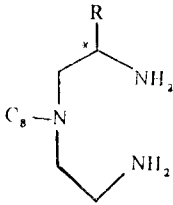
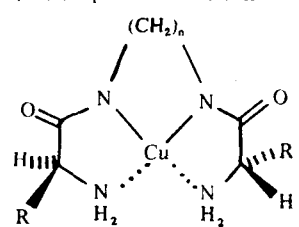
вает необходимость проводить отдельную калибровку для каждого из энантиомеров.

В табл. 5.11 и 5.12 представлен обзор хиральных добавок хелатов металлов и других описанных в литературе основных компонентов хроматографических систем, успешно испытанных в ходе расщепления энантиомерных аминокислот и их производных. Обе таблицы относятся к обращенно-фазовым системам особенно популярным благодаря своей высокой эффективности и универсальности. Для элюирования использовали водные или водно-органические элюенты (подходящие как для немодифицированных аминокислот, так и для их производных) в сочетании с сильно гидрофобными сорбентами, в особенности с обращенно-фазовыми макропористыми силикагелями. Их поверхности придавали гидрофобность путем химической прививки алкильных цепей. Опыт показывает [162], что в методе хирального элюента нежелательно использовать обращенно-фазовые сорбенты с короткими привитыми алкильными цепями. Октильные и октадецильные радикалы обеспечивают лучшее покрытие поверхности силикагеля и соответственно лучшие результаты [162, 182]. В этом случае удерживание веществ, растворенных в полярной подвижной фазе, определяется гидрофобным взаимодействием с углеводородным промежуточным слоем.

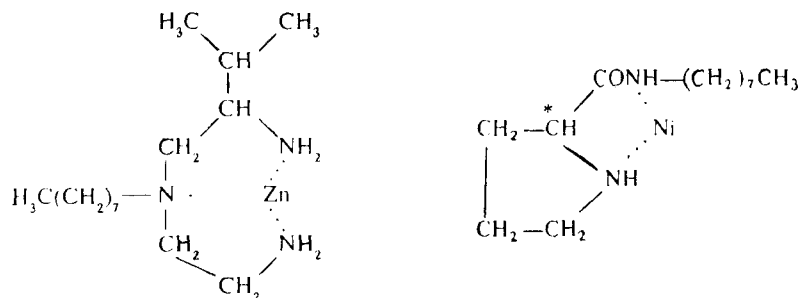
Касаясь механизма удерживания разделяемых энантиомеров аминокислот в методе хирального элюента, можно выделить три основных предельных случая [93], когда сорбент удерживает 1) расщепляющий хиральный агент и его комплексы, 2) разделяемые энантиомерные лиганды, 3) тройные разнолигандные комплексы. Хотя на практике может встретиться сочетание всех трех механизмов, это отнюдь не является обязательным, так как различие в электростатических зарядах и других свойствах компонентов может быть очень существенным. Следует помнить об этих различиях, чтобы понять влияние изменения хроматографических параметров на удерживание и расщепление аминокислот.

Рассмотрим вначале влияние pH элюента. Этот параметр ответствен за диссоциацию аминокислот и, следовательно, за их способность вступать в координационное взаимодействие с ионами металлов. Увеличение pH благоприятствует образованию хелатов с ионами металлов; поскольку хиральное распознавание в ЛОХ основано на образовании тройных разнолигандных комплексов, энантиоселективность $\alpha = k'_D/k'_L$, характеризующая разделение энантиомеров, всегда улучшается с повышением pH хирального элюента [158, 171, 174, 179, 181, 187, 188]. Правда обращенно-фазовые силикагельные сорбенты химически неустойчивы в щелочных растворах, поэтому желательно по возможности снижать pH элюента, оставаясь в пределах, обеспечивающих

Таблица 5.12. Разделение дансилпроизводных аминокислот (дидансилпроизводные His, Orn, Lys, Trp) и дипептидов методом хирального элюента на обращенно-фазовых системах

Хиральный расщепляющий лиганд	Литература	Ион металла	Расщепляемые рацематы, максимум селективности	Порядок элюирования энантиомеров	Условия эксперимента
2-L-Алкил-4-октилдиетилентриамин 	[158, 179]	Zn ²⁺ или Cd ²⁺	25 аминокислот, за исключением Pr; α=2,5 (Ser)	L, D, за исключением Asp для R=изо-Pr, Ser и Trp для R=Et; Leu для R-изо-Bu	0,65 мМ хелат Zn, 0,17 М NH ₄ OAc, pH 9, 35%-ный MeCN, 30 °C
R=Et, изо-Pr, изо-Bu 2-L-Изопропил-4-октилдиетилентриамин	[179]	Hg ²⁺ Ni ²⁺	Ser, Thr, Ala, Ileu алло-Ileu Thr, Cys	D, L D, L	0,8 мМ хелат Hg, 0,19 М NH ₄ OAc, pH 9,0–9,2, 40%-ный MeCN, 50 °C 0,8 мМ хелат Ni, 0,19 М NH ₄ OAc, pH 9,35%-ный MeCN, 30 °C
L-Пролин	[180–183]	Ni ²⁺ или Zn ²⁺ Cu ²⁺	10 глицилсодержащих дипептидов 13 нейтральных аминокислот; α=1,9 (Trp)	L, D для Zn; D, L для Ni L, D, за исключением Ser	0,8 мМ хелат Me, 0,17 М NH ₄ OAc; pH 9, 35%-ный MeCN, 30 °C 2,5 мМ Cu(L-Pro) ₂ , 5 мМ NH ₄ OAc, pH 7, 15–20%-ный MeCN
L-Пролилоктиламид	[185]	Ni ²⁺	25 аминокислот; α=3,5 (Ser)	D, L, за исключением Asp, CuSO ₃ H	4 мМ Ni(L-ProNH-Oct) ₂ , 87,5 мМ NH ₄ OAc, pH 9,2, 60%-ный MeOH
L-Аргинин	[181]	Cu ²⁺	10 алифатических и ароматических аминокислот; α=1,26 (Trp, Nleu)	D, L	2,5 мМ Cu(L-Arg) ₂ , 25 мМ NH ₄ OAc, pH 7,5, 20%-ный MeCN
L-Гистидин	[188]	Cu ²⁺	12 аминокислот; α=2,4 (Nval, Nleu)	L, D, за исключением Trp, Ser, Thr, Phe	2,5 мМ Cu(L-His) ₂ , 25 мМ NH ₄ OAc, pH 7,0, 10–17%-ный MeCN
Метилвый эфир L-гистидина	[183, 184, 188, 189]	Cu ²⁺	16 аминокислот; α=1,5 (Nleu), за исключением Pro, Нур, Ala, Thr, Cys	L, D, за исключением Asp, Phe, Trp, тироксина	2,5 мМ Cu(L-HisOMe) ₂ , 25 мМ NH ₄ OAc, pH 7,0, 20%-ный MeCN
N,N-Дипропил-L-аланин	[186]	Cu ²⁺	Обычные аминокислоты, за исключением Trp	D, L	1 мМ Cu(Me ₂ -L-Ala) ₂ , 0,3 М NaOAc, pH 7,0, 23,5–40%-ный MeCN (градиент)
	[187]	Cu ²⁺	9 аминокислот; α=2,5 (Asp)	D, L	2 мМ хелат Cu, 0,3 М NaOAc, pH 7,5, 27%-ный MeCN
n=2, 3 R=C ₆ H ₅ CH ₂ (Phe) R=(CH ₃) ₂ CH (Val) R=CH ₃ (Ala)					

достаточную степень образования тройных комплексов. При разделении немодифицированных аминокислот путем добавления в элюент сильных хелатообразующих хиральных веществ, таких, как L-пролин, L-фенилаланин или L-аспартилалкиламид, оптимальный интервал значений pH, по-видимому, составляет 4,5—6,0. В последнем случае расщепление аминокислот можно наблюдать даже при pH 3,5 [173]. При разделении на энантиомеры дансилпроизводных аминокислот оптимальная величина pH превышает 7, поскольку для координации с ионом переходного металла необходимо депротонирование сульфамидного фрагмента $-\text{SO}_2\text{NH}-$. При использовании в качестве комплексообразующих ионов металла Zn^{2+} и Ni^{2+} в сочетании с 2-L-изопропил-4-октилдиэтилентриамином [158, 179] и L-пролиноктиламидом соответственно, которые образуют хиральные хелатирующие добавки следующих структур:



Каргер и сотр. [185] были вынуждены поднять pH элюента до 9,0—9,2, поскольку координационное взаимодействие цинка и никеля с дансилпроизводными аминокислот и хиральными добавками слабее, чем в случае ионов меди (II). (Для продления времени жизни основной колонки с обращенно-фазовой насадкой в этих условиях необходима короткая предколонка.)

При использовании химически привитых хиральных фаз увеличение степени образования тройных комплексов, вызванное повышением pH элюента, автоматически приводит к возрастанию удерживания энантиомеров. В случае же увеличения pH хирального элюента может наблюдаться и уменьшение удерживания. Это указывает на меньшую гидрофобность тройных разнолигандных комплексов по сравнению с собственно энантиомерами. Подобную зависимость можно наблюдать при ЛОХ гидрофобных дансилпроизводных аминокислот в элюенте, содержащем гидрофильные комплексы L-пролината или L-гистидината меди [181, 188]. Здесь удерживание дансилпроизводных аминокислот падает при повышении pH элюента с пяти до семи. При введении гидрофобных хиральных добавок типа L-фенилаланина N-метил-L-фенилаланина, N,N-диметил-L-фенилаланина [164],

L-аспартилциклогексиламида [171], N-тозил-L-фенилаланина [174] или хирального алкилдиэтилентриамина [158, 179] удерживание энантиомеров аминокислот и дансилпроизводных аминокислот возрастает симбатно со степенью образования тройных комплексов.

Подобно влиянию pH на селективность расщепления влияние концентрации хиральной добавки также однозначно. При увеличении количества расщепляющих комплексов вероятность образования тройных комплексов приближается к единице, и величина α постепенно достигает определенного максимального уровня [170, 174, 181, 183]. Напротив, удерживание энантиомеров может изменяться в обоих направлениях в зависимости от относительной гидрофобности всех компонентов, участвующих в равновесии.

В свою очередь удерживание разделяемых энантиомеров обращенно-фазовыми системами однозначно зависит от количества органического растворителя в элюенте — обычно ацетонитрила, метанола или тетрагидрофурана. При сорбции на углеводородном промежуточном слое эти растворители делают неподвижную фазу менее гидрофобной, тем самым ускоряя элюирование энантиомеров всех типов и их тройных комплексов [164, 169, 174, 188]. Одновременно селективность расщепления остается без изменений или незначительно уменьшается. Таким образом, добавление к элюенту органического растворителя является очень полезным приемом для доведения коэффициента емкости k' какого-либо энантиомера до желаемого уровня. При использовании гидрофильных хиральных добавок, таких, как бис(L-пролинат) меди, или при разделении гидрофильных аминокислот в качестве элюента следует применять воду или в основном воду. При использовании гидрофобных хиральных хелатирующих добавок, таких, как L-пролиноктиламид или алкилоктилдиэтилентриамин, и при разделении гидрофобных дансилпроизводных аминокислот доля ацетонитрила или метанола в элюенте должна достигать 35—60%, чтобы анализ был достаточно быстрым [179, 185].

В случае применения гидрофобных хелатирующих добавок, сравнительно небольших молекул разделяемых энантиомеров и средних концентраций органического растворителя в элюенте происходит насыщение насадки колонки хиральным расщепляющим лигандом, после чего необходимость в хиральном элюенте вообще отпадает и колонки сохраняют свои хиральные свойства в течение длительного времени при элюировании водным или водно-органическим элюентом, содержащим только небольшие добавки соли соответствующего переходного металла. Такие возможности были обнаружены для L-аспартилоктил- и додециламида [173], L-пролиноктиламида [185], N-тозил-L-фенил-

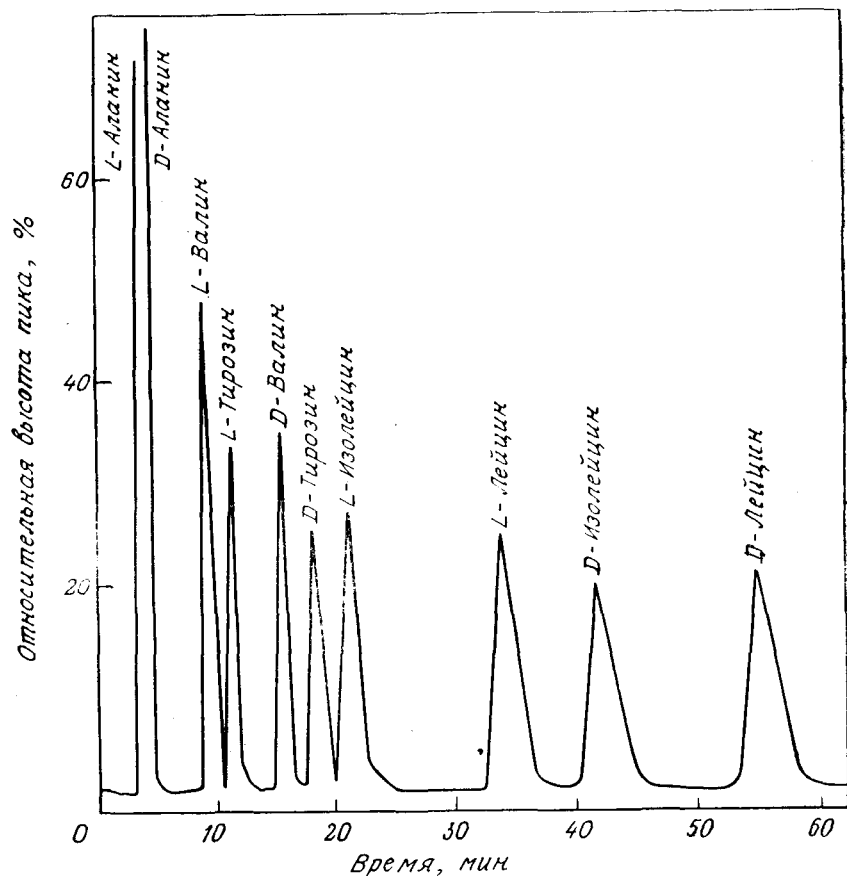


Рис. 5.12. Хроматограмма продуктов расщепления пяти рацемических аминокислот с помощью элюента, содержащего $\text{Cu}(\text{N-Tos-L-Phe})$ насадке девелосил C_8 , $d_p=5$ мкм. Колонка размером $4,0 \times 100$ мм; элюент $0,5$ мМ $\text{Cu}(\text{TosPhe})_2$ в водном ацетонитриле (90 : 10), pH 6,0, расход 1,0 мл/мин, температура 30°C [174].

аланина и N-тозил-D-фенилглицина [176]. Таким образом, можно констатировать очевидную взаимосвязь метода хирального элюента и описанного ранее метода нанесения хиральных лигандов на силикагельные сорбенты или другие лигандообменники.

В методе хирального элюента при разрешении аминокислот, дансиламинокислот и дансидипептидов относительно высокая эффективность достигнута благодаря применению обращенно-фазовых сорбентов с хорошо оптимизированной пористой структурой (рис. 5.12—5.14). Достигнутая эффективность тем не ме-

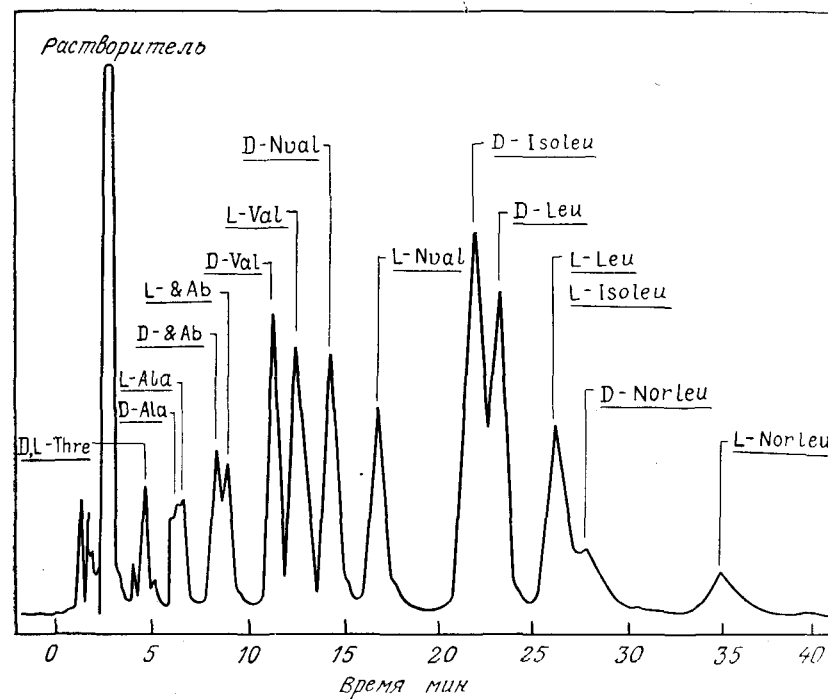


Рис. 5.13. Хроматограмма продуктов расщепления рацемических дансиламинокислот с помощью хиральной добавки $\text{Cu}(\text{L-Arg})$ в элюент на насадке нуклеозил C_{18} , $d_p=5$ мкм. Колонка размером $2,6 \times 250$ мм, элюент $2,5$ мМ $\text{Cu}(\text{Arg})_2$, $0,025$ М ацетат аммония, водный ацетонитрил (80 : 20), pH 7,5, расход 2,0 мл/мин [181].

нее не превышает эффективности ряда тщательно подготовленных, химически связанных хиральных лигандообменников. Следует отметить, что на короткой аналитической колонке до сих пор еще не удалось разрешить до 50 отдельных энантиомеров, что требуется для проведения полного энантиомерного анализа смеси всех аминокислот, входящих в состав белков.

Для решения этой проблемы было предложено несколько подходов. Вайнштейн и др. [165, 166] предложили делить исходную смесь аминокислот на три фракции, используя обычную катионообменную смолу и летучий водный пиридиновый буфер. После испарения элюента аминокислоты в каждой из групп разделяли на индивидуальные энантиомеры на обращенно-фазовых колонках с помощью хирального элюента, содержащего N,N-дипропил-L-аланин и ацетат меди в воде. Количественную оценку проводили на флуоресцентном детекторе после предва-

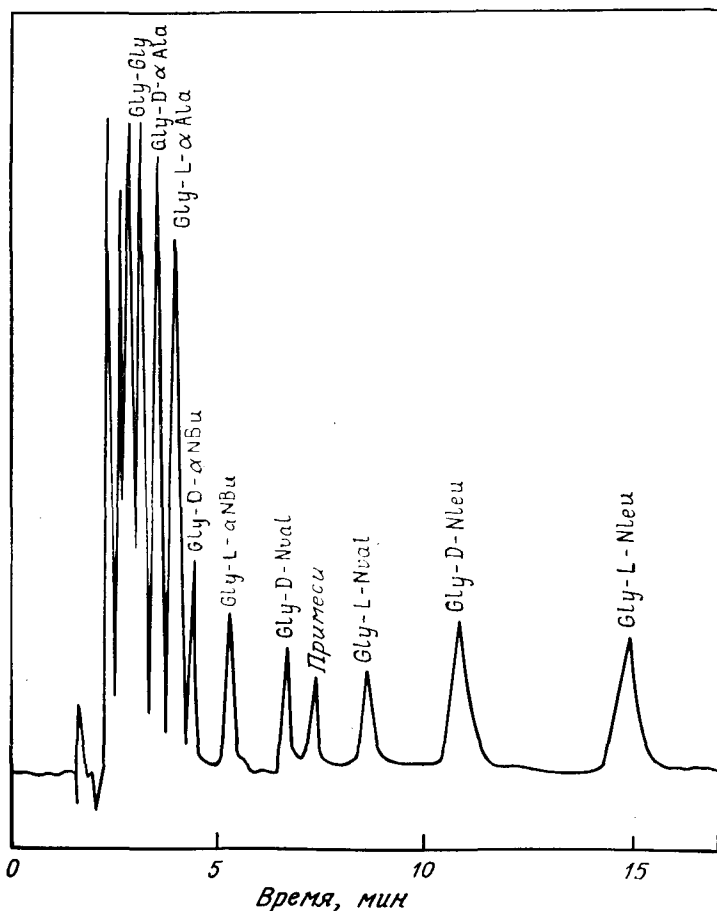


Рис. 5.14. Хроматограмма продуктов расщепления дансилглицил-D,L-аминокислотных дипептидов методом хирального элюента с добавкой Ni(2-изопропил-4-октилдиэтилентриамина) на гиперсиле C_8 (5 мкм). Колонка размером $4,6 \times 150$ мм, элюент 0,8 мМ C_3-C_8 -диен-Ni, 0,19 М ацетат аммония, водный ацетонитрил (65:35), pH 9,0, расход 1,0 мл/мин, температура 30 °C [179].

рительной обработки выходящих из колонки аминокислот *о*-фталевым альдегидом, что позволяло получить субнаномольный предел обнаружения. Пролин, содержащий вторичную аминогруппу, не образует основания Шиффа с *о*-фталевым альдегидом, поэтому его обрабатывали нингидрином и детектировали фотометром при 440 нм.

Нимура и сотр. [177] для разделения немодифицированных аминокислот на обращенно-фазовом сорбенте в качестве хираль-

ной добавки вводили в подвижную фазу медный комплекс N-(*n*-толуолсульфонил)-D-фенилглицина. Они предложили проводить разделение на двух колонках (рис. 5.15), что позволяет одновременно разделять все аминокислоты, входящие в состав белка, путем переключения колонок и градиентного элюирования с ацетонитрилом. Для этого требуется два элюента. Для приготовления элюента А берут 75 мг Na_2CO_3 , 125 мг $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 10 мл 100 мМ раствора тозил-D-фенилглицина и водой доводят объем

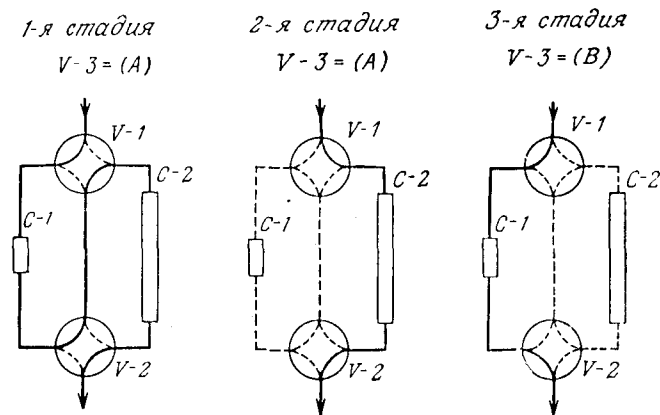


Рис. 5.15. Вариант переключения колонок для одновременного анализа свободных D,L-аминокислот с элюентом, содержащим Tos-D-PhG/Cu(II). Колонки: C-1: ERC-ODS, 50×6 мм; C-2: ERC-ODS, 200×6 мм. Сплошной линией изображено перемещение хирального элюента [177].

до 1 л. Второй элюент В готовят добавлением трех объемов ацетонитрила к семи объемам хирального элюента А. Аминокислоты сначала хроматографировали на последовательно соединенных колонках C-1 и C-2 в элюенте А. После того как сравнительно быстро перемещающиеся полярные аминокислоты (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, треонин и аланин) переходили из колонки C-1 во вторую колонку, кран V-1 переключали на вторую стадию, что приводило к окончательному разделению указанных аминокислот в изократических условиях на второй колонке. На третьей стадии сильно удерживаемые менее полярные аминокислоты разделяли на более короткой колонке C-1, но уже в линейном градиенте концентраций элюента В. Элюат обрабатывали *о*-фталевым альдегидом и детектировали флуориметром; полученная хроматограмма представлена на рис. 5.16.

Каргер и сотр. [185] предложили разделять смесь дансилпроизводных аминокислот на отдельные рацемические компоненты

на обычной обращенно-фазовой насадке в линейном градиенте концентраций метанола, после чего вещества, выходящие в виде отдельных пиков, подвергать энантиомерному расщеплению на второй обращенно-фазовой колонке с помощью раствора никелевого комплекса *l*-пролил-*n*-додециламида. В такой комбинированной системе на первом этапе осуществляют количественный аминокислотный анализ, а соотношение энантиомеров отдельных

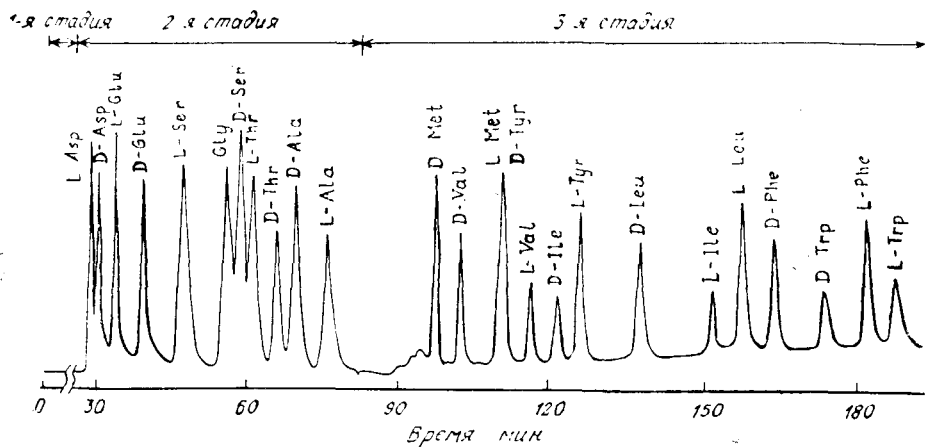


Рис. 5.16. Хроматограмма продуктов одновременного расщепления свободных D,L-аминокислот в элюенте, содержащем Tos—D-PhG/Cu(II) в системе с переключением колонок. Условия хроматографирования и способ переключения колонок указаны на рис. 5.15. В колонку вводили по 100—250 пкмоль каждой из аминокислот; детектирование по флуоресценции [177].

аминокислот определяют во втором модуле системы. Поскольку во вторую колонку попадает более разбавленный раствор, детектирование осуществляют при двух разных значениях чувствительности: после первой колонки — УФ-детектором, после второй колонки — флуоресцентным детектором. Предел обнаружения находится на пикомолевом — субпикомолевом уровне при максимальном соотношении энантиомеров 5000 : 1 [179].

Вайнштейн и Вейнер [186] создали градиентную программу для разрешения почти всех дансилпроизводных аминокислот на обращенно-фазовой колонке длиной 24 см. Элюент содержал 1 мМ раствор медного комплекса бис(N,N-дипропил-*l*-аланина), 0,3 М ацетат натрия и ацетонитрил, содержание которого возрастало с 23,5 до 40%; рН 7,0 поддерживали добавлением ледяной уксусной кислоты. На рис. 5.17 последовательность элюирования дансилпроизводных аминокислот, естественно, отличается от последовательности элюирования немодифицированных ами-

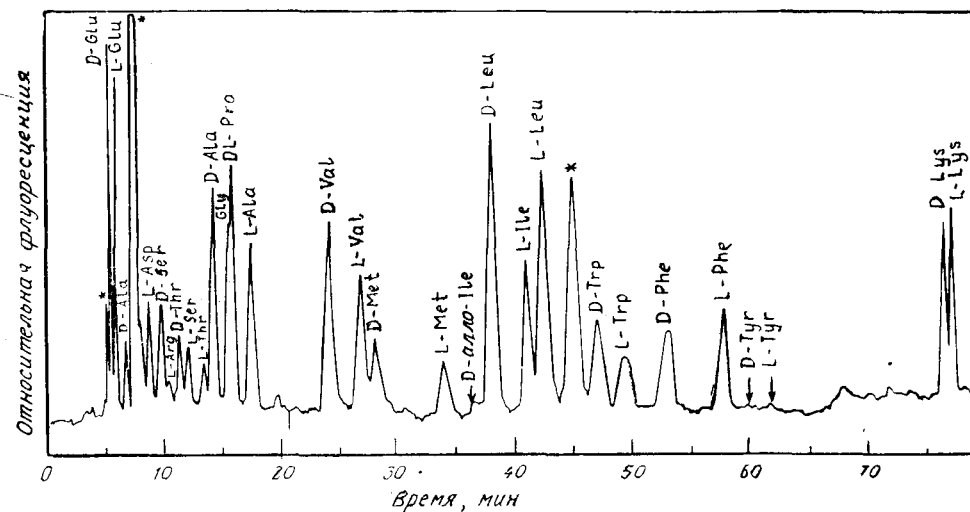
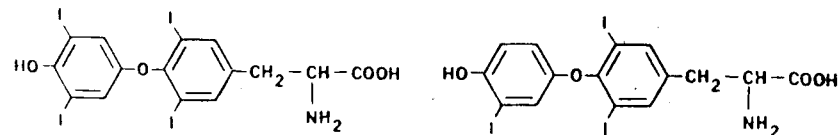


Рис. 5.17. Хроматограмма продуктов расщепления практически всех аминокислот, присутствующих в гидролизате белка, в виде флуоресцирующих дансилпроизводных. Побочные продукты, образующиеся в ходе получения дансилпроизводных аминокислот, обозначены звездочками. Большой пик с временем удерживания более 7 мин соответствует Dns—ОН, а пик с временем выхода 45 мин — Dns-амиду. Стрелки указывают положение при элюировании соединений, отсутствующих в смеси (Dns—D-аллоизолейцин) или разлагающихся в ходе анализа (Dns—D- и Dns—L-тирозин). Элюирование проводят с N,N-дипропил-*l*-аланином/Cu(II) в градиенте ацетонитрила (от 23,5% до 40%). Колонка размером 24×0,46 см, нуклеозил C₁₈, d_p=5 мкм, расход 0,8 мл/мин [186].

нокислот, представленной на рис. 5.16. Дансилтирозин окисляется в присутствии меди.

Хотя ЛОХ с использованием хирального элюента в большинстве случаев проводили на обращенно-фазовых сорбентах, сопоставимые селективность и эффективность можно получить и в нормально-фазовых системах (табл. 5.13). Ульрих и др. [162] успешно расщепили тироксин и триодтиронин:



на силикагеле лихросорб Si 60 при элюировании в смеси гексан — *n*-пропанол — вода (60 : 37,5 : 2,5), содержащей 0,2 мМ бис(*l*-пролината) меди (II). *l*-Энантиомеры удерживались дол-

ше, как и в обращенно-фазовой системе с такой же хиральной хелатирующей добавкой.

Этот факт, казалось бы, подтверждает часто высказываемое мнение, что расщепление энантиомеров в методе хирального элюента обусловлено энантиоселективностью образования тройных разнолигандных комплексов. В каждой паре диастерео-

Таблица 5.13. Расщепление немодифицированных аминокислот методом хирального элюента в прямофазовых системах

Хиральный расщепляющий лиганд	Литература	Ион металла	Расщепляемые рацематы, максимум селективности	Порядок элюирования энантиомеров	Условия эксперимента
L-Пролин	[159]	Cu ²⁺	19 аминокислот, за исключением Asp, Glu, Ala, Gln; $\alpha=1,28$ (Tyr)	L, D	Катионообменник на основе сульфированного полистирола, 4—8 мМ Cu(L-Pro) ₂ , 0,05—1,0 М NaOAc, pH 5,5, 75 °С
L-Пролин	[162]	Cu ²⁺	Триодтиронин, тироксин; $\alpha=1,6$	D, L	Лихросорб Si 60, 0,2 мМ Cu(L-Pro) ₂ , 45 °С, гексан — <i>n</i> -пропанол — вода (60 : 37,5 : 2,5)
N,N,N',N'-Тетраметил-R-пропандиамин	[178]	Cu ²⁺	14 аминокислот; $\alpha=1,4$	D, L, за исключением Asp, Glu	Лихросорб Si 100, 0,5 мМ Cu(Me ₄ pn) ₂ ²⁺ , 5 мМ Me ₄ pn, 90%-ный MeCN

мерных тройных комплексов, образующихся из двух энантиомеров, один комплекс может быть стабильнее другого. Более стабильному комплексу соответствует более сильное (длительное) удерживание энантиомера [170—172, 180—183, 188, 191]. В таком случае обращенно-фазовые и нормально-фазовые системы должны обеспечивать одинаковый порядок выхода энантиомеров.

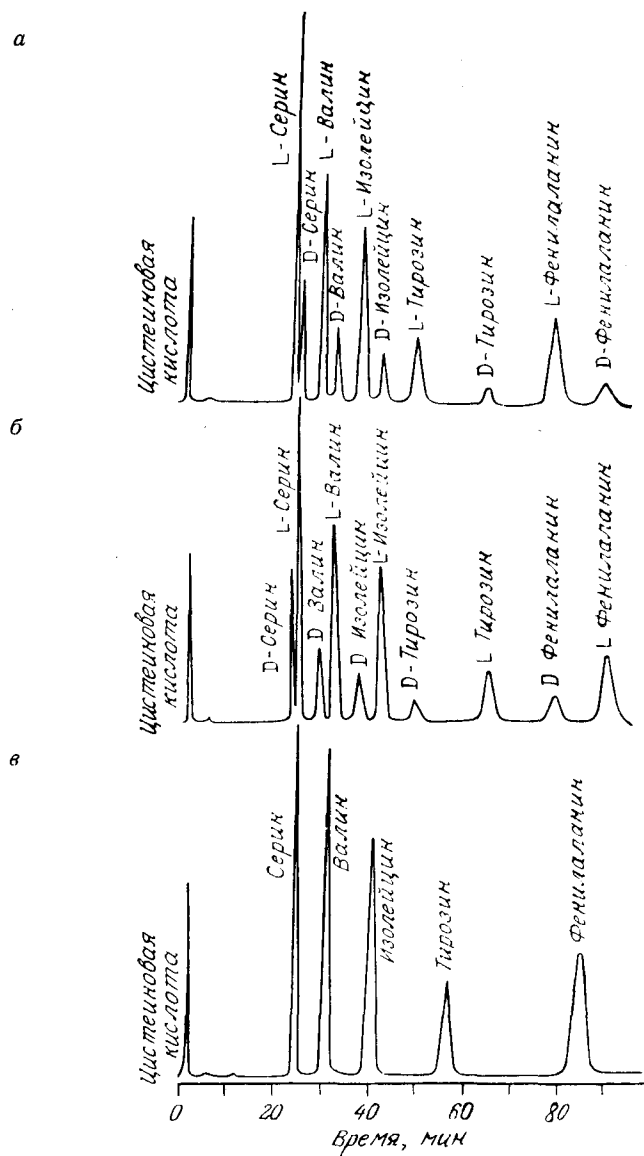
В противовес этому Курганов и Даванков [178] описали интересный пример полного обращения порядка элюирования энантиомеров аминокислот на обращенно-фазовой и нормально-фазовых системах. В обоих случаях в качестве хиральной хелатирующей добавки вводили комплекс меди (II) с N,N,N',N'-тетраметил-R-пропандиамином-1,2. Этот пример однозначно свидетельствует о том, что в методе хирального элюента энантиоселе-

ктивность существенно отличается от энантиоселективности образования соответствующих тройных комплексов в растворе. Гораздо важнее энантиоселективность образования тройных сорбционных комплексов. Это означает, что решающим фактором становится способ взаимодействия диастереомерного тройного комплекса с поверхностью сорбента. Взаимодействие в нормально-фазовой системе отличается от взаимодействия в обращенно-фазовой системе, что и приводит к обращению знака общего энантиоселективного эффекта. На микроколонке длиной 10 см с обращенно-фазовой насадкой можно полностью разделить на энантиомеры 14 аминокислот, применяя в качестве хиральной добавки медный комплекс тетраметилпропандиамина. Быстро можно разрешить смеси из 4—5 рацематов, например смесь Asp, Tgr, Abu, Pго и Thr. Немодифицированный силикагель в отличие от обращенно-фазовых сорбентов сильнее удерживает полярный треонин, чем гидрофобный триптофан. Аспарагиновая кислота выходит первой вследствие электростатического отталкивания со стороны частично диссоциированных поверхностных силанольных групп.

В литературе, вероятно, описана пока единственная система, в которой отсутствует достаточно интенсивное взаимодействие между тройными разнолигандными комплексами и сорбентом — это набухший сульфированный полистирольный катионообменник и 4 мМ водный раствор Cu(L-Pro)₂ в качестве хирального элюента. В этой системе удалось разделить [159] на энантиомеры 19 рацемических аминокислот, причем *D*-энантиомеры удерживались сильнее. Энантиоселективность α не превышала 1,28 (*D,L*-Tyr), что существенно ниже, чем во всех других описанных системах, включая хиральные элюенты с *L*-пролином меди в качестве хирального расщепляющего агента. Этот факт, а также противоположный знак энантиоселективности по сравнению с силикагелевыми сорбентами (как обращенно-фазовыми, так и нормально-фазовыми) указывают на важные особенности данной системы. Это может быть отсутствие непосредственных взаимодействий между отрицательно заряженной фазой смолы и нейтральными тройными разнолигандными комплексами. В таком случае энантиоселективность образования комплекса в жидкой фазе должна стать решающим для расщепления фактором, тогда как аминокислоты могут удерживаться в форме протонированных молекул или положительно заряженных монокомплексов Cu(AA)⁺. Разница в удерживании двух энантиомеров должна соответствовать мере их участия в образовании тройного комплекса. В работе [159] описан один из первых примеров применения хирального элюента и продемонстрированы большие потенциальные возможности этого метода (рис. 5.18).

Опубликован ряд работ, описывающих практическое приме-

нение ЛОХ с хиральным элюентом для энантиомерного анализа. Так, например, в присутствии L-аспартама и меди детектировали изменение пропорций и концентраций D- и L-изомеров пипеколиновой кислоты в моче больных гиперпипеколатемией [184]. Аминокислотный анализ цереброспинальной жидкости проводи-



ли с помощью системы медь (II) — метиловый эфир L-гистидина. Высокая чувствительность флуоресцентного детектирования дансилпроизводных позволяет целиком регистрировать профиль аминокислотного состава, начиная с 50 мкл цереброспинальной жидкости, содержащей только примерно 10 мкмоль/л аминокислот в отличие от сыворотки, где содержание аминокислот достигает 100 мкмоль/л. Хотя D-изомеры не детектируются достоверно, для ряда проб был установлен необычный аминокислотный состав, в частности для больных с инфекционным менингитом или раком груди [183, 184].

Естественно, что метод хирального элюента применим для расщепления многих иных производных аминокислот, а также ряда органических соединений других классов. Так, например, используя медные комплексы N,N-диметил-L-валина, был расщеплен на энантиомеры ряд α -метил- α -аминокислот [168]. В элюенте, содержащем медные комплексы L-пролина, L-валина или аспартама, с селективностью соответственно 1,03, 1,11 и 1,28 были разделены энантиомеры потенциально сладкого подобного сахара гомосериндегидрохалкона следующей формулы [192]:

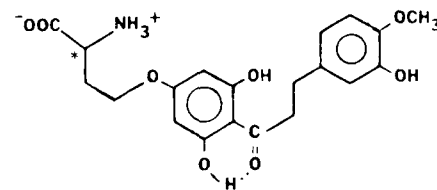
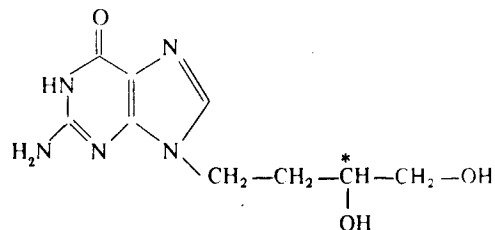


Рис. 5.18. Влияние хиральности элюента на расщепление D- и L- энантиомеров аминокислот в лигандообменной хроматографии. В каждом цикле разделения вводили одинаковые порции смесей пяти пар аминокислотных энантиомеров, каждая из которых содержит 0,375 нмоль L-формы и 0,125 нмоль D-формы. В качестве элюента использовали буферный раствор ацетата натрия (0,05 н., рН 5,5), содержащий $8 \cdot 10^{-3}$ М пролина и $4 \cdot 10^{-3}$ М сульфата меди. Хиральность пролинового лиганда соответствует указанной на рисунке. Колонку длиной 12 см и внутренним диаметром 0,2 см заполняли сульфированным полистиролом DC 4,а и приводили в равновесие с каждой порцией элюента в течение 15 мин перед вводом пробы. Расход элюента 10 мл/ч, скорость подачи реагента (o-фталевого альдегида) 10 мл/ч, давление на входе в колонку $2 \cdot 10^7$ Па, температура колонки 75 °С.

а — L-пролин обеспечивает разделение всех пяти пар энантиомеров. L-Энантиомер выходит из колонки перед соответствующим D-энантиомером; б — D-пролин обращает порядок выхода; в — в случае рацемического пролина расщепления не происходит. Аминокислоты элюируются между пиками соответствующих энантиомеров (а и б). Детектирование основано на измерении флуоресценции [159].

9-(3,4-Дигидроксибутил)гуанин был разделен на энантиомеры, проявляющие различную антигербицидную активность, в водном растворе с 3 мМ концентрацией бис(L-фенилаланината) меди [193]. Предел обнаружения S-формы в элюируемой последней R-форме составлял приблизительно 0,3%.



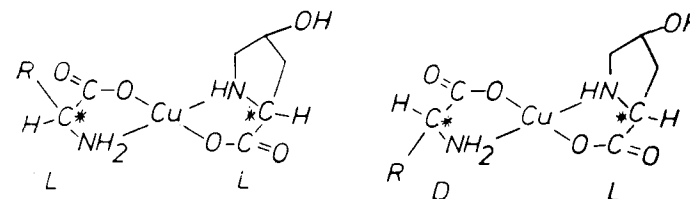
Миндальную кислоту расщепляли на энантиомеры в элюентах, содержащих медные комплексы N,N,N',N'-тетраметил-R-пропандиамина-1,2 [178] или L-фенилаланина [162, 164], на обращенно-фазовых насадках. Последнюю систему [151, 164], а также медные комплексы N-метил-, N,N-диметил- и N-этил-L-валина [162] применяли и для разделения энантиомеров *n*-гидрокси- [151] и *m*-гидроксиминдальной кислоты [151, 164], 4-гидрокси-3-метоксиминдальной кислоты, троповой кислоты и атролактиновой кислоты [164].

Более детальное исследование поведения α -гидроксикислот [194] в обращенно-фазовых системах с хиральными добавками комплексов меди (II) с ди-*n*-пропил-L-аланином или, еще лучше, с диметил-L-валином показало, что этот подход к разделению 2-гидроксизамещенных алифатических кислот в общем случае был успешен. С его помощью были разделены на энантиомеры производные пропионовой (молочная кислота), масляной, 2-метилмасляной, валериановой, изовалериановой, изокапроновой и октановой кислот. Напротив, вещества, содержащие дополнительные β -гидроксильные или β -карбоксильные группы (глицероловая, винная и яблочная кислоты), были элюированы в форме одного пика. В этих условиях были также разделены аналоги миндальной кислоты (ароматические гидроксикислоты): 2-метилминдальная, 4-гидрокси-3-метоксиминдальная, 3-гидрокси-4-метоксиминдальная кислоты, атролактиновая и 3-фенилмолочная кислоты. Значения селективности составляли 3 и более (миндальная, гидроксивалериановая кислоты). Подобно аминокислотам L-изомеры гидроксикислот удерживались сильнее [164, 194],

что предполагает аналогичную *транс*- (карбоксильную) структуру разнолигандного комплекса меди с аминокислотой и гидроксикислотой.

5.4. Механизм хирального распознавания энантиомеров

Разрешение двух энантиомеров в ЛОХ всегда происходит вследствие различной энантиоселективности образования их тройных разнолигандных комплексов с ионом металла-комплексобразователя и хиральным расщепляющим лигандом, который связан с нерастворимой матрицей сорбента или добавлен в подвижную фазу. Два возможных разнолигандных медных комплекса с участием L-гидроксипролина в качестве типичного расщепляющего лиганда (включая L- или D-энантиомеры расщепляемых α -аминокислот) являются диастереомерами, как показано на следующей схеме:

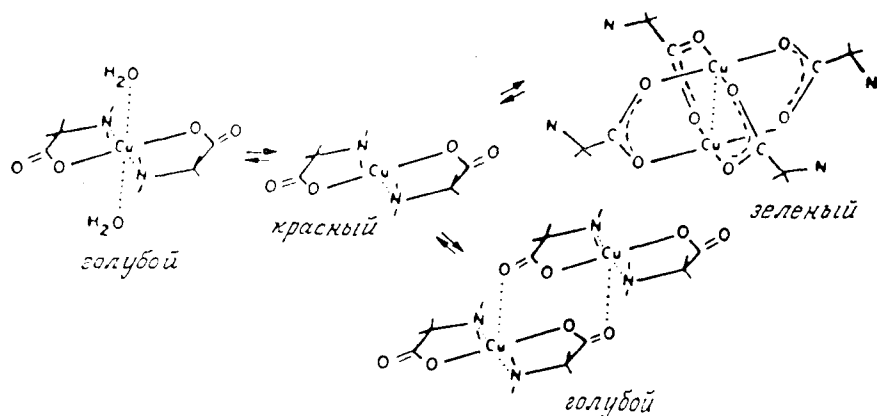


Эти два лабильных диастереомерных комплекса могут иметь различную стабильность, если расщепляющий агент распознает конфигурацию аминокислотных лигандов. В соответствии с моделью трехточечного взаимодействия для хирального распознавания необходимо по меньшей мере три точки контакта между двумя лигандами в разнолигандной структуре.

Две точки контакта очевидны из приведенной выше схемы — это взаимодействия через ион меди между электронодонорными атомами азота и атомами кислорода аминокислотных лигандов. Третья точка контакта должна возникнуть между заместителями у асимметрических α -углеродных атомов. Для того чтобы определить условия, необходимые для возникновения третьего взаимодействия, и его природу, следует более детально исследовать структуру комплексов меди с α -аминокислотами и N-замещенными аминокислотами.

N-Замещенные аминокислоты, и в особенности N-бензиламино кислоты, представляют собой подходящую низкомолекулярную модель фиксированного лиганда хиральных полистирольных смол. Систематическое исследование медных комплексов различных бифункциональных аминокислот, содержащих N-бензильные и N-метильные заместители, показало, что эти комплек-

сы могут образовывать четыре структуры, находящиеся в равновесии:



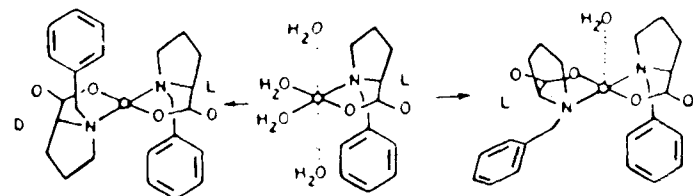
Положение этого равновесия зависит от числа и размера заместителей при атоме азота и α -углеродном атоме, природы растворителя, температуры и концентрации раствора. По стерическим причинам образование двух последних структур в фазе сорбента маловероятно. Ввиду низкой концентрации компонентов в подвижной фазе хроматографической системы эти структуры не могут доминировать и в растворе. В ЛОХ следует рассматривать только две первые структуры.

Одна из них — хорошо известная, окрашенная в голубой цвет структура имеет форму искаженного октаэдра с двумя молекулами растворителя в удаленных от иона меди аксиальных положениях. Карбоксильные и аминогруппы лигандов расположены в главной координационной плоскости (квадрате) в *транс*-положении относительно друг друга. Хотя для объяснения ряда энантиоселективных эффектов иногда предполагают образование *цис*-бис(аминоацидато)меди [126, 127] и, вероятно, этот комплекс присутствует в фазе сорбента, все же мы не имеем очевидных доказательств образования *цис*-структуры. Естественно, что два отрицательных заряженных атома кислорода должны стремиться занимать *транс*-положения, более удаленные друг от друга, чем *цис*-положения. Аналогичным образом, атомы азота с двумя заместителями (атомами водорода или алкильными группами) должны предпочтительно находиться в *транс*-положении для уменьшения несвязывающих взаимодействий.

Вторая предпочтительная структура бис(аминоацидато)меди отличается тем, что аксиальные положения в координационной сфере остаются вакантными. Они блокированы от молекул растворителя алкильными заместителями у азотного и α -углерод-

ного атомов лигандов. Эти четырехкоординационные плоскоквадратные структуры окрашены в необычный красный цвет. Такие структуры образуются также в растворителях, не способных координироваться в аксиальных положениях, например при использовании полистирольных сорбентов с привитыми пролиновыми группами, заряженными ионами меди с неполярными элюентами.

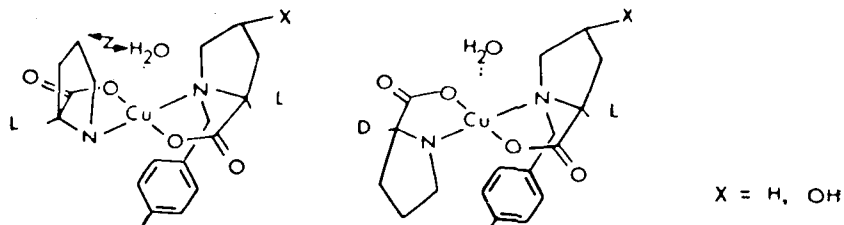
В обоих комплексах, содержащих медь с координационным числом шесть и четыре, боковые группы, присоединенные к асимметрическому атому углерода аминокислотных лигандов, расположены слишком далеко друг от друга, чтобы возникла третья точка взаимодействия между лигандами. В связи с этим было принято думать, что в комплексах меди с бидентатными аминокислотными лигандами энантиоселективность отсутствует [197]. Тем не менее путем прививки бидентатной хиральной аминокислоты *L*-пролина (или *L*-гидроксипролина) к сшитой полистирольной матрице был получен лигандообменник, проявивший энантиоселективность по отношению к рацематам большинства аминокислот [138]. Для объяснения этого явления следует допустить, что определенные элементы нехиральной полистирольной матрицы, а именно *N*-бензильные группы привитого *L*-пролина, осуществляют эффективное взаимодействие с α -R-группами подвижного аминокислотного лиганда в тройном комплексе меди. Действительно, ароматические кольца *N*-бензил-*L*-пролина, как было найдено, занимают аксиальные положения по отношению к ионам меди (II). Однако эта предпочтительная конформация доступна обоим лигандам только в комплексах мезоструктуры (*N*-бензил-*L*-пролинато) (*N*-бензил-*D*-пролинато) меди [Cu₂DL], в то время как в комплексе с парой одинаковых лигандов [CuLL] реализуется искаженная конформация одного из лигандов [102], что можно представить следующей схемой:



Детальное исследование координационного равновесия [98—103] показало, что мезоструктура комплекса бис(*N*-бензилпролинато)меди [CuDL] значительно более стабильна, чем у соответствующего комплекса с парами одинаковых лигандов [CuLL]. В последней структуре одно аксиальное положение может быть занято молекулой растворителя, так что комплекс [CuLL] существует в растворе в определенной степени в форме

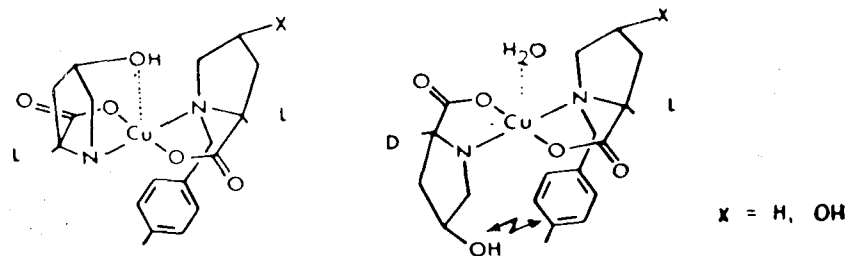
с координационным числом пять, имеющей голубую окраску [103, 198]. В соответствии с этим выигрыш энтальпии в ходе образования комплекса с парами одинаковых лигандов больше, чем в случае образования мезокомплекса. В то же самое время изменение энтропии способствует образованию более симметричного мезокомплекса, окрашенного в красный цвет. Вследствие того что в изученном интервале температур энтропийный вклад преобладает над энтальпийным, мезокомплекс оказался стабильнее на $4,8 \pm 0,8$ кДж/моль по сравнению с комплексами с парами одинаковых лигандов, причем с повышением температуры разница в стабильности несколько возрастала [103].

Можно допустить, что в полистирольном лигандообменнике с привитыми L-пролиновыми группами в сорбционном комплексе реализуется предпочтительная для N-бензил-L-пролина конформация. В этом случае боковая гидрофобная R-группа сорбированной D-аминокислоты приближается к гидрофобным фрагментам матрицы, что выгодно энергетически. Напротив, гидрофобные R-группы L-аминокислот будут стерически взаимодействовать с молекулами воды, координированными в верхнем аксиальном положении [89], как это показано на схеме:



В этом частном случае полистирольная матрица лигандообменника и координированные молекулы воды обеспечивают третью точку взаимодействия, увеличивая удерживание D-аминокислот и снижая удерживание L-энантиомеров, что обуславливает хиральное распознавание D,L-энантиомерных пар аминокислот.

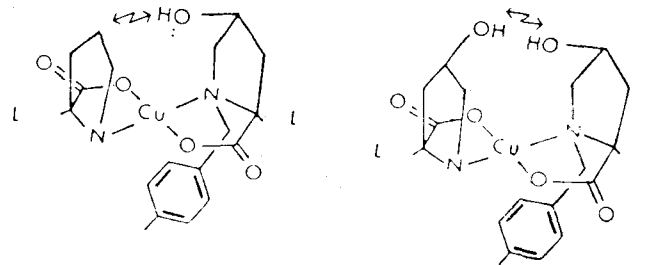
В отличие от бидентатных подвижных лигандов тридентатные аминокислоты типа гистидина, аллогидроксипролина, аспарагина



новой кислоты, глутаминовой кислоты и орнитина способны вытеснять молекулы воды из аксиального положения, если их молекулы имеют L-конфигурацию. Как видно из приведенной выше схемы, L-энантиомеры трифункциональных аминокислот удерживаются сильнее.

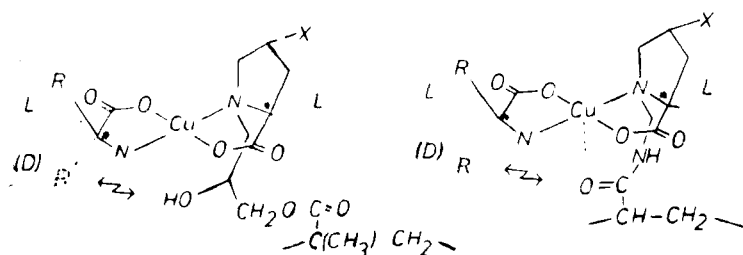
Полистирольные сорбенты с привитыми циклическими хиральными лигандами L-пролином, L-гидроксипролином или L-азетидинкарбоновой кислотой характеризуются общим механизмом расщепления энантиомеров аминокислот: L-изомеры бифункциональных лигандов выходят перед их D-изомерами, а для трифункциональных аминокислот наблюдается обратный порядок.

При использовании сорбентов с привитыми L-аллогидроксипролиновыми группами как бифункциональные, так и трифункциональные подвижные аминокислотные лиганды характеризуются более слабым удерживанием L-энантиомеров:



Предложенные ранее других в качестве расщепляющих агентов для энантиомеров α -аминокислот медные комплексы L-пролина и L-гидроксипролина часто применяются в качестве активных групп в разнообразных хиральных сорбентах, а также в качестве хиральных добавок к подвижной фазе. Примечательно, однако, что они часто меняют свое преимущественное сродство к D- или L-энантиомерам аминокислот в зависимости от используемого хроматографического метода и условий эксперимента. Так, в отличие от полистирольных сорбентов хиральных сорбентов, полученные прививкой L-пролина (или L-гидроксипролина) к поли(2,3-эпоксипропилметакрилату) [76] или полиакриламиду [75], проявляют большее сродство к L-энантиомерам. В этом случае донорные OH- или CO-группы матрицы сорбента, по всей вероятности, занимают нижние аксиальные положения в координационной сфере атома металла [199]. Они не могут вступать в гидрофобные взаимодействия со вторым лигандом, которые стабилизировали бы образующуюся структуру тройного комплекса. Напротив, эти группы сильно затрудняют вращение R-группы (вокруг $C_{\alpha}-C_{\beta}$ -оси) сорбированных D-аминокислот,

ослабляя их удерживание по сравнению с L-энантиомерами [76, 118, 119, 199]:

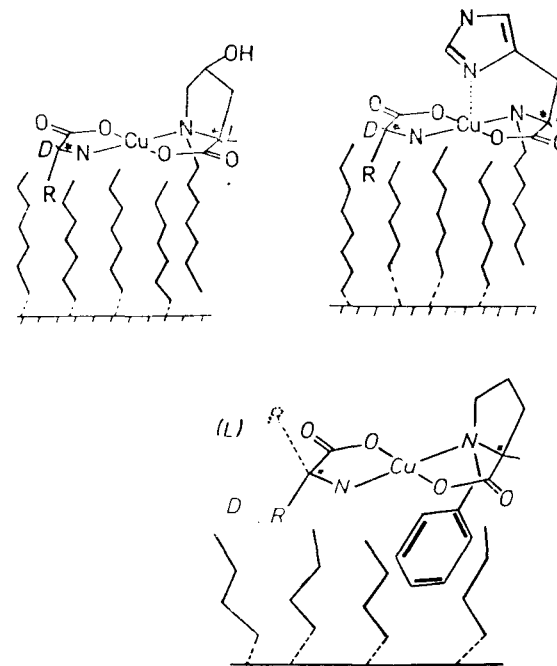


Авторы работы [119] провели корреляцию между величинами α , найденными в ходе хроматографических экспериментов на полиакриламидной матрице с привитыми L-пролиновыми группами, и стерическими требованиями для вращения заместителей R у подвижного лиганда в тройном сорбционном комплексе. Чем больше R-группа, тем больше коэффициент разделения ($\alpha = k'_L/k'_D$) в ряду аминокислот: Ala (~1), Abu (1,25), Nva (1,30), Phe (2,00), Tug (2,20), Trp (2,45). Особенно эффективно влияние разветвления у заместителя R: Val (1,75), Ile (1,55), Ser (1,85), Thr (1,90). Необычное поведение пролина в роли подвижного лиганда (D-энантиомер удерживается в 1,4 раза дольше) можно объяснить неспособностью его циклического заместителя R вращаться вокруг одинарной связи у α -углеродного атома.

Приведенные примеры иллюстрируют тот факт, что природа дополнительных взаимодействий между сорбируемыми энантиомерами и отдельными фрагментами нехиральной матрицы сорбента при образовании тройного сорбционного комплекса часто определяет знак энантиоселективности всей системы. Более того, эти дополнительные взаимодействия могут оказаться необходимыми для самого существования энантиоселективности во многих системах, содержащих комплексы с бидентатными лигандами, поскольку они доводят до трех число точек взаимодействия между двумя хиральными молекулами в тройном комплексе.

Решающая роль дополнительных взаимодействий между разнолигандными сорбционными комплексами и нехиральным сорбентом для хирального распознавания энантиомеров особенно ярко проявляется в методе с использованием хирального элюента в сочетании с обращенно-фазовыми сорбентами. В этом случае имеют место гидрофобные взаимодействия между поверх-

ностью сорбента и углеводородными группами диастереомерных тройных комплексов, содержащих хиральные компоненты элюента и разделяемые энантиомеры. Благодаря этим гидрофобным взаимодействиям разнолигандные комплексы D-изомеров дополнительно стабилизированы* и сильнее удерживаются в том случае, когда N-алкил-L-гидроксипролин [149], N-бензил-L-пролин [202] или N-децил-L-гистидин [150] используются в качестве расщепляющего агента в элюенте:



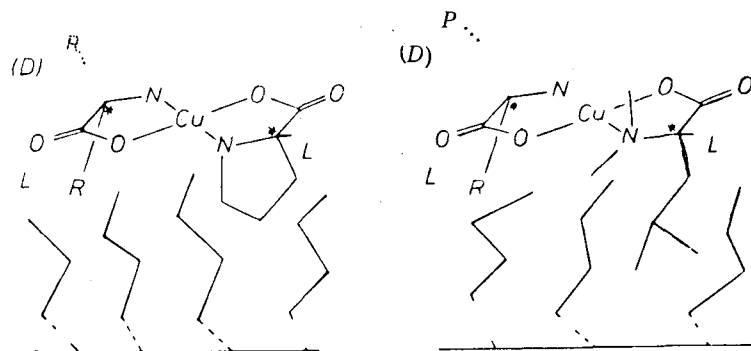
Как можно видеть из приведенной ниже схемы, для хиральных элюентов, содержащих в качестве расщепляющего агента L-пролин [161], N,N-диметил-L-лейцин [202], L-фенилаланин [162, 164] или N,N-ди-(n-пропил)-L-аланин [165], следует ожидать обратный порядок выхода аминокислот (табл. 5.14). Здесь дейст-

* Предположение, что тройные комплексы Cu(D-аминокислота) (N-алкил-L-гидроксипролин) дополнительно стабилизируются благодаря взаимодействию с гидрофобной поверхностью, нашло подтверждение в работах [200, 201], свидетельствующих о более низкой энантиоселективности этих комплексов в растворах бутанола, пентанола или октанола по сравнению с обращеннофазовыми хроматографическими системами.

Таблица 5.14. Селективность расщепления ($\alpha=k'_D/k'_L$) типичных рацемических аминокислот на обращенно-фазовых силикагельных сорбентах, динамически модифицированных медными комплексами хиральных лигандов

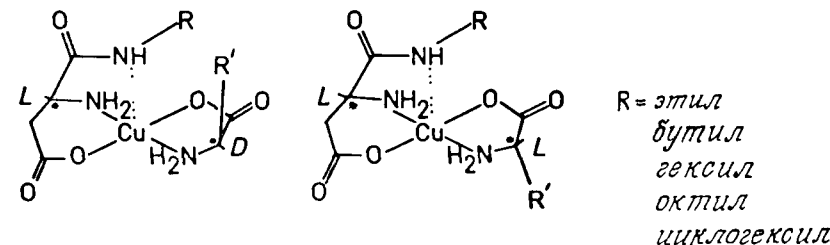
Хиральный модификатор	Литература	Ala	Abu	Val	Leu	Tyr	Phe	Trp	Pro
N-C ₁₆ -L-гидроксипролин	[149]	1,6	—	2,5	3,6	2,8	3,7	2,5	7,5
N-Bzl-L-пролин	[202]	2,0	1,9	2,0	1,8	2,0	—	—	2,6
N-C ₁₀ -L-гистидин	[150]	1,4	1,6	1,8	1,5	1,4	1,7	1,3	1,4
L-Пролин	[161]	0,3	0,2	0,2	0,4	0,4	0,5	—	—
N,N-Ме ₂ -L-лейцин	[202]	0,8	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	—	0,2
N,N-(n-Pr) ₂ -L-аланин	[165]	0,7	0,3	0,4	0,4	0,8	0,7	0,9	0,4
L-Аспартилгексиламид	[171]	1,0	—	1,7	1,8	1,4	—	—	4,4

вительно отмечено более сильное комплексообразование и удерживание L-изомеров:



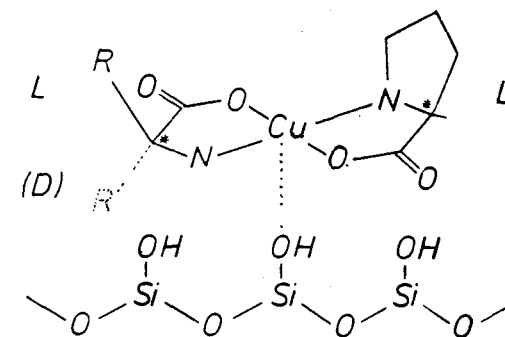
В хиральном элюенте, содержащем бис(L-пролинат) меди, L-изомеры валина удерживаются на обращенно-фазовом силикагеле в 6,5 раз дольше, чем D-валин [161]. Эта величина энантиоселективности соответствует большей прочности сорбционного комплекса Cu(L-Pro)(L-Val) по сравнению с Cu(L-Pro)(D-Val) более чем на 4 кДж/моль, или, выражая то же самое через константы устойчивости соответствующих комплексов, на $\lg \beta_{DL} - \lg \beta_{LL} = 0,81$. Важно отметить, что эти два диастереомерных комплекса имеют одинаковую устойчивость в растворе по крайней мере в следующих пределах: $\Delta \lg \beta = 0,11 \pm 0,29$ [203], или $\Delta \lg \beta = 0,083 \pm 0,008$ [204]. Этот пример иллюстрирует тот факт, что сорбция на поверхности углеводородном слое обращенно-фазовых сорбентов может целиком изменить знак энантиоселективного эффекта в тройных комплексах.

При использовании хирального элюента с L-аспартиламидом меди более сильное удерживание D-энантиомеров аминокислот может объясняться одновременным взаимодействием алкильных групп R и R' D-аминокислотного лиганда и L-аспартилалкиламида с гидрофобной поверхностью сорбента [170—173]:



Естественно, что порядок элюирования оптических изомеров аминокислот, содержащих полярные функциональные группы в боковых заместителях R, отличается от порядка элюирования изомеров алифатических и ароматических аминокислот. Во всех описанных выше системах с гидрофобными обращенно-фазовыми сорбентами полярные заместители преимущественно ориентируются по направлению к полярной подвижной фазе, а не к гидрофобной неподвижной фазе. Вот почему гистидин, серин, аспарагиновая кислота и треонин очень часто элюируются в обратном порядке по сравнению с остальными аминокислотами.

Подобно гидрофобным взаимодействиям с обращенно-фазовыми силикагельными сорбентами полярное взаимодействие, так же как и образование водородных связей, может обуславливать расщепление рацемических тироксина и триодтирониона на немодифицированном силикагеле в присутствии бис(L-пролината) меди в неполярном элюенте [162]. В этом случае координационная плоскость разнолигандного комплекса должна быть обращена к полярной поверхности силикагеля, в то время как гидро-



фобные части L-пролина и указанных выше аминокислот должны быть направлены в сторону элюента. Как следует из такой схемы, координирование и более сильное удерживание L-аминокислот в данной ситуации предпочтительно, что согласуется с экспериментом.

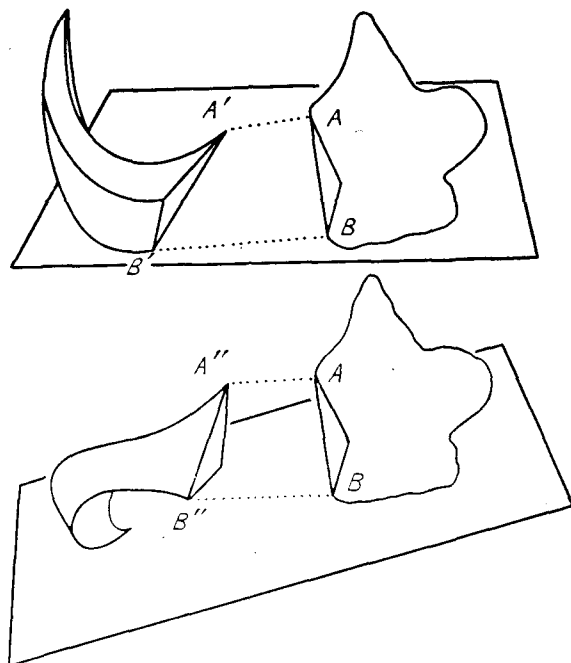


Рис. 5.19. Для взаимного распознавания двух хиральных структур достаточно двухточечного взаимодействия между ними при условии, что каждая из этих структур одновременно находится в контакте с третьим нехиральным компонентом, например с поверхностью сорбента (твердой поверхностью) [202].

Приведенные выше данные о существенной роли определенных фрагментов нехиральной матрицы или поверхности сорбента во взаимном распознавании хиральных конфигураций двух бидентатных лигандов в тройном комплексе позволили Даванкову и Курганову [202] сформулировать важное общее положение о том, что двухточечного взаимодействия между двумя хиральными структурами достаточно для их взаимного хирального распознавания при условии, что эти структуры одновременно находятся в контакте с третьим нехиральным объектом, в частности с твердой поверхностью. Это положение иллюстрируется рис. 5.19, показывающим как нехиральная поверхность вносит свой вклад

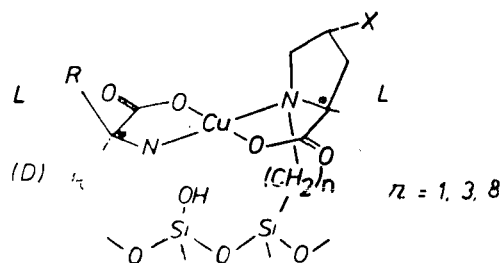
в хиральное распознавание двух энантиомеров хиральным расщепляющим агентом (ср. с рис. 5.1).

Эта точка зрения логично объясняет тот факт, что в гетерогенных хроматографических системах, функционирующих на основе лигандного обмена, энантиоселективность проявляется значительно сильнее, чем в гомогенных растворах комплексов простых бидентатных лигандов. Описана, однако, одна хроматографическая система, где диастереомерные тройные комплексы непосредственно не контактируют с сорбентом. Это наблюдалось в ходе ионообменного разделения рацемических аминокислот с использованием катионообменника на основе сульфированного полистирола в присутствии (L-пролината) меди в элюенте [159], когда все комплексы и свободные аминокислоты распределены в соответствии с их зарядами между фазой сорбента и подвижной фазой. Разделение энантиомеров, вероятнее всего, обусловлено энантиоселективностью комплексообразования в растворе, которая определяет включение энантиомеров в тройные комплексы с L-пролином и, следовательно, величину коэффициента распределения. Важно отметить, что коэффициенты селективности в этой системе очень низки. Взаимное хиральное распознавание двух бидентатных лигандов в растворенных комплексах происходит скорее всего посредством их взаимодействия с молекулами растворителя, координированными в аксиальных положениях иона меди. Участие молекул растворителя в процессе хирального распознавания можно подтвердить фактом сильной зависимости знака и величины энантиоселективности [205] от природы растворителя.

Естественно, что не всегда можно точно определить природу взаимодействий между разделяемыми молекулами, хиральным расщепляющим агентом и нехиральными компонентами системы. Тем не менее, исходя из предположения, что гидрофобные взаимодействия усиливают удерживание D-энантиомеров алифатических и ароматических аминокислот на полистирольных сорбентах с привитыми L-гидроксипролиновыми группами, путем подбора более гидрофобной матрицы удалось улучшить разрешение аланина и аминокислоты [206]. Это было сделано алкилированием стирольных фенильных колец *n*-бутил-, трет-бутил- или циклогексилхлоридом, а также ацилированием циклогексилпропионилхлоридом. (Одновременно с этим существенно ухудшалось разрешение других соединений, в особенности гидрофобных.) С другой стороны, когда цепи полистирола, содержащие L-гидроксипролиновые группы густо прививали к поверхности пористого силикагеля, происходило достаточно неожиданное обращение знака энантиоселективности [143]. Аналогичное обращение характерно для хиральных фаз, полученных прививкой N-(*n*-этиленбензил)-L-гидроксипролина к поверхности

силикагеля [134, 137]. Аномальное поведение последних двух систем, вероятно, можно объяснить стерическими затруднениями при сорбции *D*-изомеров вследствие жесткости поверхности силикагеля сразу же за бензильными группами молекул *L*-пролина.

Аналогичным образом стерические факторы и полярные взаимодействия, вероятно, будут затруднять комплексообразование *D*-аминокислот с *L*-гидроксипролиновыми лигандами, связанными с поверхностью силикагеля через *N*-метиленовые мостики ($n=1$), как это показано на схеме:



При использовании сорбентов с более длинными и гибкими триметиленовыми и октаметиленовыми ($n=3, 8$) мостиковыми группами влияние стерических факторов постепенно уменьшается, а гидрофобные взаимодействия между мостиковыми группами и боковыми заместителями *R* подвижных лигандов усиливаются. В условиях, благоприятствующих гидрофобным взаимодействиям, такие сорбенты начинают проявлять все большее сродство к *D*-изомерам гидрофобных аминокислот [134—136].

В этой связи интересно отметить, что Фейбуш и сопр. [141] не выявили сколько-нибудь значительного влияния микроокружения молекул ундеканойл-*L*-валина, привитого к поверхности силикагеля, на хиральное распознавание энантиомеров дансил-аминокислот в тройных комплексах меди (II). В проведенных ими экспериментах хиральные расщепляющие лиганды были «разбавлены» алкильными C_4 , C_{10} и C_{20} -цепями или пропилид-гидрокси-2-(2'-метоксиэтокси)этановыми группами. Энантиоселективность этой системы зависела от концентрации хиральных фиксированных лигандов. В настоящее время, конечно, трудно обсуждать природу энантиоселективности в разнолигандных комплексах с такими лигандами, как аминокислоты и дансил-аминокислоты, поскольку практически ничего неизвестно об их структуре. Тем не менее в разд. 5.5 этой главы будет показано, что микроокружение сорбирующих участков в хиральных фазах все же оказывает определенное влияние на энантиоселективность расщепления.

Помимо структуры и свойств нехиральной матрицы сорбента компоненты подвижной фазы иногда влияют на энантиоселективность образования комплексов. Так, например, при использовании пиридина в качестве вытесняющего лиганда в элюенте было отмечено уменьшение энантиоселективности расщепления *D,L*-пролина на полистирольных сорбентах с привитыми *L*-пролиновыми группами [177]. Аналогичным образом высокая концентрация аммиака отрицательно сказывается на селективности расщепления рацемических гистидина, пролина, триптофана [86] и лейцина [95] на сорбентах с *L*-гидроксипролином. Это указывает на снижение разницы в устойчивости диастереомерных сорбционных комплексов при координировании молекул аминов в аксиальных положениях этих комплексов.

Высказанные выше идеи об активном участии фрагментов нехиральной матрицы или поверхности сорбента, а также молекул растворителя в процессе хирального распознавания молекул энантиомеров в диастереомерных разнолигандных сорбционных комплексах подтверждают исключительную трудность создания низкомолекулярных моделей этих сорбционных комплексов, которые адекватно представляли бы все важные взаимодействия между их компонентами. Более или менее удовлетворительные модели были предложены для некоторых простых смол гелевого типа, полученных из хлорметилированного или хлорсульфированного полистирола и из полиакриламида. Однако с помощью какой-либо гомогенной системы невозможно представить обращение порядка элюирования энантиомеров аминокислот при замене обращенно-фазового сорбента на немодифицированный силикагель в сочетании с хиральным элюентом, содержащим *N,N,N',N'*-тетраметил-*R*-пропандиаминовый комплекс меди [178].

Для подтверждения этого пессимистичного утверждения приведем другой наглядный пример, иллюстрирующий разнообразие и сложность факторов, управляющих энантиоселективностью хроматографической системы.

Хиральное распознавание считают взаимным, т. е. если хиральный расщепляющий агент (+)А может выявить различие между (+)В и (—)В, то и вещество (+)В должно различать (+)А и (—)А. Более того, следует ожидать, что на хиральном обращенно-фазовом сорбенте селективность расщепления диастереомерной пары разнолигандных комплексов (+)А и (+)В и (+)А и (—)В в элюенте, содержащем (+)А, должна точно соответствовать селективности разделения комплексов (+)А—(—)В и (—)А—(+)В в элюенте, содержащем (+)В. Для экспериментальной проверки этого теоретического положения рацемические пролин, гидроксипролин, аллогидроксипролин и ряд их *N*-метил- и *N*-бензилпроизводных разделяли на энантиомеры в элюенте вода—ацетонитрил, содержащем мед-

ные(II) комплексы ряда оптически активных изомеров тех же самых аминокислот [207]. Как было найдено, величины энантиоселективности для соответствующих пар диастереомеров существенно отличаются друг от друга. Были даже отмечены случаи полного обращения порядка выхода. Например, при использовании в качестве расщепляющего агента в элюенте медного комплекса L-аллогидроксипролина первым выходил D-изомер N-бензилаллогидроксипролина, а затем его L-антипод. При применении же N-бензил-L-аллогидроксипролина в качестве расщепляющего агента в элюенте порядок элюирования энантиомеров аллогидроксипролина был обратным. В первой системе наиболее сильно удерживается комплекс (+)A—(+)B, в то время как во второй системе он удерживается слабее стереомера (+)A—(—)B. Поскольку концентрация хиральной добавки в элюенте была сравнительно низкой (10^{-3} M), то в подвижной фазе не могло произойти изменения относительных стабильностей двух диастереомерных тройных комплексов. Логично было бы ожидать существенных изменений в составе и сорбционных свойствах поверхностного сорбирующего слоя, поскольку после кондиционирования с упомянутыми выше двумя элюентами этот слой должен содержать большее количество VzI—L-aНур, чем L-aНур. Очевидно, что именно эта разница в составе неподвижной фазы приводит к обращению знака энантиоселективности хроматографической системы. Подобным же образом незначительные изменения в концентрации хиральной добавки или органического растворителя в элюенте могут привести к изменению энантиоселективности колонки. Ни одна из низкомолекулярных моделей комплексов не может отразить такие особенности многокомпонентной гетерогенной системы.

5.5. Термодинамика образования диастереомерных сорбционных комплексов

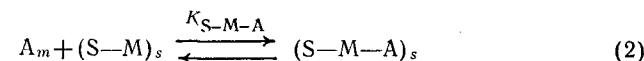
В этом разделе хроматографические системы с хиральными хелатообразующими сорбентами и хиральными элюентами будут рассмотрены отдельно. В первой системе энантиомеры распределены между двумя фазами, а диастереомерные тройные комплексы образуются только в фазе сорбента. Во второй, более сложной, системе тройные комплексы существуют в обеих фазах, существенно отличаясь друг от друга по структуре, стабильности и энантиоселективности.

Наиболее простой случай представляет собой жесткий силикагельный сорбент с очень низкой концентрацией привитых к поверхности неподвижных лигандов S. В этом случае каждый сорбируемый ион металла M может вступать в координационное взаимодействие только с одним неподвижным лигандом, образуя

комплекс 1:1 (S—M). Этот случай реализован, например, в «разбавленной» хиральной привитой фазе [141], где $0,13$ мкмоль/м² N-ундеcanoил-L-валина приходится на $3,0$ мкмоль/м² децильных групп. Удерживание подвижного лиганда A может включать его распределение между подвижной и неподвижной фазами:



а также образование тройного сорбционного комплекса:



где индексы *m* и *s* относятся соответственно к подвижной и неподвижной фазам, а заряды всех компонентов опущены. Коэффициент емкости *k'* вещества A описывается уравнением

$$k' = \varphi(K + K_{S-M-A}[S-M]_s) = k'_o + \varphi K_{S-M-A}[S-M]_s \quad (3)$$

где φ — фазовое соотношение.

Величину энантиоселективности α системы подсчитывают следующим образом:

$$\alpha = \frac{k'_D}{k'_L} = \frac{k'_o + \varphi K_{S-M-A}^D [S-M]_s}{k'_o + \varphi K_{S-M-A}^L [S-M]_s} \quad (4)$$

Величина энантиоселективности изменяется в зависимости от условий хроматографического анализа в соответствии с изменением вкладов неселективного удерживания [уравнение (1)] и энантиоселективного комплексообразования [уравнение (2)]. Исправленная величина энантиоселективности комплексообразования α должна характеризовать систему более адекватно:

$$\alpha = \frac{k'_D - k'_o}{k'_L - k'_o} = \frac{K_{S-M-A}^D}{K_{S-M-A}^L} \quad (5)$$

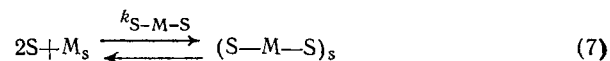
поскольку она представляет собой отношение констант устойчивости двух диастереомерных сорбционных комплексов (S—M—A)^D и (S—M—A)^L и связана с разностью свободных энергий образования этой диастереомерной пары:

$$\delta \Delta G = -RT \ln \alpha \quad (6)$$

Для получения этого важного параметра необходимо знать *k'*_o, т. е. удерживание вещества в системе без металла.

При высокой поверхностной концентрации привитых хиральных лигандов, например $2,4$ мкмоль/м² N-ундеcanoил-L-валиновых групп [141], в неподвижной фазе преимущественно образу-

ются комплексы металла с неподвижным лигандом S—M—S состава 2 : 1:



Константы устойчивости этих комплексов равны

$$K_{S-M-S} = \frac{[S-M-S]_s}{[S]^2[M]_s} = K_{S-M} \frac{[S-M-S]_s}{[S][S-M]_s} \quad (8)$$

Тогда концентрация неподвижного монокомплекса (который один способен связывать подвижный лиганд А) равна

$$[S-M]_s = \frac{K_{S-M}}{K_{S-M-S}} \frac{[S-M-S]_s}{[S]} \quad (9)$$

Путем подстановки уравнения (9) в уравнение (3) получаем выражение для удерживания подвижного лиганда:

$$k' = k'_o + \varphi K_{S-M-A} \frac{K_{S-M}}{K_{S-M-S}} \cdot \frac{[S-M-S]_s}{[S]} \quad (10)$$

Экспериментальное сравнение упомянутых выше разбавленных и концентрированных привитых N-ундеканол-л-валиновых фаз [141] неожиданно показало, что дансиламинокислоты удерживаются на концентрированных фазах значительно слабее. Очевидно, равновесная концентрация активных центров сорбции (т. е. неподвижных монокомплексов S—M) выше в случае разбавленных фаз, где эти комплексы не могут превращаться в менее активные бис-структуры S—M—S.

Те же авторы [141] также отметили более низкую селективность расщепления рацемических дансиламинокислот концентрированными фазами. Эта тенденция сохраняется и после введения в приведенные в статье данные поправки на селективный вклад чистого удерживания в соответствии с уравнениями (1), (3) и (5). Поскольку отношение констант устойчивости диастереомерных сорбционных комплексов определяет величину энантиоселективности как концентрированных, так и разбавленных фаз [уравнение (5)], единственным объяснением разброса величин α выступает отмеченная выше разница в микроокружении сорбционных комплексов в разбавленных и концентрированных фазах. Концентрированные фазы обогащены сильно полярными донорными группами, в то время как разбавленные фазы заметно гидрофобны, что приводит к определенным структурным изменениям в сорбционных комплексах.

Буэ и сотр. [119] отметили, что коэффициент емкости k' данной конкретной аминокислоты не возрастает линейно с увеличением числа центров сорбции в колонке, т. е. обменной емкости колонки. Исследованную насадку готовили прививкой л-пролина к полиакриламиду с помощью формальдегида. Максимум удерживания был отмечен для степени замещения пролиновыми лигандами в полимере $p=0,33$ (обменная емкость смолы составила приблизительно 3 мкмоль/г). Авторы предположили, что две вицинальные группы пролина образуют с ионом меди комплекс (2 : 1) S—M—S, который слишком устойчив, чтобы участвовать в лигандном обмене, и только одиночные группы пролина, образующие комплекс (1 : 1) S—M, ответственны за удерживание и разделение аминокислот. Если p соответствует вероятности нахождения привитой группы на данном повторяющемся звене полимера, то $1-p$ соответствует вероятности существования звена, к которому неподвижный лиганд не привит. Следовательно, вероятность существования привитого звена с двумя свободными вицинальными положениями составляет $p(1-p)^2$. Как было найдено, удерживание энантиомеров аминокислот изменяется в зависимости от степени прививки остатков л-пролина к полимеру параллельно указанной функции. Следует отметить, что в мягких лигандообменниках гелевого типа стабильные бис-комплексы S—M—S могут быть образованы не только двумя вицинальными привитыми группами, но и привитыми группами, расположенными на разных полимерных цепях. Тем не менее следует ожидать, что максимальное средство подвижных лигандов к хиральной смоле будет наблюдаться при средних степенях замещения, а не при максимальной концентрации фиксированных лигандов.

Другим важным фактором, влияющим на удерживание лигандов, является концентрация ионов металла-комплексобразователя в неподвижной фазе. Французские исследователи [75, 119] установили, что коэффициенты емкости полиакриламидной смолы с л-пролиновыми остатками быстро растут с ростом степени r насыщения смолы ионами меди (II) почти пропорционально функции $r(1-r)$, где $r=1$ при образовании в фазе сорбента исключительно неподвижных комплексов (2 : 1) S—M—S. Даванков и сотр. [88] установили, что удерживание k' является экспоненциальной функцией r , как это показано на рис. 5.20. Эксперименты проводили с полистирольным гелем, содержащим 3,44 ммоль/г остатков л-гидроксипролина.

Термодинамику лигандного обмена более детально исследовали на примере полистирольных хиральных смол, содержащих остатки л-пролина [208, 209]. В ходе исследования распределения ионов металла-комплексобразователя (меди) и подвижных лигандов (л-пролина) между фазой набухшей смолы и раствором

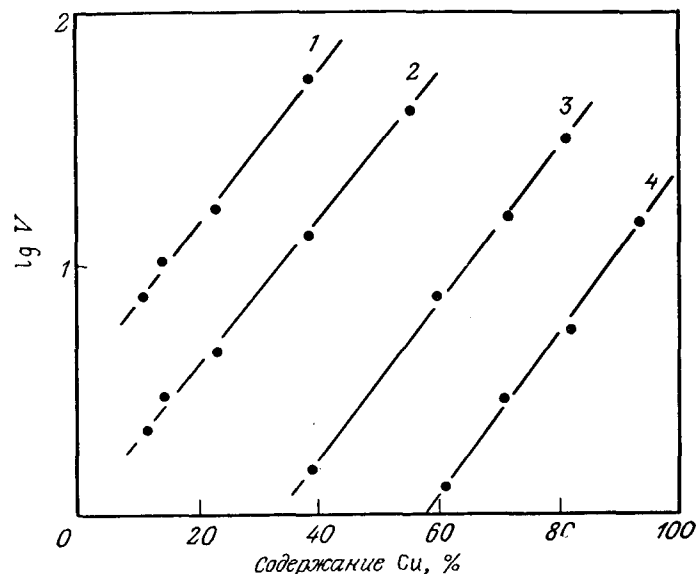
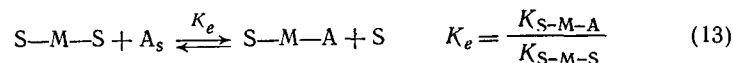
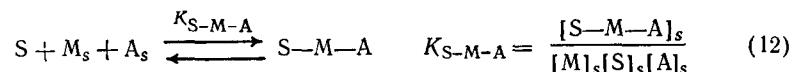
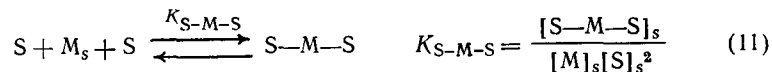


Рис. 5.20. Влияние степени насыщения смолы с привитыми L-гидроксипролиновыми группами (3,44 ммоль/г, степень сшивки 11%) ионами меди(II) на удерживаемые объемы подвижных лигандов (измеренные в мертвых объемах колонки) при элюировании 0,1 M NH₄OH. Последовательность элюирования: 1 — D-Trp; 2 — L-Trp; 3 — D-Pro; 4 — L-Pro [88].

была предпринята попытка рассчитать константы устойчивости как неподвижных бис-комплексов S—M—S, так и разнолигандных сорбционных комплексов S—M—A в различных условиях эксперимента. Равновесие описывали следующим образом:



Важно помнить, что для получения этих термодинамических констант равновесия необходимо использовать активности (или по меньшей мере концентрации) всех компонентов в фазе смолы. Для хроматографических целей, однако, достаточно знать фазовое распределение меди(II) и L-пролина в различных условиях эксперимента и в качестве первого приближения допустить, что концентрации не вступивших в комплексообразование меди

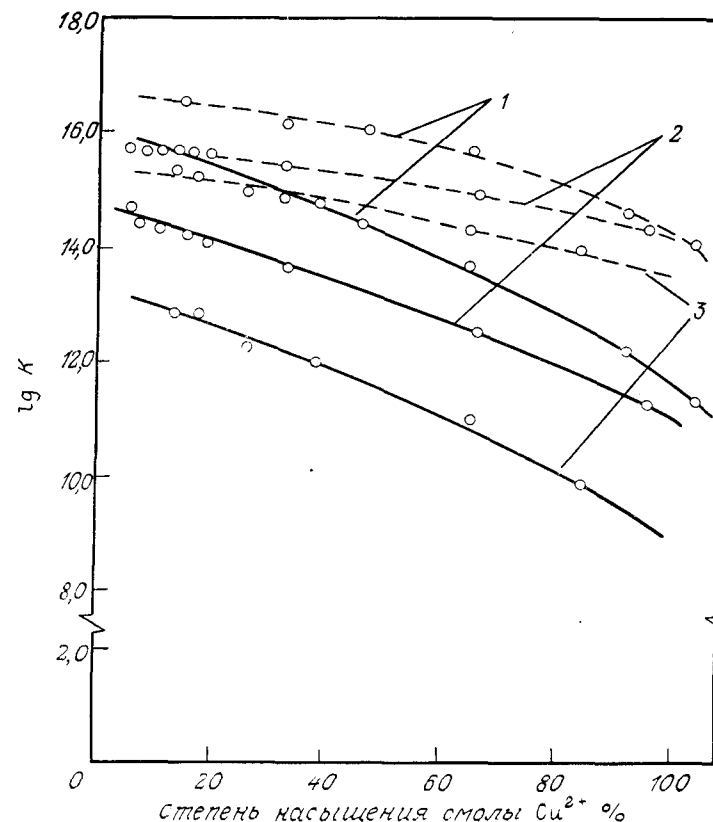


Рис. 5.21. Кажущиеся константы устойчивости неподвижных бис-комплексов S—M—S (—) и разнолигандных сорбционных комплексов S—M—A (---) в широком интервале насыщения медью(II) смолы с привитыми L-пролиновыми группами (2,71 ммоль/г, степень сшивки 10%): 1 — pH > 11,0; 2 — pH > 11,0; 1 M KCl; 3 — pH 8,0, 1 M KCl [209].

и пролина в фазе смолы равны их концентрациям в подвижной фазе. Полученные таким образом результаты, представленные на рис. 5.21, позволяют сделать следующие выводы.

1. Устойчивость неподвижных бис-комплексов S—M—S быстро уменьшается с повышением степени насыщения хиральной смолы ионами меди. Это — основополагающая особенность сорбентов, образующих неподвижные комплексы состава 2 : 1 с ионами металла, на что впервые указал Геринг [210]. Действительно, первые ионы металла, попадающие в фазу сорбента, могут вступать в координационное взаимодействие с пара-

ми фиксированных лигандов, наиболее благоприятно расположенных в пространстве, образуя при этом устойчивые бис-комплексы S—M—S. Каждая последующая порция ионов металла может найти только менее благоприятно расположенные пары фиксированных лигандов. Вовлеченные в комплексообразование лиганды должны перемещаться в положение, соответствующие геометрии бис-комплекса; при этом энергия деформации соответствующих полимерных цепей уменьшает устойчивость образующихся бис-комплексов. Ясно, что константы устойчивости бис-комплексов S—M—S в фазе сорбента будут зависеть еще и от ряда дополнительных факторов помимо степени протекания процесса комплексообразования. Наиболее важными факторами должны быть а) концентрация привитых лигандов, б) жесткость матрицы сорбента, в) длина и гибкость мостиковой группы между лигандом и матрицей, г) геометрия бис-хелата. Экспериментально установленные константы устойчивости неподвижных бис-комплексов в фазе сорбента могут быть выше или ниже константы устойчивости растворимого низкомолекулярного модельного комплекса в зависимости от структуры сорбента и условий эксперимента.

2. Средство лигандообменных смол с пролиновыми группами к ионам меди (II) особенно высоко в щелочной среде (где неподвижные аминокислотные лиганды принимают анионную форму, необходимую для комплексообразования) и в отсутствие таких электролитов, как KCl. Это вытекает из распределения Доннана, способствующего концентрированию положительно заряженных ионов меди в отрицательно заряженной фазе сорбента.
3. Уменьшение констант устойчивости тройных сорбционных комплексов S—M—A с увеличением содержания меди в фазе смолы менее выражено, чем уменьшение устойчивости неподвижных комплексов S—M—S. Разнолигандная структура S—M—A содержит только один лиганд, привитый к матрице. Второй подвижный лиганд A координируется с центральным ионом металла, не вызывая какого-либо напряжения в полимерной матрице, если, конечно, имеющегося пространства достаточно для образования объемного комплекса.
4. Образованию сорбционного комплекса S—M—A также благоприятствует щелочная среда и отсутствие KCl. Эти явления всего лишь отражают возрастание концентрации ионов меди в фазе сорбента.
5. Константы устойчивости сорбционных комплексов S—M—A в исследуемой системе выше, чем у исходных неподвижных комплексов S—M—S. Это свидетельствует о высоком сродстве смолы к подвижным L-пролиновым лигандам. Различие

в устойчивости этих двух бис-комплексов постепенно возрастает с увеличением содержания меди в фазе сорбента. Это должно приводить к увеличению коэффициентов емкости разделяемых веществ, что находится в полном соответствии с экспериментальными данными (см. рис. 5.20).

Для определения истинных, а не кажущихся констант устойчивости неподвижных и сорбционных комплексов необходима дополнительная информация, в том числе константы диссоциации как неподвижных, так и подвижных лигандов, равновесное содержание воды в фазе сорбента, коэффициенты распределения нехелатированных ионов меди (II) между раствором подвижных лигандов и отрицательно заряженной фазой сорбента, соответствующие коэффициенты распределения подвижных лигандов в анионной форме. Константы диссоциации карбоксильных и аминокислотных групп в полистирольной насадке с привитыми L-пролиновыми группами (макросетчатая изопористая матрица со степенью сшивки 11%, обменной емкостью 2,7 ммоль/г, набухаемостью 180 вес. % при pH 9,7) составляют соответственно 2,2 и 9,5 ($n=1,8$) [208], что находится в хорошем соответствии с константами диссоциации [99] N-бензил-L-пролина ($2,12 \pm 0,05$ и $9,77 \pm 0,05$). Аналогичным образом после подстановки в расчеты приведенных выше дополнительных величин константы устойчивости неподвижных бис-комплексов S—M—S и сорбционных комплексов S—M—A с L-пролином в качестве подвижного лиганда A оказываются близкими [208, 209] к константам устойчивости низкомолекулярных моделей [99, 104]:

$$\lg \beta = 12,4 \pm 0,1 \text{ для } \text{Cu}(\text{N-Bzl-L-Pro})_2$$

$$\lg \beta = 14,9 \pm 0,2 \text{ для } \text{Cu}(\text{N-Bzl-L-Pro})(\text{L-Pro})$$

$$\lg \beta = 11,4 \div 12,5 \text{ для } \text{S-M-S}$$

$$\lg \beta = 14,5 \div 15,1 \text{ для } \text{S-M-A}$$

(последние два значения были определены при различных условиях эксперимента). В случае сорбции D,L-пролина в статических условиях величина энантиоселективности 1,9 кДж/моль [3, 211] более или менее соответствует величине 3,5 кДж/моль, найденной в хроматографических условиях [58], и величине $3,8 \pm 0,8$ кДж/моль, полученной при исследовании раствора диастереомерных модельных комплексов Cu(N-Bzl-L-Pro)(L-Pro) и Cu(N-Bzl-L-Pro)(D-Pro) [104]. Однако не следует переоценивать правильность сравнения полимерных и модельных систем, особенно в отношении констант устойчивости бис-комплексов S—M—S и величин энантиоселективности.

Последняя часть этого раздела посвящена хроматографическим системам на основе хирального элюента. Эти системы значительно сложнее ввиду большого числа компонентов и соответ-

ствующих равновесий. До сих пор описание подобных систем отсутствует. Грушка и сотр. [173] сделали очень большое упрощение, опустив процесс комплексообразования между расщепляющей хиральной добавкой R и ионами металла и рассматривая образование центров сорбции в неподвижной фазе как простое фазовое распределение хиральных хелатов металла R—M:

$$K_{R-M} = \frac{[R-M]_s}{[R-M]_m} \quad (14)$$

В этом случае удерживание вещества A можно описать следующим образом:

$$k' = k'_o + \varphi K_{(R-M-A)_s} [R-M]_s = k'_o + \varphi K_{(R-M-A)_s} K_{R-M} [R-M]_m \quad (15)$$

В какой-то мере уравнение (15) объясняет возрастание удерживания аминокислоты A при увеличении концентрации аспартилциклогексиламида меди в элюенте в обращенно-фазовой системе [173]. Как было показано ранее, это справедливо только тогда, когда гидрофобность хиральной добавки R больше гидрофобности вещества A, что справедливо для данного эксперимента. Авторы работы [173] рассчитали кажущиеся величины $K_{(R-M-A)_s}$, а также их температурную зависимость. Однако получаемые из нее соответствующие термодинамические величины в большей степени характеризуют хроматографическую систему в целом, чем отдельный сорбционный комплекс $(R-M-A)_s$.

5.6. Лигандный обмен во внешней координационной сфере стабильных комплексов

Пространственное расположение лигандов в координационной сфере ионов переходных металлов всегда было предметом активного исследования. Поскольку важные выводы о симметрии комплекса можно сделать на основании наличия или отсутствия оптической изомерии, были предприняты многочисленные попытки разделить, хотя бы частично, стабильные комплексы на энантиомеры. Хроматография в этом отношении оказалась особенно продуктивной. Было показано [6—8], что разделение оптических изомеров кинетически инертных октаэдрических комплексов кобальта(III), хрома(III) и родия(III) на таких природных асимметрических сорбентах, как целлюлоза, крахмал и лактоза (последняя использовалась в неводной среде), происходит легче, чем расщепление обычных органических рацемических соединений. Большинство этих экспериментов проводили, не уделяя достаточного внимания механизму хирального распознавания, но в свете последних данных легкость разделения инертных комплексов логично приписать лигандному обмену в их внешней координационной сфере.

Как известно, внешняя координационная сфера (т. е. сольватная оболочка) инертного комплекса характеризуется высокой степенью регулярности. Лиганды внешней сферы связаны через водородные связи или дипольные взаимодействия с донорными гетероатомами лигандов внутренней сферы, фиксированных в главных координационных положениях центрального атома металла. Например, было найдено, что молекулы метанола связываются с амино- и карбоксильными группами, координированными с медью (II) в комплексе бис(N-бензилпролинато) меди, задолго до того, как аксиальные положения комплекса оказываются занятыми метанолом [100, 101]. Энергия связывания лигандов во внешней координационной сфере может достигать нескольких кДж/моль (или более 10 кДж/моль для полидентатных лигандов), что вполне удобно для создания соответствующих хроматографических процессов. Лигандный обмен во внешней координационной сфере — достаточно быстрый процесс, позволяющий вовлечь огромное число кинетически инертных комплексов в высокоэффективный лигандообменный хроматографический процесс.

Расщепление рацемических комплексов на целлюлозе и других углеводных сорбентах, возможно, обусловлено тем обстоятельством, что асимметрично расположенные гидроксильные группы этих сорбентов входят во внешнюю координационную сферу одного энантиомерного комплекса легче, чем во внешнюю координационную сферу его антипода. Таким образом молекулы растворителя замещаются из внешней координационной сферы лигандными группами сорбента, что вызывает удерживание комплекса в хроматографической колонке.

Уже в 1954 г. Кребс и сотр. [212, 213] разделили энантиомеры ряда октаэдрических комплексов [например, трис(глицинат)кобальта(III)], используя крахмал в качестве хирального сорбента. Термины «ЛОХ» и «энантиоселективность» в то время еще не существовали. Примечательно, что успешное разделение рацемических комплексов по методу «хирального элюента» и «хирального покрытия» также было описано задолго до того, как они были выделены хроматографистами в самостоятельные аналитические методы. Так, например, Йошикава и Ямасаки [214] в 1970 г. описали применение растворов (+)-тартрата для хроматографического разделения рацемических комплексов диаминов и триаминов с кобальтом(III) $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{dien})_2]^{3+}$ и $[\text{Co}(\text{tn})_3]^{3+}$ на катионообменниках — декстрановом геле или целлюлозе. В 1961 г. Пипер [215] использовал оксид алюминия, покрытый (+)-винной кислотой, при разделении трис(ацетилацетонатов) хрома(III) и кобальта(III). Кроме того, описана попытка сочетать хиральный элюент и хиральный сорбент [216]: разделение $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ на (—)-тартратсодержащем

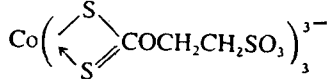
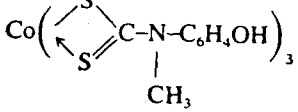
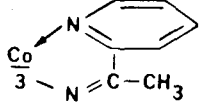
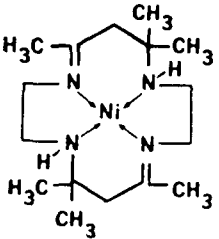
сефадексе заметно улучшилось при использовании раствора (+)-тартрата натрия в качестве элюента вместо растворов нехиральных солей.

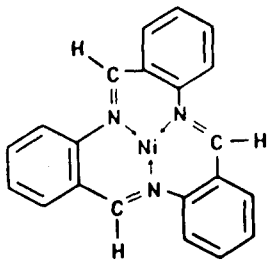
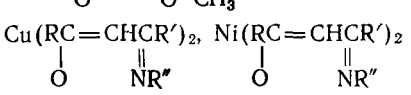
В табл. 5.15 перечислены типичные хиральные комплексы, разделенные на природных и химически модифицированных углеводах. Поскольку низкомолекулярные сахара растворимы в воде, их необходимо применять в неполярных органических растворителях. На крахмале и целлюлозе в водных или водно-органических элюентах разделяли энантимеры как нейтральных, так и заряженных комплексов. Для хроматографического разделения катионных комплексов использовали карбоксиметилированную и фосфорилированную целлюлозу, тогда как анионообменную диэтиламиноэтилцеллюлозу необходимо было комбинировать с отрицательно заряженными комплексными ионами. Более подробное перечисление разделений энантимерных комплексов на ионообменных целлюлозных сорбентах можно найти в обзоре Йошикавы и Ямасаки [273].

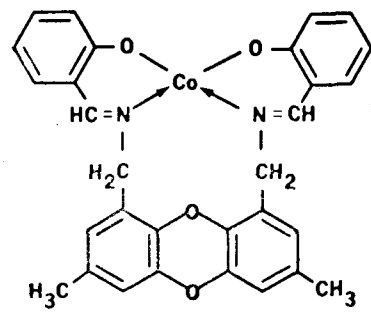
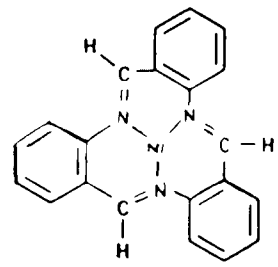
В табл. 5.16. перечислены некоторые синтетические хиральные насадки. Простейшая из них была получена адсорбцией D-лактозы на оксиде алюминия. Оптически активные тартрат-анионы после их адсорбции на поверхности оксида алюминия или электростатической иммобилизации на анионообменных смолах также служили эффективными хиральными расщепляющими агентами по отношению к октаэдрическим комплексам. Аналогичным образом хроматографическую колонку можно заполнить и хиральными октаэдрическими комплексами в форме мелких кристаллов, а также в адсорбированном состоянии на монтмориллонитовой глине или гранулах ионообменных смол. Описана интересная попытка [268] приготовить хиральную ЛОХ реакцию (2-аминоэтил)аминопропилсилилированного кремнезема с комплексом λ -(+)-[Co(en)₂(NO₃)₂]Br. С помощью этого хирального сорбента, приготовленного на основе иммобилизованных кинетически инертных комплексов (табл. 5.16), можно разделять на энантимеры как рацемические комплексы, так и органические лиганды.

Более перспективным и интенсивно развивающимся направлением [214] является ионообменная хроматография рацемических комплексов в присутствии оптически активных добавок к элюенту, в частности D-тартрата натрия или комплекса K₂[Sb₂(d-tart)₂]. Авторы «метода хирального элюента» Йошикава и Ямасаки привели в своем обзоре более 100 успешных расщеплений октаэдрических комплексов на ионообменных декстрановых гелях, преимущественно на сульфопропилированном сефадексе [273]. Эти сорбенты характеризуются высокой набухаемостью, а также относительно низкой концентрацией ионо-

Таблица 5.15. Комплексы, расщепленные на энантимеры с помощью хиральных углеводов

Комплекс	Литература
<i>Крахмал</i>	
Co(en) ₃ ³⁺	[212, 213, 218]
Cr(en) ₃ ³⁺	[213, 218]
Co(gly) ₃	[212, 213, 219, 220]
Co(ox) ₃ ³⁻	[213]
Cr(ox) ₃ ³⁻	[213, 218]
Co(en) ₂ (gly) ²⁺	[213, 218]
Co(en) ₂ (NO ₂) ₂ ⁺	[213, 218]
Co(en) ₂ (X) ₂ ⁺ , (X) ₂ = (NO ₃) ₂ , (CO ₃) ₂	[218]
(ox), (NO ₂)(Cl)	
Co(glygly) ₂ ⁻	[220]
Co(i-abu) ₃	[221]
Co(edda)(gly)	[222]
Co() ₃ ³⁻	[212, 213]
Co() ₃	[213]
	[213, 218]
	[223]

Комплекс	Литература
 <p style="text-align: center;">D-(+)-лактоза</p> <p>Cr(acac)₃ Co(acac)₃ Ru(acac)₃ Rh(acac)₃ Y(acac)₃, Cd(acac)₃ Co(3-Br-acac)₃ Co(bzac)₃ Cr(bzac)₃ Co(H₃CC=CHCCH(CH₃)₃)  где R и R' — CH₃ или C₆H₅, R'' — H, C₆H₅ или 2,6-C₆H₃(CH₃)₂</p> <p style="text-align: center;">D-(+)-лактоза</p>	<p>[224]</p> <p>[225—228] [225—230] [227] [226, 227, 229] [231] [229] [227] [232] [233]</p> <p>[234]</p> <p>[235]</p> <p>[236]</p>

Комплекс	Литература
<p style="text-align: center;">D-(+)-сорбит</p> <p>Co(acac)₃ Cr(acac)₃ Co(acac)₃</p> <p style="text-align: center;">D-(+)-манит</p> <p>Co(acac)₃ Cr(acac)₃ Co(bzac)₃</p> <p style="text-align: center;">D-(+)-глюкоза</p>  <p style="text-align: center;">Целлюлоза</p> <p>Co(ox)₃³⁻ Co(gly)₃ Co(ala)₃ цис-Co(ox)₂(H₂O) Co(dien)_n(L-pn)³⁺³⁻ⁿ, n = 1, 2, 3</p> 	<p>[237] [237] [237]</p> <p>[237] [237] [237]</p> <p>[238]</p> <p>[218] [239] [239] [239] [240] [224]</p>

Комплекс	Литература
CM-Целлюлоза	
<i>cis</i> -[Co(ida) ₂] ⁻	[241]
[Co(tmdata)] ⁻	[241]
[Co(en)(edda)] ⁺ и	[241]
[(H ₂ N(CH ₂ CH ₂ S) ₆ Co ₃) ³⁺	[242]
[Rh(phen) ₂ (Cl) ₂] ⁺	[243]
P-Целлюлоза	
[Co(en) ₃] ³⁺	[244]
[Co(dien) ₂] ³⁺	[244]
DEAE-Целлюлоза	
[Co(ida) ₂] ⁻	[244]
[Co(edta)] ⁻	[244]
Обозначения:	
асас	ацетилацетонат
actp	3-(2-аминоэтилтио)пропionato H ₂ N(CH ₂) ₂ S(CH ₂) ₂ COO ⁻
i-abu	α-аминоизобутирато
bipy	2,2'-бипиридил
bzac	бензоилацетонат
chxn	<i>транс</i> -1,2-циклогександиамин
cydta	<i>транс</i> -1,2-циклогександиаминтетраацетат
dien	диэтилентриамин
edda	этилендиамин-N,N'-диацетат
edta	этилендиаминтетраацетат
en	этилендиамин
glygly	глицилглицинато
ida	иминодиацетат
mal	малонат
medien	N-метилдиэтилентриамин
ox	оксалат
phen	1,10-фенантролин
pn	1,2-пропандиамин
py	пиридин
sep	1,3,6,8,13,16,19-октаазабицикло [6,6,6] эйкозан
tdta	1,4-бутандиаминтетраацетат
tmdata	триметилендиаминтетраацетат
tn	1,3-пропандиамин
trien	триэтилентетраамин

Таблица 5.16. Перечень комплексов и лигандов, расщепленных на энантиомеры с помощью хиральных сорбентов

(Обозначения см. в табл. 5.15)

Оксид алюминия+ <i>d</i> -тарtrat	Co(асас) ₃ , Cr(асас) ₃ [215, 245]
Оксид алюминия+D-лактоза	Cr(асас) ₃ [245]; Co(асас) ₃ [246]; Al(асас) ₃ и Fe(асас) ₃ [247, 248]
Карбоксильный катионообменник+(+)-[Co(en) ₃] ³⁺	Co(edta) ⁻ [249]; аспарагиновая и миндальная кислоты [250]
Анионообменник IRA 400+ <i>d</i> -тарtrat	[Co(en) ₃] ³⁺ , [Co(pn) ₃] ³⁺ , [Co(en) ₂ (ox)] ⁺ , [Co(en) ₂ (H ₂ O) ₂] ³⁺ , [Co(en) ₂ (bipy)] ³⁺ , [(en) ₂ Co(OH) ₂] ₃ Co ⁶⁺ , [Cr(en) ₃] ³⁺ , [Cr(pn) ₃] ³⁺ , [Rh(en) ₃] ³⁺ , [Rh(pn) ₃] ³⁺ , [Co(en) ₃ (phen)] ³⁺ [251]
(+)-K[Co(gly) ₂ (NO ₂) ₂]	Co(асас) ₃ , Cr(асас) ₃ [252]
(+)-K[Co(L-ala) ₂ (NO ₂) ₂]	Co(асас) ₃ , Cr(асас) ₃ [252]
(+)-[Co(L-arg) ₂ (NO ₂) ₂]Cl	Co(асас) ₃ , Cr(асас) ₃ [252]
(-)-[Co(L-arg) ₂ (NO ₂) ₂]·(+)-[Co(gly) ₂ (NO ₂) ₂]	Co(асас) ₃ [252]
(-)-[Co(L-arg) ₂ (NO ₂) ₂]·(+)-[Co(gly) ₂ (NO ₂) ₂]	Co(асас) ₃ [252]
Монтмориллонит+Δ-[Ni(phen) ₃] ²⁺	Co(асас) ₃ [253—255]; Cr(асас) ₃ [254]; Rh(асас) ₃ [254]; Ru(асас) ₃ [256]; Co(асас) ₂ (gly), Co(асас)(gly) ₂ [255]; Co(асас) ₂ (AA), где AA=val, leu, thr, met, phe, gly, ala, ser, pro, trp [257]
Монтмориллонит+λ-[Ru(phen) ₃] ²⁺	Co(асас) ₃ , Cr(асас) ₃ , Rh(асас) ₃ [258]; 2,3-дигидро-2-метил-5,6-дифенилпиразин [259]; пролин, гидроксипролин, 5-метил-2-пирролидинон, γ-валеролактон, 2-пиперидинкарбоновая кислота, 4-тиазолидинкарбоновая кислота [260]; Co(диметилглиоксимато) ₃ , As(катехолато) ₃ ⁻ , Fe(багофенантролинсульфоакислота) ₃ ⁻ и 15 других [261]; 2,2'-дигидрокси-2,2'-диметил- и 2,2'-диамино-1,1'-бинафтил [262, 263]; <i>транс</i> -2,3-дифенил-5,6,7,8,9,10-гексагидрохинолин, бензонин, гидробензонин, 1,2-дифенилэтанол [263]
SP-Сефадекс+Δ-[Ni(phen) ₃] ²⁺	Co(асас) ₃ [264]
L-(+)-Тарtrat, привитый к сефадексу	[Co(en) ₃] ³⁺ [265]
D-(-)-Тарtrat, привитый к сефадексу в сочетании с L-(+)-тарtratсодержащим хиральным элюентом	[Co(en) ₃] ³⁺ [216]; [Co(tn) ₃] ³⁺ [266]
L-Гидроксикислоты, привитые к сефадексу, сефадекс-O-CH(R)-COOH, где R=CH ₃ , CH(CH ₃) ₂ , CH(OH)CH ₃ или CH ₂ COOH	[Co(en) ₃] ³⁺ , [Co(en) ₂ (gly)] ²⁺ , [Co(en) ₂ (ox)] ⁺ , <i>cis</i> -Co(en) ₂ (NO ₂) ₂ ⁺ [267]
λ-[Co(en) ₃] ³⁺ , привитый к силикагелю	[Co(ox) ₃] ³⁻ , [Cr(ox) ₃] ³⁻ , винная кислота [268]
Анионообменник QAE-сефадекс+[Sb ₂ (<i>d</i> -tart) ₂] ²⁻	Co(β-ala) ₃ [269]
Анионообменник TSK 2000+[Sb ₂ (<i>d</i> -tart) ₂] ²⁺ или <i>d</i> -tart	<i>fac</i> -Co(β-ala) ₃ (gly) _{3-n} , <i>fac</i> -Co(β-ala) ₃ (D- или L-ala) _{3-n} [270]
Chiralpack-OT, поли(трифенилметилметакрилат) на силикагеле	Co(асас) ₃ , Cr(асас) ₃ [271]; Al(асас) ₃ [272]

генных групп и, следовательно, удерживают многозарядные комплексные ионы не так долго, как обычные полистирольные ионообменники. Хиральная матрица геля сефадекса играет минимальную роль в процессе хирального распознавания октаэдрических комплексов. Распознавание энантиомеров основано главным образом на различии в связывании (+)-тарترات-ионов во внешней координационной сфере λ - и Δ -комплексов. Найденные константы ассоциации (+)-тартрата с λ -(+)-[Co(en)₃]³⁺ были на 20% выше (25°C, I=0,1), чем у (+)-тартрата с Δ -(-)-[Co(en)₃]³⁺ [274]. Отсюда легко понять, что при наличии в элюенте (+)-тарترات-ионов λ -комплексы с отрицательно заряженного катионообменника будут элюироваться первыми. Напротив, λ -комплексы удерживаются сильнее, когда (+)-тарترات-ионы химически привиты (через сложноэфирную или эфирную группу) к матрице сефадекса [216, 266]. Особенно эффективны системы, объединяющие энантиоселективные вклады (-)-тартратных групп в неподвижной фазе и (+)-тартрат-ионов в хиральном элюенте [216, 265].

В ряде статей Ионеда и сотр. [275—279] исследовали механизм энантиоселективной ассоциации между тартрат-анионами и катионами трис(этилендиамино)кобальта. Причина разделения энантиомеров становится ясной из рассмотрения структур «face to face» ионной пары. Как показано на рис. 5.22, четыре атома углерода *d*-тартрата образуют плоскость, перпендикулярную оси третьего порядка комплекса. Три кислородных атома (один карбонильной группы, два других гидроксильных групп) направлены к комплексу и встречаются треугольную грань, образованную тремя NH₂-группами комплекса. Можно предположить, что три водородные связи присутствуют в плотной ионной паре с λ -комплексом, в то время как *d*-тартрат не может образовывать такую же стабильную ионную пару с энантиомером Δ -(-)-[Co(en)₃]³⁺. Если сказанное верно, то *d*-тартрат должен расщеплять не только все комплексы [M(en)₃]³⁺, где M(III) — кобальт, хром или родий, но также и любой комплекс, имеющий три NH₂-группы на треугольной грани октаэдрической координационной сферы. Действительно, полное расщепление в элюенте содержащем *d*-тартрат, отмечено для ряда комплексов (табл. 5.17) [Co(en)₂(AA)]²⁺ и *fac*-[Co(AA)₃]⁰, где AA — аминокислотный анион, например глицин, серин или β -аланин.

Стабильные двухзарядные анионы антимонил-*d*-тартрата [Sb₂(*d*-tart)₂]²⁻ еще лучше расщепляют октаэдрические комплексы, чем *d*-тартрат [279]. С помощью этого агента можно расщепить на энантиомеры более широкий круг комплексов, чем с помощью *d*-тартрата, т. е. ассоциация [Sb₂(*d*-tart)₂]²⁻ происходит в иной форме, чем у *d*-тартрата, и наличие трех соседних NH₂-групп в комплексе уже не обязательно для его успешного

расщепления. Ионеда и сотр. [275—279] показали, что [Sb₂(*d*-tart)₂]²⁻ предпочтительно соединяется с трис-хелатами в направлении, отличном от направления оси третьего порядка. Как видно на рис. 5.23 λ - и Δ -конфигурации комплекса характеризуются специфическим способом координации трех своих ли-

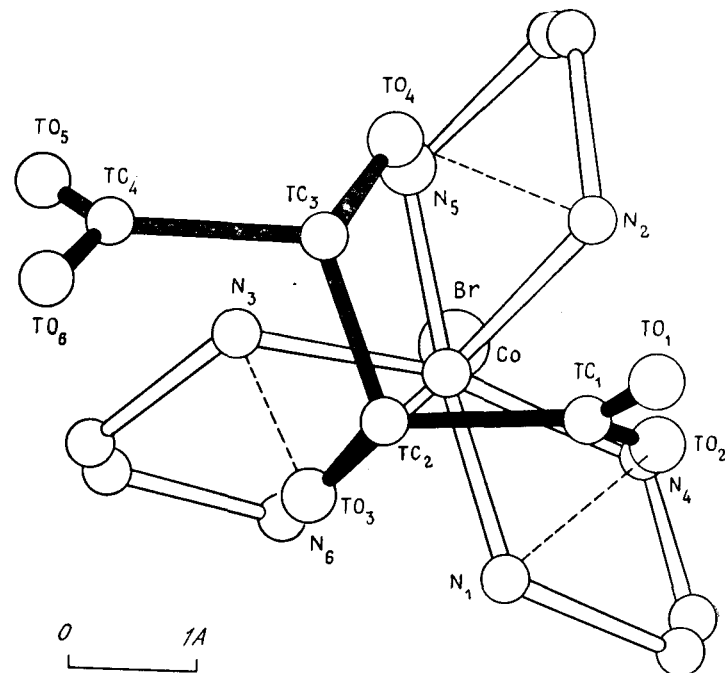


Рис. 5.22. Структура ионных пар между λ -[Co(en)₃]³⁺ и [*d*-tart]²⁻, представленных вдоль оси третьего порядка комплексного катиона [275].

гандов и в то же время формой полости между тремя хелатными кольцами. В Δ -конфигурации все полости между тремя хелатными кольцами имеют L-форму, в то время как λ -комплексы обладают шестью полостями J-формы. Хиральный расщепляющий противоион [Sb₂(*d*-tart)₂]²⁻ хорошо соответствует каналам L-формы и не соответствует каналам J-формы. Как показано на рис. 5.24, *d*-тартрат-ионы, связывающие два атома сурьмы расщепляющего агента, и являются теми элементами, которые вписываются только в каналы L-формы.

Описанная выше модель энантиоселективного образования ионной пары объясняет зависимость расщепления от числа каналов L и J-формы в комплексах с полидентатными лигандами

Таблица 5.17. Расщепление стабильных комплексов на энантимеры с помощью хиральных элюентов (см. также обзорную статью Йошикавы и Ямасаки [273])

(Обозначения см. в табл. 5.15)

Сорбент	Элюент	Рацемат	Литература
Дауэкс 50X8	<i>d</i> -antart	Co(gly) ₂ (NH ₃) ₂ ⁺	[280]
SP-Сефадек	<i>d</i> -tart, <i>d</i> -antart	[Co(dien) ₂] ³⁺ , [Co(medien) ₂] ³⁺ , [Co(dien)(medien)] ³⁺	[281]
SP-Сефадек	<i>d</i> -tart	[Co(en) ₃] ³⁺ , [Co(en) ₂ (NH ₃) ₂] ³⁺	[282]
Дауэкс 50WX2	<i>d</i> -antart	Co(en) ₂ (X) ₂ (X) ₂ =gly, β-ala, асac, ox, mal, (CN) ₂ , (N ₃) ₂ , (NO ₂) ₂ , (NCS) ₂	[283]
SP-Сефадек	<i>d</i> -tart	[Co(en) ₂ (AA)] ⁺ AA=L- или D-phe, L- или D-leu	[284]
CM-Сефадек	<i>d</i> -tart	<i>fac</i> -Co(β-ala) ₃	[285]
TSK 211	<i>d</i> -tart	<i>fac</i> -Co(gly) ₂ (β-ala), Co(gly)(β-ala) ₂ , <i>fac</i> -Co(D- или L-ser) _n (β-ala) _{3-n}	[277]
SP-Сефадек	<i>d</i> -antart	[Co(en) ₃] ³⁺ , <i>цис</i> -α- и <i>цис</i> -β- Co(trien)(en) ³⁺ , <i>и</i> - <i>fac</i> , <i>s</i> - <i>fac</i> , [<i>mer</i> -Co(dien) ₂] ³⁺	[278, 279]
SP-Сефадек	<i>d</i> -antart	[<i>цис</i> -Co(en) ₂ (N ₃) ₂] ⁺ , [<i>цис</i> -α-Co(trien)(N ₃) ₂] ⁺	[286]
SP-Сефадек	<i>d</i> -antart	[<i>цис</i> , <i>цис</i> , <i>цис</i> -Co(gly) ₂ (NH ₃) ₂] ⁺ , <i>цис</i> (O), <i>транс</i> (N), <i>цис</i> (NH ₃)-Co(gly) ₂ (NH ₃) ₂ ⁺ , <i>цис</i> (O)-Co(gly) ₂ (en) ⁺	[287]
SP-Сефадек	<i>d</i> -antart	<i>мер</i> - <i>транс</i> -(S)-, <i>транс</i> (S)-, <i>транс</i> (N)-, Co(actp) ₂ ⁺	[288]
Дауэкс 50WX8	<i>d</i> -antart	<i>мер</i> (N)-Co(mal)(en)(py)(H ₂ O)- <i>мер</i> (N)- <i>цис</i> -(NH ₃)- Co(mal)(NH ₃) ₂ (py)(H ₂ O) ⁺	[289]
IEX-220	Co(en) ₃ ³⁺ Co(sep) ³⁺ [Co(l-chxn) ₃] ³⁺	Co(edta) ⁻ , Co(tdta) ⁻ , Co(ox) ₂ (en) ⁻ Co(mal) ₂ (en) ⁻	[290, 291]
RP-Силикагель (обращенно- фазовый)	Хинин Хинидин Цинхонидин	Co(edta) ⁻ , <i>цис</i> -Co(ida) ₂ ⁻ , Co(cyda) ⁻ , Co(ox) ₂ (en) ⁻ <i>цис</i> -α-Co(ox)(edda) ⁻	[292]

типа [Co(dien)₂]³⁺ или [Co(en)(trien)]³⁺ [279], а также влияние полярности комплексов типа *цис*-[Co(en)₂X₂]⁺ на их ассоциацию с [Sb₂(*d*-tart)₂]²⁻ [286] и расщепление (рис. 5.25). Недавно Ионедда и сотр. предложили механизм энантиоселективной ассоциации между октаэдрическими комплексными анионами типа [Co(edta)]⁻, [Co(ox)₂(en)]⁻, [Co(mal)₂(en)]⁻ и хиральными Δ-[Co(en)₃]³⁺ катионами [290, 291] или молекулами алкалоидов (цинхонина, цинхонидина, хинина, хинидина) [292]. Авторы указали также на перспективы взаимного хроматографического расщепления упомянутых выше соединений при использовании

внешнесферного лигандного обмена в обращенно-фазовом [292] и ионообменном [290, 291] вариантах. Механизм хирального распознавания октаэдрических комплексов через связывание различных хиральных расщепляющих агентов во внешней координационной сфере комплекса детально обсуждается в обширном обзоре Ионедды [293].

Основываясь на теоретическом анализе двух равновесий, ионного обмена и ионной ассоциации, Ямасаки и Ионедда вывели

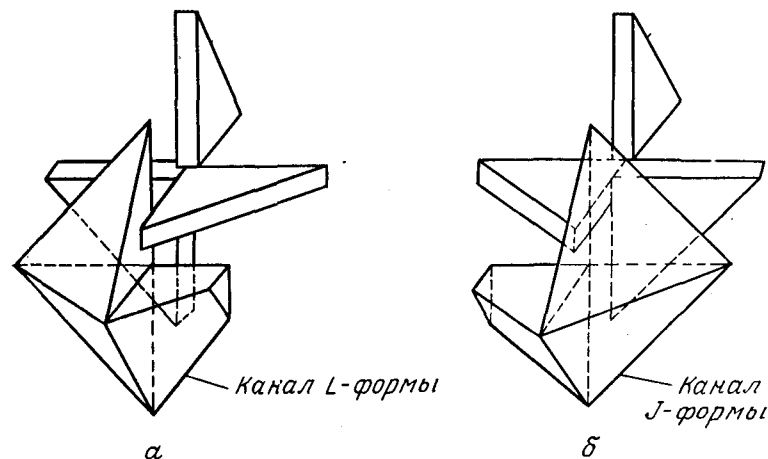


Рис. 5.23. Предполагаемая модель ассоциации иона [Sb₂(*d*-tart)₂]²⁻ с комплексом Δ-трис(хелат)кобальта(III) с каналами L-формы между хелатными кольцами (а) и комплексом λ-[Co(en)₃]³⁺ с каналами J-формы (б) [279].

общие уравнения для удерживания и расщепления энантимерных комплексных катионов на катионообменных [294] и анионообменных [295] колонках, через которые прокачивали хиральный элюент, содержащий двухзарядные анионы, например (*d*-тарtrat)²⁻ или [Sb₂(*d*-tart)₂]²⁻. Поскольку с увеличением концентрации хирального элюента удерживание катионов на катионообменниках всегда снижается, а селективность расщепления возрастает (до некоторой предельной величины), оптимальная концентрация элюента, при которой максимум расщепления достигается за короткий промежуток времени, зависит от констант ассоциации двух диастереомерных ионных пар β_λ и β_Δ и энантиоселективности системы α=β_λ/β_Δ. На анионообменных колонках удерживание комплексных катионов проходит через максимум при концентрации элюента [X]=1/β, а энантиоселективность

системы постепенно падает от $\alpha = \beta_{\Delta} / \beta_{\Lambda}$ при $[X] \rightarrow 0$ до единицы при $[X] \rightarrow \infty$.

Следует отметить большой объем важной информации, собранной в области лигандного обмена во внешней координационной сфере хиральных комплексов с момента первого расщеп-

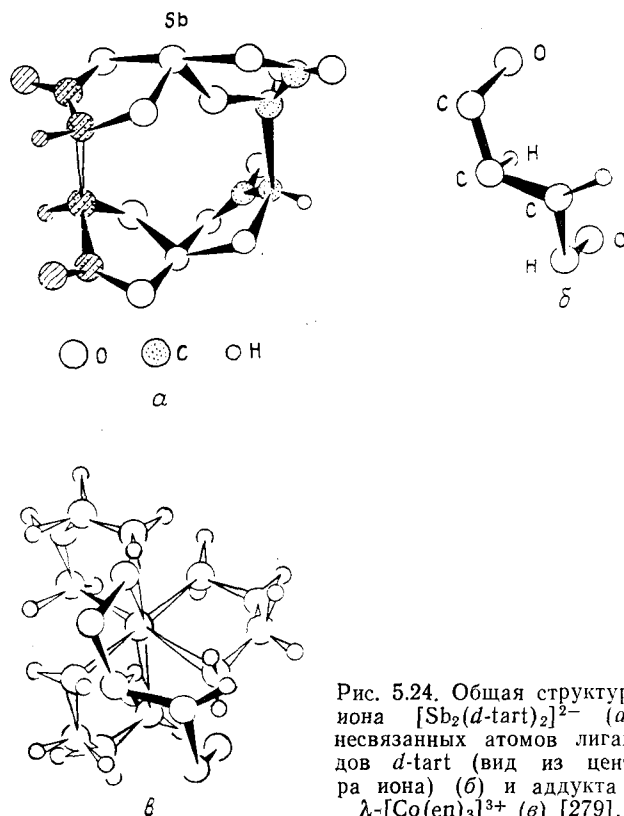


Рис. 5.24. Общая структура иона $[Sb_2(d-tart)_2]^{2-}$ (а), несвязанных атомов лигандов *d-tart* (вид из центра иона) (б) и аддукта с $\lambda-[Co(en)_3]^{3+}$ (в) [279].

ления стабильных рацемических комплексов на крахмале и целлюлозе, отнесенного впоследствии к лигандному обмену [6, 8]. До сих пор, однако, повышению эффективности колонок в этом методе не уделялось должного внимания, хотя лигандный обмен во внешней координационной сфере стабильных комплексов следует отнести к быстрым процессам [296], пригодным для создания высокоэффективных хроматографических систем. В ближайшем будущем можно ожидать существенный прогресс в развитии обращенно-фазовых ВЭЖХ-систем, сходных с системами, содержащими стабильные комплексы и алкалоиды [292]. Дей-

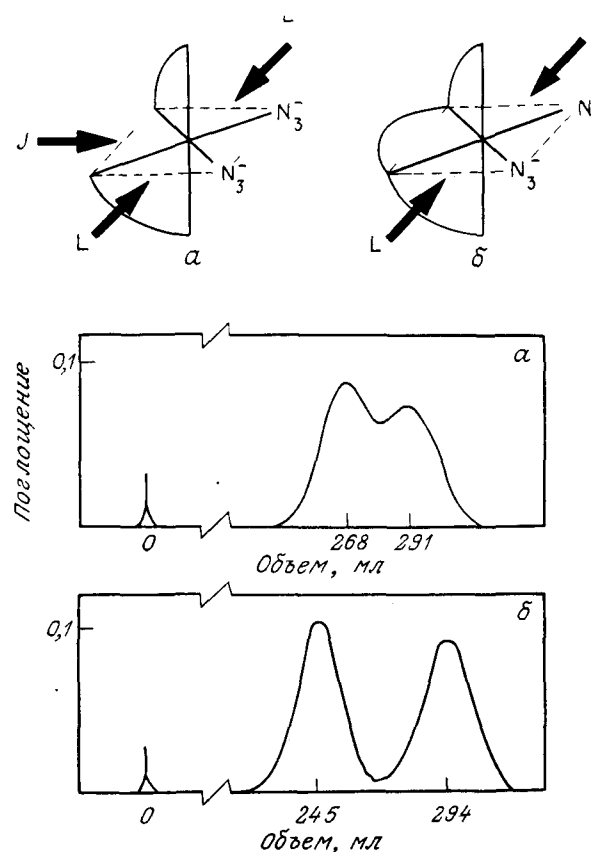


Рис. 5.25. Предпочтительные направления подхода $[Sb_2(d-tart)_2]^{2-}$ к *cis*- $[Co(N_3)_2(en)_2]^+$ (а) и *cis*- α - $[Co(N_3)_2(trien)]^+$ (б), а также типичные хроматограммы этих комплексов на насадке SP-сефадекс С-25 в 0,075 М водном растворе $K_2Sb_2(d-tart)_2$ (колонок из стекла длиной 98 см с внутренним диаметром 1,1 см, расход элюента 0,5–0,7 мл/мин) [286]

ствительно, в обзоре [293] уже упоминалось о полном расщеплении трис-комплексов кобальта с этилендиамином и 1,3-пропандиамином, а также других комплексных катионов на обращенно-фазовой насадке с хиральным элюентом, содержащим антимионил-*d*-тарترات.

Наконец, следует отметить, что колоночная жидкостная хроматография не является единственным возможным методом применения энантиоселективности при образовании комплексов для практического разделения оптических изомеров. В 1970 г. Ионеда и сотрудники расщепили рацемический комплекс трис(этилендиамино)кобальта методом тонкослойной хроматографии

[297], а также электрофорезом на бумаге [298] с элюентом, содержащим *d*-тарترات и ионы алюминия. Были также расщеплены сходные комплексы хрома(III) и родия(III) [299, 300]. Можно предположить, что ионы Al^{3+} ассоциируют с *d*-тартратом, образуя комплексный хиральный расщепляющий агент, более эффективный в распознавании конфигурации катионов $[M(en)_3]^{3+}$, чем сами анионы [*d*-тартрата] $^{2-}$. Октаэдрические комплексные анионы $[Co(ox)_3]^{3-}$ и $[Cr(ox)_3]^{3-}$ проявляют существенный энантиоселективный эффект при связывании катионов алкалоидов (бурцина, цинхонина, хинина) в своей внешней координационной сфере, что позволяет проводить энантиомерное разделение комплексов электрофорезом на бумаге в концентрированных растворах алкалоидов [301]. Энантиоселективная ассоциация ионов, по-видимому, ответственна за электрофоретическое расщепление катионных комплексов кобальта(III) с диамином в присутствии *d*-тартратного комплекса сурьмы или мышьяка в буферном растворе [302, 303].

5.7. Разделение энантиомеров методом газовой хроматографии

Хотя основной принцип ЛОХ, т. е. удерживание веществ в форме разнолигандных сорбционных комплексов, справедлив как для жидкостной хроматографии во всех ее вариантах, так и для газовой хроматографии, в последнем методе нельзя использовать те же координационные системы. В жидкостной хроматографии молекулы растворителя или специально добавленных компонентов подвижной фазы активно конкурируют с разделяемыми веществами за свободные места в координационной сфере иона комплексообразующего металла. Там действительно происходит лигандный обмен в перемещающейся хроматографической зоне каждого из разделяемых компонентов. В отличие от этого азот, гелий или другие инертные газы, используемые в газовой хроматографии в качестве газа-носителя, не способны вытеснить лиганды из их сорбционных комплексов. Поэтому, в газохроматографических системах можно использовать только исключительно лабильные комплексы, легко диссоциирующие при умеренных температурах. Здесь центральный ион металла сначала увеличивает, а затем уменьшает свое координационное число, причем при связывании или отщеплении подвижных лигандов происходят некоторые стерические перегруппировки его координационной сферы. В таких реакциях особенно полезны стерически перегруженные комплексы родия(I) и марганца(II). Другой возможностью может быть связывание подвижных лигандов во внешней координационной сфере стабильных комплексов.

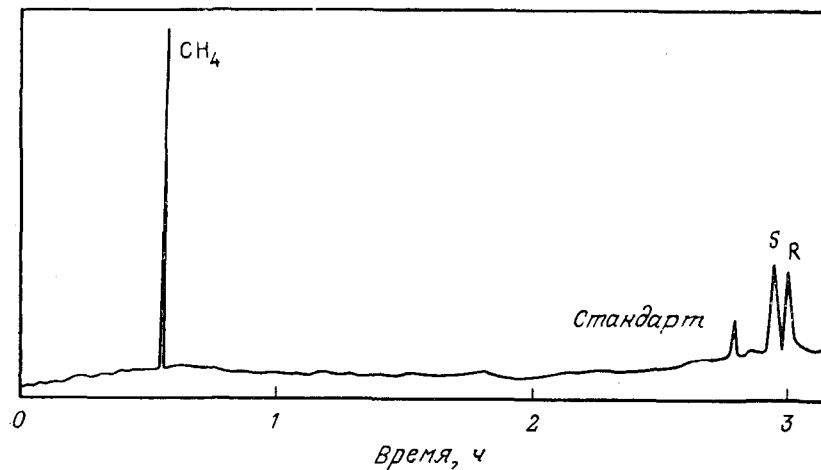
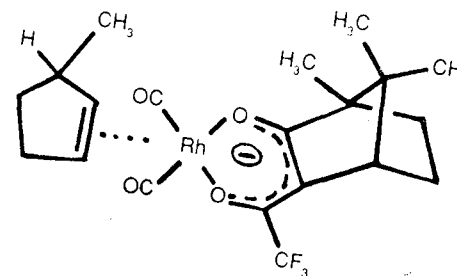


Рис. 5.26. Хроматограмма продуктов расщепления *R,S*-3-метилциклопентена на неподвижной фазе дикарбонил-Rh(I)-трифторацетил-1*R*-камфорат в сквалане (0,15 М). Колонка размером 200 м×0,5 мм, температура 22 °С, $\alpha = 1,025$ [304].

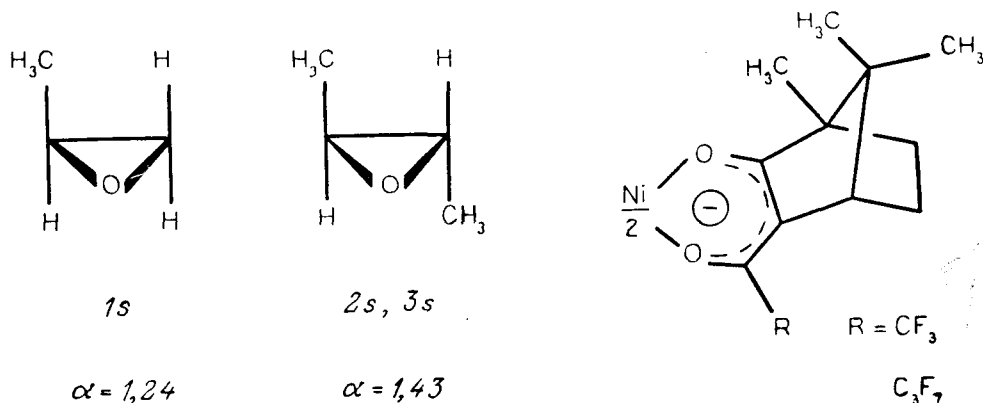
В 1977 г. Шуриг и Гиль-Ав [304—306] впервые разделили энантиомеры 3-метилциклопентена на капиллярных газохроматографических колонках с хиральными комплексами родия(I), растворенными в сквалане (рис. 5.26). Разрешение приписывали образованию лабильных разнолигандных комплексов, содержащих хиральный расщепляющий агент — дикарбонилродий(I)-трифторацетил-1*R*-камфорат, и олефин, связанный π -связью;



В этих же условиях эксперимента 3-этилциклопентен был также разделен на энантиомеры [305, 307], но 3-метил-1-пентен, 1,4- и 1,5-диметилциклопентен, 3- и 4-метилциклогексен расщепить не удалось [307].

Асимметрические эпокисы, прежде всего 1,2-эпоксипропан и *транс*-2,3-эпоксибутан, легко разделялись с помощью трис-

комплекса европия(III) с 3-трифторацетил-1R-камфоратом [308] и бис-комплекса никеля(II) с 3-перфторацетил-1R-камфоратом [307, 309]:



Представленные выше S-энантиомеры оксиранов удерживаются на хиральных комплексах никеля дольше, чем соответствующие R-энантиомеры. Это эмпирическое стереохимическое правило квадрантов справедливо и для гетероциклических аналогов с атомами S, NH вместо кислорода [310] (позднее было установлено, что существует исключение из правила квадрантов для транс-2,3-диметилтирирана).

Указанный метод анализа энантиомерного состава оксиранов и определения их абсолютной конфигурации позволил проследить катализируемое ферментами аэробное эпексидирование прохиральных олефинов в хиральные оксираны микросомами печени крысы и последующее гидрирование оксиранов в 1,2-диолы. Тестирование проводили по нанограммовой шкале путем анализа равновесной паровой фазы над инкубационными смесями без остановки реакции [311]. Наибольшая энантиоселективность была обнаружена при эпексидировании олефинов с концевыми двойными связями и с минимальной степенью замещения двойной связи, причем преимущественно образовывались S-энантиомеры. Однако эти же S-изомеры энантиоселективно гидролизировались до диолов эпексигидролазой с более высокой скоростью, чем R-изомеры.

Трициклический ацеталь линеатин, 3,3,7-триметил-2,9-диокса-трицикло[3.3.2.0]нонан, содержит четыре мостиковых асимметрических углеродных атома, взаимосвязанных в трициклической структуре (а). Это соединение удалось разделить на энантиомерные и диастереомерные пары, используя бис-комплекс меди(II) с (3-гептафторбутирил-1R-камфоратом) [312, 313].

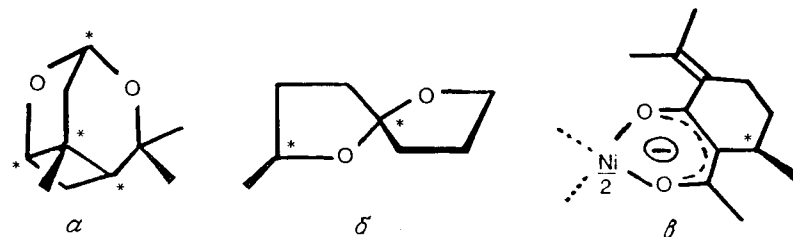
Таблица 5.18. Селективность α расщепления энантиомеров рацемических циклических эфиров на четырех различных 3-перфторацетил-1R-камфорат-бис-хелатах марганца(II), никеля(II) и кобальта(II) в сквалане при 60 °С [316, 320]

Соединение	Mn ²⁺ ПФБ	Mn ²⁺ ТФА	Mn ²⁺ ГФБ	Mn ²⁺ ПФО	Ni ²⁺ ГФБ	Co ²⁺ ГФБ
Метилоксиран	нр	1,02	1,08	1,06	1,19	1,18
Этилоксиран	1,03	1,04	1,15	1,11	1,08	1,17
Изопропилоксиран	1,03	1,04	1,17	1,17	нр	1,13
втор-Бутилоксиран (<i>эритро</i>)	1,02	—	1,07	—	—	—
втор-Бутилоксиран (<i>трео</i>)	1,02	—	1,19	—	—	—
трет-Бутилоксиран	1,05	1,04	1,15	1,16	1,11	1,11
2-Этил-2-метилоксиран	нр	нр	1,02	1,01	1,05	нр
Транс-2,3-Диметилоксиран	1,05	1,06	1,30	1,25	1,32	1,24
цис-2-Этил-3-метилоксиран	1,02	1,03	1,04	1,02	—	—
Триметилоксиран	1,02	1,03	1,20	1,17	1,30	1,12
2-Метилжсетан	1,13	1,02	1,11	1,11	^a	1,11
2-Метилтетрагидрофуран	1,09	1,01	1,04	1,03	1,06	1,01
3-Метилтетрагидрофуран	1,06	1,01	1,02	нр	—	—
транс-2,5-Диметилтетрагидрофуран	1,01	нр	1,02	нр	1,18	нр
2-Метилтетрагидропиран	1,02	нр	нр	нр	1,05	нр
2-Этилтетрагидропиран	1,01	нр	нр	нр	—	—
2-Изопропилтетрагидропиран	нр	нр	нр	нр	—	—

^a Очень большое время удерживания.

Обозначения: ПФБ — пентафторбензоил, ТФА — трифторацетил, ГФБ — гептафторбутирил, ПФО — перфтороктанонил, нр — не расщеплены.

Аналогичным образом хиральный спирокеталь (б), 2-этил-1,6-диоксаспиро[4,4]нонан, представляющий собой избирательный феромон лесного вредителя *Pityogenes chalcographus*, количественно разделяли на четыре индивидуальных пика на капиллярной колонке [314, 315], покрытой бис(6-гептафторбутирил-R-пулегонатом) никеля(II) (в). Преимущества этой оптически активной неподвижной фазы состоят в том, что она позволяет проводить существенную дифференциацию энантиомеров при незначительном времени их удерживания.



Тем не менее к предпочтительным расщепляющим агентам, по-видимому, следует отнести [316] бис(3-перфторацил-1R-камфорат) марганца(II). При расщеплении циклических эфиров этот агент дает в пятьдесят раз более слабое удерживание и, следовательно, более короткое время анализа по сравнению с соответствующими комплексами никеля, но одновременно позволяет получить энантиоселективность такого же порядка (табл. 5.18).

Многие кислородсодержащие гетероциклические соединения

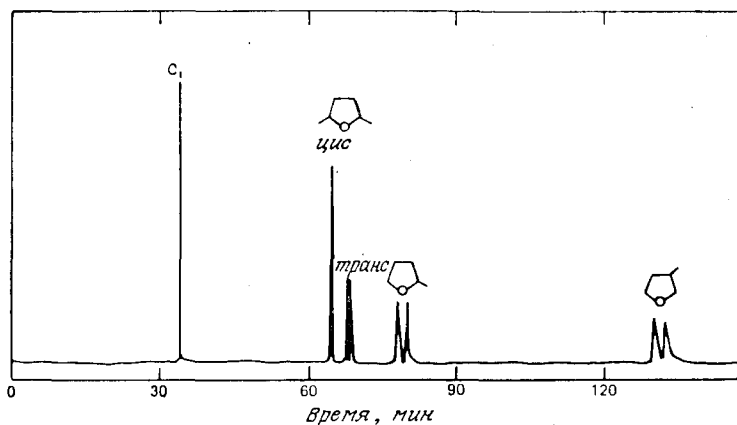
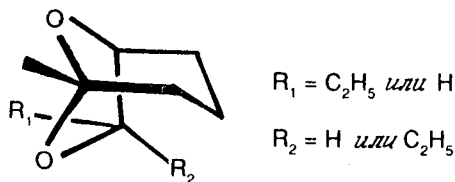


Рис. 5.27. Хроматограмма продуктов разделения диастереомерных и энантиомерных алкилзамещенных тетрагидрофуранов. Неподвижная фаза: 0,05 М марганец(II)-бис(3-гептафторбутирил-1R-камфорат) в сквалане. Колонка из нержавеющей стали размером 160 м×0,4 мм, температура 60 °С [316].

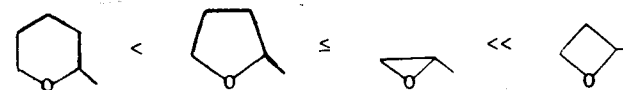
от трех- до шестичленных (оксиран, оксетан, тетрагидрофуран, тетрагидропиран) можно расщепить на энантиомерные пары, используя этот хиральный комплекс. Типичная хроматограмма представлена на рис. 5.27. Следует упомянуть количественное определение четырех компонентов в смеси *экзо*- и *эндо*-бrevикомина [317], которые продуцируются в различных пропорциях мужскими и женскими особями нескольких видов сосновых жуков:



Воздействие рацемического бревикомина на насекомых может быть самым различным от отпугивающего до привлекающего

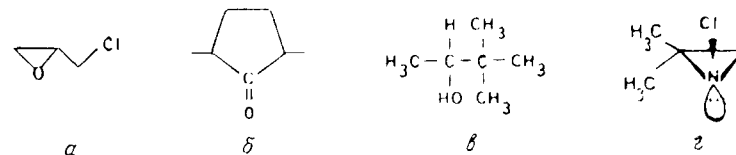
в зависимости от количества феромона и вида насекомых. Это наблюдение подчеркивает, что родственные насекомые часто достигают вида со специфической химической коммуникацией путем дифференциальной выработки энантиомеров и(или) избирательной реакции на них. Энантиомерный анализ в таких случаях особенно важен, как, впрочем, и в стереоспецифическом синтезе [318, 319].

Заслуживает внимания непонятое еще до конца исключительно сильное координационное взаимодействие четырехчленных оксетанов с хелатами металлов, так что общая способность к координации метилзамещенных циклических эфиров возрастает в следующем порядке:



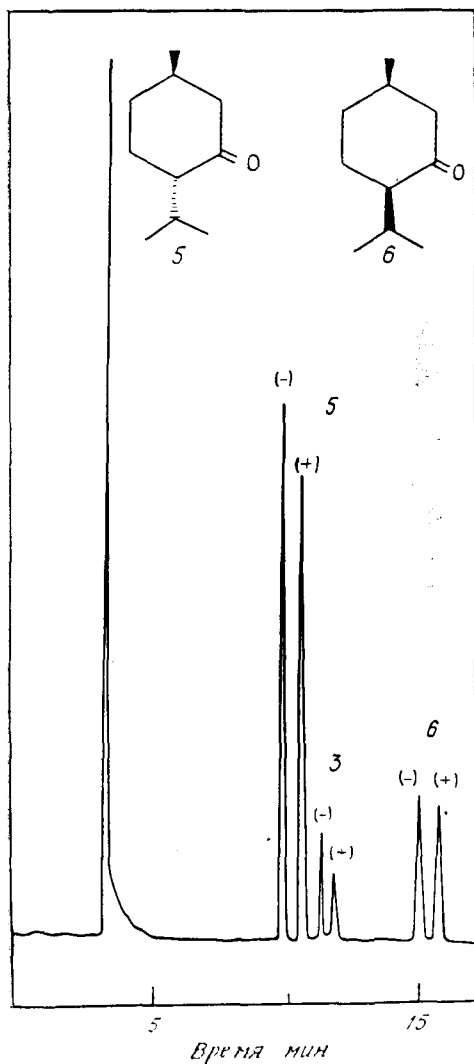
Для отдельного простого циклического эфира удерживание резко возрастает в ряду марганец(II) < кобальт(II) << никель(II). Таким образом, сильно координирующие хелаты никеля можно рекомендовать для разделения энантиомеров слабо донорных рацемических веществ — производных тетрагидрофурана и тетрагидропропирана. Увеличение алкильного заместителя у гетероциклических углеродных атомов ведет к ослаблению взаимодействия с хелатами металлов, но эффективность хирального распознавания при этом неожиданно улучшается. Увеличение же разветвленности алкильной группы необязательно приводит к улучшению разрешения энантиомеров [320].

Разделение энантиомеров с помощью лигандообменной газовой хроматографии не ограничено простыми циклическими эфирами. Этот метод с успехом применяли для расщепления хлорированных оксистеров (эпихлоргидрина *a*), немодифицированных циклических кетонов (*транс*-2,5-диметилциклопентанона, *b*), немодифицированных алифатических спиртов (*трет*-бутилметилкарбинола, *в*), смеси ментона, изоментона и ментола (рис. 5.28), а также азиридинов (1-хлор-2,2-диметилазиридина, *г*).



Впервые эти соединения количественно разделили на бис-комплексе никеля(II) с (3-гептафторбутирил-1R-камфоратом)

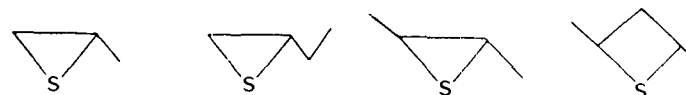
[320]. Последний рацемат, 1-хлор-2,2-диметилазиридин, особенно интересен в том отношении, что атом азота является единственным хиральным центром в его молекуле, который благодаря специфической структуре напряженного кольца достаточно устойчив по отношению к инверсии [320, 321]. Тем не менее, как можно вывести из рис. 5.29, частичная инверсия конфигурации хирального азота происходит в ходе хроматографирования



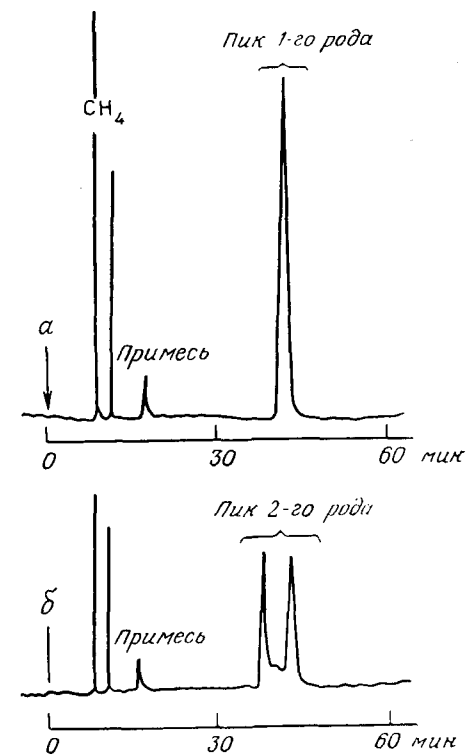
при использовании 3-трифторацетил-1R-камфората в качестве хирального лиганда в расщепляющем комплексе никеля. Очевидно, этот комплекс катализирует рацемизацию 1-хлор-2,2-диметилазиридина в условиях эксперимента. Процесс инверсии проявляется в том, что кривая хроматографического элюирования между конечными пиками энантимеров не достигает нулевой линии, а образует плато, соответствующее молекулам, которые изменили свою конфигурацию в ходе разделения и перемещались после этого со скоростью антиподов (рис. 5.29, б). Очевидно, что высота плато

должна зависеть от скорости инверсии, а кинетические параметры процесса можно оценить по форме пика [322]. Этот тип динамического слияния пиков «второго» рода не имеет ничего общего с обычным слиянием пиков «первого» рода (рис. 5.29, а), которое наблюдают при замещении оптически активной неподвижной фазы на рацемическую. В этом случае две энантимерные фракции коалесцируют, давая один острый пик, расположенный посередине между двумя пиками энантимеров (на рисунке не показано). Следует отметить, что хроматографический тест на рацемической неподвижной фазе выступает в роли проверочного метода, позволяющего отличить действительно энантимерное разделение от разделения двух диастереомеров, случайно присутствующих в соотношении 1:1.

С помощью комплексобразования в ходе газовой хроматографии на оптически активном бис(3-гептафторбутирил-1R-камфорато) никеле(II) были количественно расщеплены следующие рацемические тираны и тизаны:



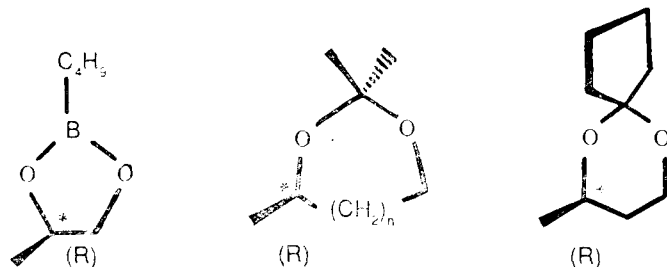
в результате чего были установлены абсолютные конфигурации отдельных энантимеров [320]. Интересно, что порядок элюиро-



С помощью комплексобразования в ходе газовой хроматографии на оптически активном бис(3-гептафторбутирил-1R-камфорато) никеле(II) были количественно расщеплены следующие рацемические тираны и тизаны:

вания энантимеров *транс*-2,3-диметилтирана оказался противоположным порядку элюирования энантимеров *транс*-2,3-диметилоксирана. Помимо этого алкилированные тираны труднее расщепить на энантимеры, чем соответствующие эпоксиды.

Впоследствии [323] была предпринята попытка разделить изомеры моноалкилзамещенных 1,2-диолов в форме *n*-бутилборонатов и 1,2-, 2,3-, 1,3-, 1,4-диолов в форме ацеталей, ацетонидов или кеталей, например:

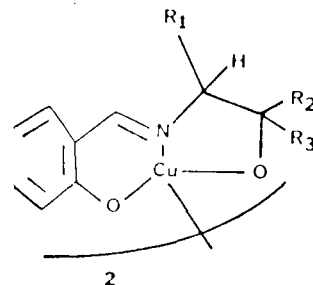


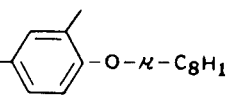
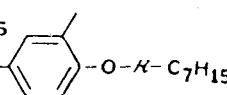
Существует устойчивая зависимость между абсолютной конфигурацией диолов и порядком элюирования. Так, например, элюируемый первым энантиомер 1,2-диол-*n*-бороната имеет *S*-конфигурацию на хиральном комплексе никеля(II), получаемом из 1*R*-камфоры.

Достигнут существенный прогресс в разделении свободных энантимеров хиральных спиртов и кетонов, являющихся сильно полярными веществами, в результате разработки специальных методов покрытия капиллярных колонок из обычного и кварцевого стекла хиральными хелатами металлов. Упомянутые выше полярные вещества сильно взаимодействуют с поверхностью капиллярных колонок из никеля или нержавеющей стали, что увеличивает удерживание и ухудшает эффективность колонки. С другой стороны, поверхностные силанольные группы стеклянных колонок могут блокировать координационные сферы хиральных хелатов металлов. Поэтому подготовка открытых капиллярных колонок [324, 325] из обычного или кварцевого стекла включает травление кислотой, гидротермальную обработку и дезактивацию силанольных групп путем термической полимеризации пленки динамически нанесенного карбовакса 20М. Последняя стадия делает поверхность колонки полностью инертной и пригодной для равномерного нанесения раствора подходящего расщепляющего хелата металла в силиконовой жидкости OV-101 с эффективностью покрытия более 80%.

Применение капиллярных колонок из обычного или кварцевого стекла, покрытых бис-комплексами марганца(II) или никеля(II) с 3-гептафторбутирил-1*R*-камфоратом в силиконовой жидкости OV-101, позволило Шуригу и сотр. [325—327] определить энантимерный состав и абсолютную конфигурацию терпинен-4-ола, агрегационного феромона *Polygraphus poligraphus* и непосредственно разделить структурные, конфигурационные и оптические изомеры ряда вторичных метилпентанолов и метилгексанолов, а также соответствующих хиральных алифатических кетонов.

Ои и сотр. [328—331] разработали ряд новых хиральных расщепляющих комплексов для лигандообменной газовой хроматографии различных гидроксисоединений. Среди них двухъядерные комплексы меди(II) с *N*-салицилиден-*R*-2-амино-1,1-бис(5-*трет*-бутил-2-октилоксифенил)пропан-1-олом (А), *N*-салицилиден-*S*-2-амино-1,1-бис(5-*трет*-бутил-2-гептилоксифенил)-3-фенилпропан-1-олом (В) и *N*-салицилиден-*S*-2-амино-1,1-дифенилпропан-1-олом (С).



- А) $R_1 = \text{CH}_3$
 $R_2 = \text{трет-}C_4H_9$  $-O-n-C_8H_{17}$
- В) $R_1 = \text{CH}_2-C_6H_5$
 $R_2 = \text{трет-}C_4H_9$  $-O-n-C_7H_{15}$
- С) $R_1 = \text{CH}_3$
 $R_2 = C_6H_5$

На стеклянных капиллярных колонках (40 м×0,25 мм), покрытых смесью (1:1) силиконовой жидкости OV-101 и описанных выше хиральных медных комплексов, при 60—120 °С удалось расщепить рацематы некоторых эфиров α -гидроксипропионовой и α -гидроксимасляной кислот [328, 329], спиртов, аминов, аминокислот и аминокислотных эфиров [330, 331]. Хотя в настоящее время на начальной стадии разработки этого метода наблюдается еще довольно сильное размывание пиков, величины энантиоселективности α были сравнительно высокими (табл. 5.19), что позволяет проводить необходимые разделения на насадочных колонках [308, 328, 330] и открывает возможности препаративного применения лигандообменной газовой хроматографии.

Таблица 5.19. Газохроматографическое расщепление рацематов на хелатах меди (II) с хиральными основаниями Шиффа, А, В и С в силиконовом масле OV-101 [328, 330]

Соединение	Непод- вижная фаза	Темпера- тура, °С	Время удерживания, мин		α
Эфиры молочной кислоты $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOR}$					
R=CH ₃	A	70	3,6	4,2	1,17
C ₂ H ₅	A	70	6,3	7,1	1,13
изо-C ₃ H ₇	A	70	7,3	8,5	1,16
	B	100	2,4	3,2	1,33
изо-C ₄ H ₉	A	70	21,9	24,8	1,13
	B	110	4,3	5,8	1,35
изо-C ₃ H ₇ (эфир α -гидроксипропановой кислоты)	A	70	15,7	16,8	1,07
Изопропиловый эфир α -аминокислоты Аланин	A	70	96,0	111,6	1,16
	C	80	25,9	28,5	1,10
Аминоизомасляная кислота Валин	A	70	74,6	91,6	1,23
Тетрагидрофуруриловый спирт	A ^a	60	3,58	3,84	1,07
α -Фенилпропаргиловый спирт	A ^a	80	23,06	25,59	1,11
2-Этилпиперидин	A ^a	60	37,39	43,45	1,16
	C ^a	60	60,00	78,4	1,31
1-Фенилэтиламин	A ^a	80	35,80	37,3	1,04
	C ^a	120	10,40	11,0	1,06
Диметиламинопропанол-2	A ^a	20	2,38	5,94	2,50
	C ^a	60	2,63	4,88	1,86
Дибутиламинопропанол-2	A ^a	60	42,80	46,6	1,10

^a Стеклянные капиллярные колонки размером 20 м×0,25 мм, расход гелия 1,2 мл/мин; во всех остальных случаях колонки размером 40 м×0,25 мм, расход гелия 0,6 мл/мин.

Лигандный обмен в своем газохроматическом варианте представляет собой новый подход к газохроматографическому разделению оптических изомеров, который в настоящее время нельзя заменить каким-либо другим методом [9, 332].

Литература

1. Даванков В. А., Диссертация. Синтез и исследование диссимметрических ионообменных смол. — М.: ИХЭОС АН СССР, 1966.
2. Рогожин С. В., Даванков В. А., Коршак В. В., Веса В., Бельчик Л. А., Диссимметрические ионообменные смолы на основе α -аминокислот и их производных, Изв. АН СССР, сер. хим., 1971, 502.
3. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Semechkin A. V., Sachkova T. P., Ligand exchange chromatography of racemates. I. Influence of the degree of saturation of the asymmetric resin by metal ions on ligand exchange, J. Chromatogr., 82, 359, 1973.
4. Eliel E. L., Stereochemistry of Carbon Compounds, McGraw-Hill, New York, 1962, 51.

5. Beittler U., Feibush B., Interaction between asymmetric solutes and solvents — diamides derived from L-valine as stationary phases in gas-liquid partition chromatography, J. Chromatogr., 123, 149 (1976).
6. Рогожин С. В., Даванков В. А., Хроматографическое расщепление рацематов на диссимметрических сорбентах, Усп. хим., 37, 1327, 1968.
7. Buss D. R., Vermeulen T., Optical isomer separation, Ind. Eng. Chem., 60, 12 (1968).
8. Рогожин С. В., Даванков В. А., Песлякас И. И. Последние достижения в области хроматографического расщепления рацематов. В сб. «Химия и технология высокомолекулярных соединений, А. М. Сладков (Ред.). — ВИНТИ, т. 4, 1973, с. 45.
9. Lochmüller C. H., Souter R. W., Chromatographic resolution of enantiomers (selective review), J. Chromatogr., 113, 283 (1975).
10. Krull I. S., The liquid chromatographic resolution of enantiomers, in Advances in Chromatography, Vol. 16, Giddings J. C., Grushka E., Gazes J., Brown P. R. (eds.), Marcel Dekker, New York, 1978, 175.
11. Audebert R., Direct resolution of enantiomers in column liquid chromatography, J. Liq. Chromatogr., 2, 1063 (1979).
12. Blaschke G., Chromatographische Racemattrennung, Angew. Chem., 92, 14, 1980; Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 19, 13 (1980).
13. Lindner W., Trennung von Enantiomeren mittels moderner Flüssigkeits-Chromatographie, Chimia, 35, 294 (1981).
14. Allenmark S., Recent advances in methods of direct optical resolution, J. Biochem. Biophys. Methods, 9, 1 (1984).
15. Davankov V. A., Resolution of racemates by ligand exchange chromatography, in Advances in Chromatography, Vol. 18, Giddings J. C., Grushka E., Cazes J., Brown P. R. (eds.), Marcel Dekker, New York, 1980, 139.
16. Davankov V. A., Kurganov A. A., Bochkov A. S., Resolution of racemates by high-performance liquid chromatography in Advances in Chromatography, Vol. 22, Giddings J. C., Grushka E., Cazes J., Brown P. R. (eds.), Marcel Dekker, New York, 1983, 71.
17. Davankov V. A., Review of ligand exchange chromatography, in Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Vol. 1, Hancock W. S. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla., 1984, 393.
18. Caude M. H., Jardy A. P., Rosset R. H., Separations where the ligand is bound to a normal-phase column, in Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Vol. 1, Hancock W. S., Ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1984, 411.
19. Sugden K., Separations where the ligand is bound to a reversed phase system, in Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Vol. 1, Hancock W. S., Ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1984, 423.
20. Gil-Av E., Weinstein S., Resolution of α -amino acids and dns- α -amino acids by HPLC with mobile phases containing a chiral ligand, in Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Vol. 1, Hancock W. S., Ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1984, 429.
21. Davankov V. A., Chiral chelating resins in chromatography of optical isomers, Pure Appl. Chem., 54, 2159 (1982).
22. Рогожин С. В., Даванков В. А., О свойствах галогенметилированных сополимеров стирола и дивинилбензола, Высокомоле. соед., 9А, 1286 (1967).
23. Рогожин С. В., Коршак В. В., Даванков В. А., Маслова Л. А., Галогенметилирование сополимеров стирола и дивинилбензола, Высокомоле. соед., 8, 1275 (1966).
24. Даванков В. А., Рогожин С. В., Коршак В. В., Цюрупа М. П., Реакционная способность галогенметилированных сополимеров стирола и дивинилбензола, Изв. АН СССР, сер. хим. 1967, 1612.

25. Рогожин С. В., Даванков В. А., Коршак В. В. Иодметилирование органических соединений, Изв. АН СССР, сер. хим., 1966, 1498.
26. Коршак В. В., Рогожин С. В., Даванков В. А., Обмен галогенов в хлорметилированных сополимерах на основе стирола, Изв. АН СССР, сер. хим., 1965, 1912.
27. Коршак В. В., Рогожин С. В., Даванков В. А., Синтез бром- и йодметилированных сополимеров стирола и дивинилбензола, Высокомол. соед., 8, 1686 (1966); Полимерная наука в СССР, 8, 1860 (1966).
28. Рогожин С. В., Даванков В. А., Коршак В. В., Синтез и свойства ионообменников на основе галогенметилированных сополимеров стирола и дивинилбензола с С-производными α -аминокислот, Высокомол. соед., 10А, 1283 (1968).
29. Рогожин С. В., Даванков В. А., Вирбанов С. Г., Коршак В. В., Синтез и свойства ионообменников на основе α -аминокислот и галогенметилированных сополимеров стирола и дивинилбензола. Высокомол. соед., 10А, 1277 (1968).
30. Даванков В. А., Рогожин С. В., Песлякас И. И., Синтез и свойства ионообменников на основе нейтральных и гидроксилсодержащих α -аминокислот и хлорметилированных макросетчатых изопористых сополимеров стирола, Высокомол. соед., 14В, 276 (1972).
31. Даванков В. А., Рогожин С. В., Цюрупа М. П., Способ получения макросетчатых сополимеров стирола, пат. США 3729457 (11.10.70).
32. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Tsyurupa M. P., Influence of polymeric matrix structure on performance of ion exchange resins, in Ion Exchange and Solvent Extraction, Vol. 7, Marinsky J. A., Marcus Y. (eds.), Marcel Dekker, New York, 1977, 29.
33. Davankov V. A., Tsyurupa M. P., Macronet isoporous styrene copolymers — unusual structure and properties, Angew. Makromol. Chem., 91, 127 (1980).
34. Rosenberg G. I., Shabaeva A. S., Moryakov V. S., Musin T. G., Tsyurupa M. P., Davankov V. A., Sorption properties of hypercross-linked polystyrene sorbents, React. Polym., 1, 175 (1983).
35. Даванков В. А., Рогожин С. В., Цюрупа М. П., Высокомол. соед., 15В, 463 (1973).
36. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Tsyurupa M. P., Macronet isoporous gels through cross-linking of dissolved polystyrene, J. Polym. Sci. Polym. Symp., 47, 95 (1974).
37. Tsyurupa M. P., Davankov V. A., Rogozhin S. V., Macronet isoporous ion exchange resins, J. Polym. Sci. Polym. Symp., 47, 189 (1974).
38. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Tsyurupa M. P., Über Faktoren, die das Quellvermögen von vernetzten Polymeren bestimmen. I, Angew. Makromol. Chem., 32, 145 (1973).
39. Davankov V. A., Tsyurupa M. P., Rogozhin S. V., On factors determining the swelling ability of cross-linked polymers. II, Angew. Makromol. Chem., 53, 19 (1976).
40. Даванков В. А., Лигандообменная хроматография рацематов. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук, ИНЕОС АН СССР, М., 1975.
41. Даванков В. А., Рогожин С. В., Песлякас И. И., Веса В. С., Использование трет-бутиловых эфиров α -аминокислот в синтезе диссимметрических комплексообразующих ионообменников, Высокомол. соед., 15В, 115 (1973).
42. Рогожин С. В., Ямсков И. А., Даванков В. А., Колесова Т. Ф., Воеводиц В. М., Лигандная хроматография рацематов на диссимметрических сорбентах с L-аспарагиновой и L-глутаминовой кислотами, Высокомол. соед., 17А, 564 (1975).
43. Рогожин С. В., Ямсков И. А., Даванков В. А., Разделение рацематов на

- диссимметрическом сорбенте с L- α , β -диаминоасляной кислотой, Высокомол. соед., 17В, 107 (1975).
44. Рогожин С. В., Ямсков И. А., Даванков В. А., Синтез диссимметрических сорбентов реакцией диаминокарбонных комплексов меди с поли-*n*-винилбензилдиметилсульфохлоридом, Высокомол. соед., 16В, 849 (1974).
 45. Рогожин С. В., Даванков В. А., Ямсков И. А., Синтез хелатообразующих ионообменников взаимодействием α -аминокислот с поли-*n*-винилбензилдиметилсульфохлоридом, Высокомол. соед., 15В, 216 (1973).
 46. Рогожин С. В., Даванков В. А., Ямсков И. А., Синтез и свойства диссимметрических комплексообразующих сорбентов с L-гистидином, Изв. АН СССР, сер. хим., 1971, 2325.
 47. Даванков В. А., Рогожин С. В., Ямсков И. А., Кабанов В. П., Диссимметрические комплексообразующие сорбенты с D-метионином и их использование в хроматографии рацематов, Изв. АН СССР, сер. хим., 1971, 2327.
 48. Roberts C. W., Haigh D. H., Partial amino acid resolutions on a new resolving resin, J. Org. Chem., 27, 3375 (1962).
 49. Рогожин С. В., Даванков В. А., Ямсков И. А., Кабанов В. П., Изучение реакции L-цистеиновой кислоты с хлорметилированным сополимером стирола. Хроматография рацематов на полученном сорбенте, Высокомол. соед., 14В, 472, (1972).
 50. Ямсков И. А., Березин Б. Б., Тихонов В. Е., Бельчич Л. А., Даванков В. А., Лигандообменная хроматография энантиомеров иминокислот на диссимметрических сорбентах с группами L-фенилаланина, Биоорг. хим., 4, 1170, (1978).
 51. Yamskov I. A., Berezin B. B., Davankov V. A., Ligand exchange chromatography of amino acid enantiomers on asymmetric sorbents with polydentate sulfur containing groupings, Makromol. Chem., 179, 2121 (1978).
 52. Белов Ю. П., Рогожин С. В., Даванков В. А. Диссимметрические сорбенты на основе (-)- α -аминофосфоновой кислоты, Изв. АН СССР, сер. хим., 1973, 2320.
 53. Белов Ю. П., Даванков В. А., Рогожин С. В., Сорбенты с группами оптически активных α -амино этилфосфоновых кислот для лигандообменной хроматографии рацематов, Изв. АН СССР, сер. хим., 1977, 1856.
 54. Рогожин С. В., Даванков В. А., Белов Ю. П., Оптически активный диэтиловый эфир α -аминобензилсульфоновой кислоты, Изв. АН СССР, сер. хим., 1973, 955.
 55. Белов Ю. П., Даванков В. А., Рогожин С. В., Оптически активные α -аминоэтилфосфоновые кислоты и их этиловые эфиры, Изв. АН СССР, Сер. хим., 1976, 1596.
 56. Рогожин С. В., Даванков В. А., Ямсков И. А., Кабанов В. П. ЖОХ, 42, 1614 (1972).
 57. Berezin B. B., Yamskov I. A., Davankov V. A., Ligand exchange chromatography of amino acid racemates on polystyrene sorbents containing L-methionine-*d*-sulfoxide or L-methionine-*l*-sulfoxide groups, J. Chromatogr., 261, 301, 1983.
 58. Davankov V. A., Zolotarev Yu. A., Ligand exchange chromatography of racemates. VI. Separation of optical isomers of amino acids on polystyrene resins containing L-proline or L-azetidine carboxylic acid, J. Chromatogr., 155, 295, 1978.
 59. Рогожин С. В., Ямсков И. А., Пушкин А. С., Бельчич Л. А., Жучкова Л. Я., Диссимметрические сорбенты с N-карбоксиметил-L-валином и N-карбоксиметил-L-аспарагиновой кислотой, Изв. АН СССР, сер. хим., 1976, 2378.
 60. Angelici R. J., Snyder R. V., Meck R. B., Amino acids resolved with metal complexes, Chem. Eng. News, 49(15), 34, 1971.
 61. Snyder R. V., Angelici R. J., Meck R. B., Partial resolution of amino acids

- by column chromatography on a polystyrene resin containing an optically active copper(II) complex, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 2660 (1972).
62. *Petit M. A., Josefonicz J.*, Synthesis of copper(II) complexes of asymmetric resins prepared by attachment of α amino acids to cross-linked polystyrene, *J. Appl. Polym. Sci.*, **21**, 2589 (1977).
 63. *Josefonicz J., Petit M. A., Szubarga A.*, Preparative resolution of DL-proline by liquid chromatography on a polystyrene resin containing the L-proline copper(II) complex, *J. Chromatogr.*, **147**, 177 (1978).
 64. *Spassky N., Reix M., Quette J., Quette M., Sepulchre M., Blanchard J.*, Dedoublement des acides α -amines par hydrolyse stereoselective de leurs esters catalysees par des complexes chiraux de metaux de transition immobilises sur des supports macromoleculaires, *C. R. Acad. Sci. Ser. C*, **287**, 589 (1978).
 65. *Tsuchida E., Nishikawa H., Terada E.*, The resolution of α -amino acid by chiral polymer copper complex, *Eur. Polym. J.*, **12**, 611 (1976).
 66. *Tsuchida E., Nishikawa H.*, Optical resolution of racemic mixtures, *Jpn. Kokai*, **77**, 85101; *C. A.*, **88**, 23398s (1978).
 67. *Beca B. C.*, Разделение рацемических аминокислот на диссимметрических полисульфонамидных сорбентах, *ЖОХ*, **42**, 2780 (1972).
 68. *Beca B. C., Морщичак П. К.*, Диссимметрические ионообменные смолы на основе α -аминокислот и хлорсульфированных сополимеров стирола и дивинилбензола, *Труды АН Литовской ССР*, сер. В **2**, **69**, 93 (1972).
 69. *Hatano M., Murakami T., Kitagawa S.*, Optical resolutions of DL-amino acids, *Jpn. Kokai*, **76**, 29438, 1976; *Chem. Abstr.* **85**, 143513k, 1976.
 70. *Hatano M., Murakami T., Kitagawa S.*, Tetramines stereospecifically coordinated with metal ions, *Jpn. Kokai*, **76**, 34148, 1976; *C. A.*, **85**, 108541w (1976).
 71. *Kurganov A. A., Zhuchkova L. Ya., Davankov V. A.*, Ligand exchange chromatography of racemates. X. Asymmetric sorbents based on mono- and diamines and resolution of racemates by ligand exchange chromatography, *Makromol. Chem.*, **180**, 2101 (1979).
 72. *Kurganov A. A., Zhuchkova L. Ya., Davankov V. A.*, Synthesis of isomeric N-benzyl derivatives of 1,2-propane-diamine, *Liebig's Ann. Chem.*, **1980**, 786.
 73. *Bernaer K.*, Separating Racemates Using Column Chromatography on Optically Active Metal Complexes, шведск. пат. 509239, 1971; **76**, 60602b (1972).
 74. *Lefebvre B., Audebert R., Quivoron C.*, Direct resolution of amino acid enantiomers by high pressure liquid chromatography, *Isr. J. Chem.*, **15**, 69 (1977).
 75. *Lefebvre B., Audebert R., Quivoron C.*, Use of new chiral hydrophilic gels for the direct resolution of α -amino acids by high pressure liquid chromatography, *L. Liq. Chromatogr.*, **1**, 761 (1978).
 76. *Yamskov I. A., Berezin B. B., Davankov V. A., Zolotarev Yu. A., Dostovalov I. N., Myasoedov N. F.*, Ligand exchange chromatography of racemates. XVII. Ligand exchange chromatography of amino acid racemates on «Separon» gels containing L-proline and L-hydroxyproline groupings, *J. Chromatogr.*, **217**, 539 (1981).
 77. *Watanabe N., Ohzeki H., Niki E.*, Enantiomeric resolution of amino acids by high performance ligand exchange chromatography using a chemically modified hydrophilic porous polymer gel, *J. Chromatogr.*, **216**, 406 (1981).
 78. *Песлякас И. И., Рогожин С. В., Даванков В. А.*, Об оптической стабильности диссимметрических сорбентов, содержащих остатки α -аминокислот, *ЖОХ*, **44**, 468 (1974).
 79. *Рогожин С. В., Даванков В. А.*, Хроматографический способ расщепления рацематов на оптически активные соединения, пат. ФРГ № 1932190, 08.01.70.
 80. *Рогожин С. В., Даванков В. А.*, Лигандообменная хроматография на диссимметрических комплексообразующих сорбентах — новый принцип разрешения рацематов, *ДАН СССР*, **192**, 1288 (1970).
 81. *Даванков В. А., Рогожин С. В., Песлякас И. И., Ямсков И. А., Семечкин А. В.*, Лигандообменная хроматография — новый принцип разделения оптических изомеров. В сб.: Ионный обмен и хроматография. Часть 1, Воронеж, **62**, 1971.
 82. *Даванков В. А., Рогожин С. В.*, Новый принцип разрешения рацематов α -аминокислот. Седьмой Международный симпозиум по химии природных соединений, Рига, А-32, 1970.
 83. *Rogozhin S. V., Davankov V. A.*, Ligand chromatography on asymmetric complex-forming sorbents as a new method for resolution of racemates, *Chem. Commun.*, **1971**, 490.
 84. *Даванков В. А., Рогожин С. В., Песлякас И. И., Семечкин А. В., Сацкова Т. П.*, Расщепление рацематов лигандообменной хроматографией с помощью сорбентов на основе L-пролина и L-гидроксипролина, *ДАН СССР*, **201**, 854 (1971).
 85. *Davankov V. A., Rogozhin S. V., Semechkin A. V.*, Ligand exchange chromatography of racemates. III. Resolution of α -amino acids, *J. Chromatogr.*, **91**, 493 (1974).
 86. *Davankov V. A., Zolotarev Yu. A.*, Ligand exchange chromatography of racemates. V. Separation of optical isomers of amino acids on a polystyrene resin containing L-hydroxyproline, *J. Chromatogr.*, **155**, 285 (1978).
 87. *Davankov V. A., Zolotarev Yu. A.*, Ligand exchange chromatography of racemates. VII. Separation of optical isomers of amino acids on a polystyrene resin containing L-allo-hydroxyproline as the fixed ligand, *J. Chromatogr.*, **155**, 303 (1978).
 88. *Даванков В. А., Золотарев Ю. А., Тевлин А. Б.*, Лигандообменная хроматография рацематов. VIII. Количественное расщепление рацематов аминокислот на полистирольных смолах с L-гидроксипролиновыми группами для анализа энантиомерного состава аминокислот, *Биоорг. химия*, **4**, 1164 (1978).
 89. *Davankov V. A., Zolotarev Yu. A., Kurganov A. A.*, Ligand exchange chromatography of racemates. XI. Complete resolution of some chelating racemic compounds and nature of sorption enantioselectivity, *J. Liquid Chromatogr.*, **2**, 1191, 1979.
 90. *Песлякас И. И., Рогожин С. В., Даванков В. А.*, Расщепление рацематов лигандообменной хроматографией с помощью сорбентов на основе L-аланина, L-валина и L-изолейцина, *Изв. АН СССР*, сер. хим., **1974**, 174.
 91. *Песлякас И. И., Рогожин С. В., Даванков В. А.*, Расщепление рацематов лигандообменной хроматографией с помощью сорбентов на основе L-серина, L-треонина и L-тирозина, *Изв. АН СССР*, сер. хим., **1974**, 1872.
 92. *Ямсков И. А., Рогожин С. В., Даванков В. А.*, Лигандообменная хроматография рацематов на диссимметрических сорбентах с трифункциональными аминокислотными группами (гистидин, метионин, метионинсульфоксид), *Биоорг. химия*, **3**, 200 (1977).
 93. *Davankov V. A., Kurganov A. A.*, Ligand exchange chromatography of racemates. XII. High performance liquid chromatography of α -amino acids on a polystyrene resin with fixed ligands of the type (R)-N¹,N¹-dibenzyl-1,2-propanediamine, *Chromatographia*, **13**, 339 (1980).
 94. *Широков В. А., Циряткин В. А., Недоспасова Л. В., Курганов А. А., Даванков В. А.*, Энантиомерный анализ пролина, валина, фенилаланина, тирозина, триптофана и их эфиров с помощью лигандообменной хроматографии, *Биоорг. химия*, **9**, 878 (1983).
 95. *Zolotarev Yu. A., Myasoedov N. F., Penkina V. I., Petrenik O. V., Davankov V. A.*, Ligand exchange chromatography of racemates. XIV. Micropreparative resolution of LD-leucine, *J. Chromatogr.*, **207**, 63 (1981).

96. *Myasoedov N. F., Kuznetsova O. B., Petrenik O. V., Davankov V. A., Zolotarev Yu. A.*, Resolution of tritium labelled amino acid racemates by ligand exchange chromatography. I. Method of obtaining L- and D-[³H] valine using a polystyrene resin with L-hydroxyproline groupings, *J. Labeled Compds. Radiopharm.*, **17**, 439 (1979).
97. *Zolotarev Yu. A., Myasoedov N. F., Penkina V. I., Dostovalov I. N., Petrenik O. V., Davankov V. A.*, Resolution of tritium labelled amino acid racemates by ligand exchange chromatography. II. L-hydroxy-proline- and L-phenylalanine-modified resins for the resolution of common α -amino acids, *J. Chromatogr.*, **207**, 231 (1981).
98. *Даванков В. А., Рогожин С. В., Курганов А. А.*, Первый пример стереоселективности в комплексах меди с бидентатными аминокислотами, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1971**, 204.
99. *Даванков В. А., Рогожин С. В., Курганов А. А.*, Стереоселективность медных бис-N-бензилпролиновых комплексов, *ЖОХ*, **17**, 2163 (1972).
100. *Сенюкова Г. А., Курганов А. А., Никитаев А. Т., Даванков В. А., Зама-раев К. И.*, ЭПР-исследование электронного состояния атомов меди в комплексах с L- и D-формами N-бензилпролина; ЭПР-исследование термодинамических свойств и структуры аддуктов метанола с бис(N-бензилпролином)медью, *Коорд. химия*, **1**, 396, 400 (1975).
101. *Курганов А. А., Даванков В. А., Жучкова Л. Я.*, Спектрофотометрическое исследование влияния внешней и внутрисферной координации метанола на энантиоселективные эффекты в комплексах меди(II) с N-бензилпролином, *Коорд. химия*, **3**, 988, 1977.
102. *Александров Г. Г., Стручков Ю. Т., Курганов А. А., Рогожин С. В., Даванков В. А.* Кристаллическая и молекулярная структура бис(N-бензилпролината) меди(II). *Журн. структ. хим.*, **13**, 671 (1972).
103. *Kurganov A. A., Zhuchkova L. Ya., Davankov V. A.*, Stereoselectivity in bis(α -amino acid) copper(II) complexes. VII. Thermodynamics of N-benzylproline coordination to copper(II), *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **40**, 1081 (1978).
104. *Davankov V. A., Mitchell P. R.*, Stereoselectivity in bis(α -amino acid) copper(II) complexes. I. Stability constants from circular dichroism and electronic spectra, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1972**, 1012.
105. *Muller D., Jozefonvicz J., Petit M.*, Mise en evidence d'effets stereoselectifs par determination des constantes de formation des complexes cuivreux mixtes associant le derive N-benzyl L-proline et l'histidine, la proline ou la phenylalanine, *C. R. Acad. Sci. Ser. C*, **288**, 45 (1979).
106. *Jozefonvicz J., Muller D., Petit M.*, Stereoselectivity in the ternary complexes copper(II)-N-benzyl-L-proline-D- or L- α -amino acids, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1980**, 76.
107. *Muller D., Petit M., Szubarga A., Jozefonvicz J.*, Effet stereoselectif du derive N-benzyl L-proline dans la formation de complexes metalliques mixtes associant l'histidine, *C. R. Acad. Sci. Ser. C*, **285**, 531 (1977).
108. *Davankov V. A., Rogozhin S. V., Struchkov Yu. T., Alexandrov G. G., Kurganov A. A.*, Stereoselectivity in bis(α -amino acid) copper(II) complexes. IV. Structure of Cu(II)-N-benzylvaline complexes and the nature of enantioselectivity effects, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **38**, 631 (1976).
109. *Leach B. E., Angelici R. J.*, Stereoselective interaction of optically active amino acids and esters with (L-valine-N-monoacetato)-copper(II), *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 6296 (1969).
110. *Snyder R. V., Angelici R. J.*, Stereoselectivity of N-carboxymethyl-amino acid complexes of copper(II) toward optically active amino acids, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **35**, 523 (1973).
111. *Muller D., Jozefonvicz J., Petit M.*, Stereoselective binding of D- or L- α -amino acids by copper(II) complexes of N-benzenesulfonyl-L- α -phenylalanine, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **42**, 1665 (1980).
112. *Kurganov A. A., Davankov V. A., Zhuchkova L. Ya., Ponomareva T. M.*, Copper(II) complexes with optically active diamines. I. Synthesis and properties of copper(II) complexes with N-benzyl- and N-methyl derivatives of 1,2-diaminopropane, *Inorg. Chim. Acta*, **39**, 237 (1980).
113. *Kurganov A. A., Davankov V. A., Zhuchkova L. Ya., Ponomareva T. M.*, Copper(II) complexes with optically active diamines. II. The effect of solvent, temperature, and alkyl substituents at nitrogen atoms on circular dichroism spectra of copper(II) equally paired and mixed ligand complexes with (R)-1,2-diaminopropane, *Inorg. Chim. Acta*, **39**, 243 (1980).
114. *Kurganov A. A., Ponomareva T. M., Davankov V. A.*, Copper(II) complexes with optically active diamines. III. The complexes of 2-(amino-methyl)-pyrrolidine and its benzyl derivatives: synthesis, properties, and circular dichroism spectra, *Inorg. Chim. Acta*, **45**, L23 (1980).
115. *Kurganov A. A., Ponomareva T. M., Davankov V. A.*, Copper(II) complexes with optically active diamines. IV. Between ligand interactions in mixed ligand copper(II) complexes containing (S)-2-(amino-methyl)-pyrrolidine, ethylenediamine, 1,2-diaminopropane, and their N-benzyl derivatives, *Inorg. Chim. Acta*, **68**, 51 (1983).
116. *Kurganov A. A., Ponomareva T. M., Davankov V. A.*, Copper(II) complexes with optically active diamines. V. Enantioselective effects in equally paired and mixed ligand copper(II) complexes with diamines, *Inorg. Chim. Acta*, **86**, 145 (1984).
117. *Davankov V. A., Rogozhin S. V., Semechkin A. V., Baranov V. A., Sannikova G. S.*, Ligand exchange chromatography of racemates. II. Influence of temperature and concentration of eluent on ligand exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **93**, 363 (1974).
118. *Muller D., Jozefonvicz J., Petit M.*, Importance in ligand exchange chromatography of stereoselectivity in the ternary complexes copper(II)-N-substituted L-proline D/L- α -amino acids, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **42**, 1083 (1980).
119. *Boue J., Audebert R., Quivoron C.*, Direct resolution of α -amino acid enantiomers by ligand exchange — stereoselection mechanism on silica packings coated with a chiral polymer, *J. Chromatogr.*, **204**, 185 (1981).
120. *Мясоедов Н. Ф., Пенкина В. И., Петренко О. В., Золотарев Ю. А.* Хроматографическое исследование расщепления рацематов аминокислот, меченных тритием. В сб.: Первая Всесоюзная конференция по выделению изотопов, полученных на циклотроне и в результате деления. — Ташкент: Тезисы, 53, 1980.
121. *Szczepaniak W., Ciszewska W.*, Resolution of some racemic D,L amino acids on an ion exchanger containing iminodi(methanephosphonic) groups in amino copper form, *Chromatographia*, **15**, 38 (1982); *Bayer E.*, *Chromatographia*, **18**, 220 (1984); and *Szczepaniak W.*, *Chromatographia*, **18**, 221 (1984).
122. *Bochkov A. S., Zolotarev Yu. A., Belov Yu. P., Davankov V. A.*, Ligand exchange chromatographic separation of amino acid enantiomers on silica gel with fixed chiral ligands, Paper B 3.23, Proc. Second Danube Symp. Progress in Chromatography, Carlsbad, Czechoslovakia, 1979.
123. *Gübitz G., Jellenz W., Löffler G., Santi W.*, Chemically bonded chiral stationary phases for the separation of racemates by high performance liquid chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **2**, 145 (1979).
124. *Foucault A., Caude M., Oliveros L.*, Ligand exchange chromatography of enantiomeric amino acids on copper loaded chiral bonded silica gel and of amino acids on copper(II) modified silica gel, *J. Chromatogr.*, **185**, 345 (1979).
125. *Gübitz G., Jellenz W., Santi W.*, Resolution of the optical isomers of underivatized amino acids on chemically bonded chiral phases by ligand exchange chromatography, *J. Liquid Chromatogr.*, **4**, 701 (1981).
126. *Gübitz G., Jellenz W., Santi W.*, Separation of the optical isomers of amino

- acids by ligand exchange chromatography using chemically bonded chiral phases, *J. Chromatogr.*, **203**, 377 (1981).
127. *Gübitz G., Juffman F., Jellenz W.*, Direct separation of amino acid enantiomers by high performance ligand exchange chromatography on chemically bonded chiral phases, *Chromatographia*, **16**, 103 (1983).
 128. *Gübitz G., Mihellyes S.*, Direct separation of 2-hydroxy acid enantiomers by high performance liquid chromatography on chemically bonded chiral phases, *Chromatographia*, **19**, 257 (1984).
 129. *Lindner W.*, HPLC-Enantiomerentrennung an gebundenen chiralen Phasen, *Naturwissenschaften*, **67**, 354 (1980).
 130. *Watanabe N.*, Enantiomeric resolution of amino acids by high performance ligand exchange chromatography using histidine bonded silica gel, *J. Chromatogr.*, **260**, 75 (1983).
 131. *Engelhardt H., Kromidas S.*, HPLC and chiralen chemisch gebundenen Phasen auf Kieselgel, *Naturwissenschaften*, **67**, 353 (1980).
 132. *Engelhardt H., Ahr G.*, Properties of chemically bonded phases, *Chromatographia*, **14**, 227 (1981).
 133. *Sugden K., Hunter C., Lloyd-Jones G.*, Ligand exchange chromatography. I. Resolution of L- and D-proline on a copper(II) proline complex bond to microparticulate silica gel, *J. Chromatogr.*, **192**, 228 (1980).
 134. *Roumeliotis P., Unger K. K., Kurganov A. A., Davankov V. A.*, Chiral silica packings with L-proline or L-hydroxyproline bonded via alkyl or alkylbenzyl chains for the separation of the enantiomers of α -amino acids by HPLC, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **21**, 930 (1982).
 135. *Roumeliotis P., Unger K. K., Kurganov A. A., Davankov V. A.*, High performance ligand exchange chromatography of α -amino acid enantiomers — studies on monomerically bonded 3-(L-prolyl)- and 3-(L-hydroxy-prolyl) propyl silicas, *J. Chromatogr.*, **255**, 51 (1983).
 136. *Roumeliotis P., Kurganov A. A., Davankov V. A.*, Effect of the hydrophobic spacer in bonded [Cu(L-hydroxypropyl)alkyl]⁺ silicas on retention and enantioselectivity of α -amino acids in high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **266**, 439 (1983).
 137. *Roumeliotis P., Kurganov A. A., Davankov V. A.*, High performance ligand exchange chromatography of α -amino acid enantiomers on bonded chiral silica phases of the N-(p-ethylenebenzyl)-L-hydroxyproline type, in press.
 138. *Даванков В. А., Рогожин С. В.*, Хроматография лигандов — новый метод исследования смешанных комплексов: стереоселективные эффекты в комплексах α -аминокислот с медью(II), *ДАН СССР*, **193**, 94, (1970).
 139. *Даванков В. А., Курганов А. А., Рогожин С. В.*, Энантиоселективные эффекты в координационных соединениях, *Химическое обозрение*, **43**, 764 (1974).
 140. *Davankov V. A., Kurganov A. A.*, Chiral monomeric versus polymeric ligands bonded to silica surface in the ligand exchange chromatography of optical isomers, in *Symp. on Liquid Chromatography in the Biomedical Sciences*, Abstr., Ronneby, Sweden, June 18 to 21, 1984.
 141. *Feibush B., Cohen M. J., Karger B. L.*, The role of bonded phase composition on the ligand exchange chromatography of dansyl-D,L-amino acids, *J. Chromatogr.*, **282**, 3 (1983).
 142. *Gelber L. R., Karger B. L., Neumeyer J. L., Feibush B.*, Ligand exchange chromatography of amino alcohols. Use of Schiff bases in enantiomer resolution, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7729 (1984).
 143. *Kurganov A. A., Tevlin A. B., Davankov V. A.*, High performance ligand exchange chromatography of enantiomers — studies on polystyrene type chiral phases bonded to microparticulate silicas, *J. Chromatogr.*, **261**, 223 (1983).
 144. *Kicinski H. G., Kettrup A.*, Synthesis and characterization of L(+)-diacetyl-tartaric acid silica gel for high-performance liquid chromatography, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **316**, 39 (1983).
 145. *Kicinski H. G., Kettrup A.*, Determination of enantiomeric catecholamines by ligand-exchange chromatography using chemically modified L(+)-tartaric acid silica gel, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **320**, 51 (1985).
 146. *Bernauer K.*, Separation of racemic mixtures by chromatography on an optically active support, шведск. пат. 490292, 1970; *C. A.*, **74**, 64395t (1971).
 147. *Humbel F., Vonderschmitt D., Bernauer K.*, Effects stereoselectifs dans les reactions des complexes metalliques. I. Stereoselectivite de la reaction de l'anion D-N-(hydroxy-2-ethyl)-propylenediaminetriacetatoferrate(III) avec quelques derives d'acides amines, *Helv. Chim. Acta*, **53**, 1983 (1970).
 148. *Bernauer K., Jeanneret M. F., Vonderschmitt D.*, Stereoselective effects in reactions of metal complexes. II. Selectivity in the complex formation of nickel(II)-, copper(II)-, and zinc(II)-(D)-propylenediaminetetrate with racemic 1-phenylethyl-amine, *Helv. Chim. Acta*, **54**, 297 (1971).
 149. *Davankov V. A., Bochkov A. S., Kurganov A. A., Roumeliotis P., Unger K. K.*, Separation of unmodified α -amino acid enantiomers by reverse phase HPLC, *Chromatographia*, **13**, 677 (1980).
 150. *Davankov V. A., Bochkov A. S., Belov Yu. P.*, Ligand exchange chromatography of racemates. XV. Resolution of α -amino acids on reversed phase silica gels coated with N-decyl-L-histidine, *J. Chromatogr.*, **218**, 547 (1981).
 151. *Klemisch W., von Hodenberg A., Vollmer K. O.*, Resolution of the enantiomers of *m*- and *p*-hydroxymandelic acid by high performance liquid chromatography, *High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **4**, 535 (1981).
 152. *Lam-Thang H., Femandjian S., Fromageot P.*, High performance liquid chromatography and magnetic circular dichroism — study of the «palladium(II)-thioether peptide» complexes, *J. Chromatogr.*, **235**, 139 (1982).
 153. *Красутский П. А., Родионов В. Н., Тихонов В. П., Юрченко А. Г.*, d-Камфорат-10-сульфонат серебра — новый хиральный реагент для энантиомерного разрешения oleфинов, *Теорет. и эксл. химия*, **20**, 58 (1984).
 154. *Guenther K., Martens J., Schickedanz M.*, Thin layer chromatographic enantiomer separation by using ligand exchange, *Angew. Chem.*, **96**, 514 (1984); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **23**, 506 (1984).
 155. *Günther K., Schickedanz M., Martens J.*, Thin-layer chromatographic enantiomeric resolution, *Naturwissenschaften*, **72**, 149 (1985).
 156. *Weinstein S.*, Resolution of optical isomers by thin layer chromatography, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 985 (1984).
 157. *Grinberg N., Weinstein S.*, Enantiomeric separation of DNS-amino acids by reversed phase thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.*, **303**, 251 (1984).
 158. *LePage J. N., Lindner W., Davies G., Seitz D. E., Karger B. L.*, Resolution of the optical isomers of dansyl-amino acids by reversed phase liquid chromatography with optically active metal chelate additives, *Anal. Chem.*, **51**, 433 (1979).
 159. *Hare P. E., Gil-Av E.*, Separation of D- and L-amino acids by liquid chromatography — use of chiral eluants, *Science*, **204**, 1226 (1979).
 160. *Sousa L. R., Hoffman D. H., Kaplan L., Cram D. J.*, Total optical resolution of amino esters by designed host/guest relationship in molecular complexation, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7100 (1974).
 161. *Gil-Av E., Tishbee A., Hare P. E.*, Resolution of underivatized amino acids by reversed phase chromatography, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5115 (1980).
 162. *Oelrich E., Preusch H., Wilhelm E.*, Separation of enantiomers by high performance liquid chromatography using chiral eluents, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **3**, 269 (1980).
 163. *Gelber L. R., Neumeyer J. L.*, Determination of the enantiomeric purity of levo-DOPA, methyl-DOPA, and tryptophan by use of chiral mobile phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **257**, 317 (1983).

164. *Wernicke R.*, Separation of underivatized amino acid enantiomers by means of a chiral solvent-generated phase, *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 39 (1985).
165. *Weinstein S., Engel M. H., Hare P. E.*, The enantiomeric analysis of a mixture of all common protein amino acids by high performance liquid chromatography using a new chiral mobile phase, *Anal. Biochem.*, **121**, 370 (1982).
166. *Weinstein S.*, Enantiomeric analysis of the common protein amino acids by liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.*, **3**, 16 (1984).
167. *Weinstein S.*, Resolution of D- and L-amino acids by HPLC with copper complexes of N,N-dialkyl- α -amino acids as novel chiral additives — a structure selectivity study, *Angew. Chem. Suppl.*, **1982**, 425. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **21**, 218 (1982).
168. *Weinstein S., Grinberg N.*, Enantiomer separation of underivatized α -methyl- α -amino acids by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **318**, 117 (1985).
169. *Gilon C., Leshem R., Tapuhi Y., Grushka E.*, Reversed phase chromatographic resolution of amino acid enantiomers with metal aspartame eluents, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 7612 (1979).
170. *Gilon C., Leshem R., Grushka E.*, Determination of enantiomers of amino acids by reversed phase high performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **52**, 1206 (1980).
171. *Gilon C., Leshem R., Grushka E.*, Structure resolution relationship. I. The effect of the alkylamide side chain of aspartyl derivatives on the resolution of amino acid enantiomers, *J. Chromatogr.*, **203**, 365 (1981).
172. *Gilon C., Leshem R., Grushka E.*, Determination of amino acid enantiomers by reversed phase HPLC: the effect of alkylamide chain of aspartylamides on resolution, in *Peptides*, 16th Proc. Eur. Pept. Symp., Copenhagen, 1980, Brunfeldt B., Ed., **1981**, 700; as cited in *C. A.*, **97**, 169563 (1982).
173. *Grushka E., Leshem R., Gilon C.*, Retention behavior of amino acid enantiomers in reversed phase liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **255**, 41 (1983).
174. *Nimura N., Suzuki T., Kasahara Y., Kinoshita T.*, Reversed phase liquid chromatographic resolution of amino acid enantiomers by mixed chelate complexation, *Anal. Chem.*, **53**, 1380 (1981).
175. *Nimura N., Toyama A., Kinoshita T.*, Optical resolution of DL-proline by reversed phase high performance liquid chromatography using N-(*p*-toluenesulphonyl)-L-phenylalanine-copper(II) as a chiral additive, *J. Chromatogr.*, **234**, 482 (1982).
176. *Nimura N., Toyama A., Kasahara Y., Kinoshita T.*, Reversed phase liquid chromatographic resolution of underivatized DL-amino acids using chiral eluents, *J. Chromatogr.*, **239**, 671 (1982).
177. *Nimura N., Toyama A., Kinoshita T.*, Optical resolution of amino acid enantiomers by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **316**, 547 (1984).
178. *Kurganov A. A., Davankov V. A.*, Ligand exchange chromatography of racemates. XVI. Microbore column chromatography of amino acid racemates using N,N,N',N'-tetramethyl-(R)-propanediamine-1,2-copper(II) complexes as chiral additives to the eluent, *J. Chromatogr.*, **218**, 559 (1981).
179. *Lindner W., LePage J. N., Davies G., Seitz D. E., Karger B. L.*, Reversed phase separation of optical isomers of Dns-amino acids and peptides using chiral metal chelate additives, *J. Chromatogr.*, **185**, 323 (1979).
180. *Lam S. K., Chow F. K.*, Resolution of DL-dansyl amino acids by HPLC with a copper(II)-L-proline eluent, *J. Liq. Chromatogr.*, **3**, 1579 (1980).
181. *Lam S., Chow F., Karmen A.*, Reversed phase high performance liquid chromatographic resolution of D- and L-DNS-amino acids by mixed chelate complexation, *J. Chromatogr.*, **199**, 295 (1980).
182. *Lam S. K.*, Improved enantiomeric resolution of DL-dns-amino acids, *J. Chromatogr.*, **234**, 485 (1982).
183. *Lam S.*, Stereoselective analysis of D and L dansyl-amino acids as the mixed chelate copper(II) complexes by HPLC, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 416 (1984).
184. *Lam S., Azumaya H., Karmen A.*, High performance liquid chromatography of amino acids in urine and cerebrospinal fluid, *J. Chromatogr.*, **302**, 21 (1984).
185. *Tapuhi Y., Miller N., Karger B. L.*, Practical consideration in the chiral separation of Dns-amino acids by reversed phase liquid chromatography using metal chelate additives, *J. Chromatogr.*, **205**, 325 (1981).
186. *Weinstein S., Weiner S.*, Enantiomeric analysis of a mixture of the common protein amino acids as their Dns derivatives. Single-analysis reversed-phase high-performance liquid chromatographic procedure using a chiral mobile phase additive, *J. Chromatogr.*, **303**, 244 (1984).
187. *Marchelli R., Dossena A., Casnati G., Dallavalle F., Weinstein S.*, Chiral copper(II) complexes for the enantioselective resolution of DL-dansyl-amino acids, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 336 (1985).
188. *Lam S., Karmen A.*, Resolution of optical isomers of Dns-amino acids by high performance liquid chromatography with L-histidine and its derivatives in the mobile phase, *J. Chromatogr.*, **239**, 451 (1982).
189. *Lam S., Karmen A.*, Stereoselective D- and L-amino acid analysis by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **289**, 339 (1984).
190. *Lebl M., Hrbas P., Skopkova J., Slaninova J., Machova A., Barth T., Jost K.*, Synthesis and properties of oxytocin analogues with high and selective natriuretic activity, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **47**, 2540 (1982).
191. *Gundlach G., Sattler E. L., Wagenbach U.*, Trennung von racemischen Alkylaminosäuren durch HPLC mit chiraler mobiler Phase, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **311**, 684 (1982).
192. *DuBois G. E., Stephenson R. A.*, Dehydrochalcone sweeteners — synthesis, sensory evaluation, and chiral eluent chromatography of the D and L antipodes of a potentially sweet, sucrose-like homoserine-dehydrochalcone conjugate, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 676 (1982).
193. *Forsman U.*, Enantiomeric resolution of an optically active guanine derivative by high-performance liquid chromatography with phenylalanine-Cu(II) in the mobile phase, *J. Chromatogr.*, **303**, 217 (1984).
194. *Benecke I.*, Resolution of underivatized 2-hydroxy acids by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **291**, 155 (1984).
195. *Даванков В. А., Рогожин С. В., Курганов А. А.*, Наличие двух форм в растворах бис-комплексов меди с бидентатными α -аминокислотами, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1972**, 486.
196. *Рогожин С. В., Даванков В. А., Курганов А. А., Тимофеева Г. И.*, Структура трех форм бис-комплексов меди(II) с бидентатными α -аминокислотными лигандами, *Ж. неорг. химии*, **19**, 3294 (1974).
197. *Gillard R. D.*, Stereoselectivity and reactivity in complexes of amino acids and peptides, *Inorg. Chim. Acta Rev.*, **1**, 69 (1967).
198. *Kurganov A. A., Davankov V. A.*, The rule of average environment and the axial coordination in copper(II) complexes, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **12**, 743 (1976).
199. *Lafuma F., Boue J., Audebert R., Quivoron C.*, Copper(II) and nickel(II) stereocomplexes involved in the separation of α -amino acid enantiomers by ligand exchange chromatography — stability constants and structural investigations, *Inorg. Chim. Acta*, **66**, 167 (1982).
200. *Takeuchi T., Horikawa R., Tanimura T.*, Enantioselective solvent extraction of neutral DL-amino acids in two-phase system containing N-n-alkyl-L-proline derivatives and copper ions, *Anal. Chem.*, **56**, 1152 (1984).
201. *Takeuchi T., Horikawa R., Tanimura T.*, Complete resolution of DL-isoleucine by droplet counter current chromatography, *J. Chromatogr.*, **284**, 285 (1984).

202. *Davankov V. A., Kurganov A. A.*, The role of the achiral sorbent matrix in chiral recognition of amino acid enantiomers in ligand exchange chromatography, *Chromatographia*, **17**, 686 (1983).
203. *Petit-Ramel M. M., Paris M. R.*, Eute polarimetrique des complexes metalliques des amino acides. II. Les complex mixtes du cuivre avec deux amino acides, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1968**, 2791.
204. *Al-Ani N., Olin A.*, Stereoselective effects in the formation of mixed copper(II) complexes with proline and some other α -aminoacids, *Chem. Ser.*, **23**, 165 (1984).
205. *Davankov V. A., Rogozhin S. V., Kurganov A. A., Zhuchkova L. Ya.*, Stereoselectivity in bis(α -amino acid) copper (II) complexes. II. Spectrophotometric and spectropolarimetric investigation of the solvent effect, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **37**, 369 (1975).
206. *Zolotarev Yu. A., Myasoedov N. F.*, Effect of skeletal structure of sorbents containing L-hydroxyproline groups on enantioselectivity in ligand exchange chromatography of amino acid racemates, *J. Chromatogr.*, **264**, 377 (1983).
207. *Kurganov A. A., Ponomareva T. M., Davankov V. A.*, Study into mechanism of chiral recognition of amino acid enantiomers in ligand exchange chromatography using microbore column technique, Sixth Int. Symp. on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Italy, May 14 to 16, 871, **1985**.
208. *Zolotarev Yu. A., Kurganov A. A., Davankov V. A.*, Potentiometric determination of the dissociation constants of an asymmetric sorbent containing L-proline, and the stability constants of its copper(II) complexes, *Talanta*, **25**, 493 (1978).
209. *Zolotarev Yu. A., Kurganov A. A., Semechkin A. V., Davankov V. A.*, Determination of stability constants of fixed site complexes of copper(II) ions and of sorbed copper-L-proline complexes with an asymmetric resin containing L-proline groups, *Talanta*, **25**, 499 (1978).
210. *Hering R.*, Chelatbildende Ionenaustauscher, Akademie Verlag, Berlin, 1967, 77.
211. *Даванков В. А., Рогожин С. В., Семечкин А. В., Сачкова Т. П.*, Расщепление рацематов с помощью хроматографии лигандов. Влияние степени насыщения сорбента ионами металлов на распределение подвижных лигандов, *ЖФХ*, **47**, 1254 (1973).
212. *Krebs H., Rasche R.*, Über chromatographische Spaltung von Racematen. I. Optisch aktive Kobaltkomplexe von Dithiosäuren, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **276**, 236 (1954).
213. *Krebs H., Rasche R., Wagner J. A., Diewald J.*, Über Spaltung von racemischen Komplexsalzen auf chromatographischem Wege, *Angew. Chem.*, **66**, 329 (1954).
214. *Yoshikawa Y., Yamasaki K.*, Complete chromatographic resolution of cobalt(III) complexes on ion exchange Sephadex, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **6**, 523 (1970).
215. *Piper T. S.*, Partial chromatographic resolution, rotatory dispersion, and absolute configuration of octahedral complexes containing three identical bidentate ligands, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3908 (1961).
216. *Fujita M., Yoshikawa Y., Yamatera H.*, Highly efficient chromatographic resolution of $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ ion with a column of TA(ES)-Sephadex containing D-tartrate groups, *Chem. Lett.*, **11**, 473 (1975).
217. *Krebs H., Rasche R.*, Über ein chromatographisches Verfahren zur optischen Aktivierung von Racematen, *Naturwissenschaften*, **41**, 63 (1954).
218. *Krebs H., Diewald J., Arlitt H., Wagner J. A.*, Über die chromatographische Spaltung von Racematen. II. Versuche zur Aktivierung von oktaederförmig gebauten Komplexen, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **287**, 98 (1956).
219. *Douglas B. E., Yamada S.*, Configurational and vicinal contributions to the

- optical activity of the isomers of tris(alaninato) cobalt(III), *Inorg. Chem.*, **4**, 1561 (1965).
220. *Gillard R. D., Harrison P. M., McKenzie E. D.*, Optically active coordination compounds. IX. Complexes of dipeptides with cobalt(III), *J. Chem. Soc. A*, **1967**, 618.
221. *Jursik F., Wollmanova D., Hayek B.*, The synthesis and partial resolution of tris(α -aminoisobutyrate) cobalt(III), *Collection*, **38**, 3627 (1973).
222. *Legg J. I., Cooke D. W., Douglas B. E.*, Circular dichroism of trans-N,N'-ethylenediaminediacetic acid cobalt(III) complexes, *Inorg. Chem.*, **6**, 700 (1967).
223. *Warner L. G., Rose N. J., Busch D. H.*, Stereochemistry of a macrocyclic complex — Chelate ring conformations and unusual isomers, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 703 (1967).
224. *Taylor L. T., Bush D. H.*, Chromatographic resolution of antipodes of a helical complex of nickel(II), *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5372 (1967).
225. *Moeller T., Gulyas E.*, The partial resolution of certain inner complexes by means of a chromatographic technique, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **5**, 245 (1958).
226. *Collman J. P., Blair R. P., Marshall R. L., Slade A. L.*, The chemistry of metal chelate rings. IV. Electrophilic substitution of optically active tris-acetylacetonates, *Inorg. Chem.*, **2**, 576 (1963).
227. *Fay R. C., Girgis A. Y., Klabunde U.*, Stereochemical rearrangements of metal tris- β -diketonates. I. Partial resolution and racemization of some tris(acetylacetonates), *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 7056 (1970).
228. *Irving H. M. N. H., Simpson R. B., Smith I. S.*, The examination by viscosimetry of possible stereospecific interaction between chromium(III) acetylacetonate and an optically active ester in benzene solution, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **32**, 275 (1970).
229. *Collman J. P., Blair R. P., Slade A. L., Marshall R. L.*, Optical stability of metal acetylacetonates — racemization during crystallisation, *Chem. Ind. (London)*, **1962**, 141.
230. *Collman J. J.*, Complete resolution of cobalt(III) acetylacetonate, *Diss. Abstr. B*, **28**, 4482 (1968).
231. *Moeller T., Gulyas E., Marshall R. H.*, Observations on the rare earths. LXVIII. Partial resolution of yttrium and gadolinium acetylacetonates by means of a chromatographic technique, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **9**, 82 (1959).
232. *Fay R. C., Piper T. S.*, Coordination compounds of trivalent metals with unsymmetrical 1,3-diketones. III. Mechanism of stereochemical rearrangements, *Inorg. Chem.*, **3**, 348 (1964).
233. *Gordon J. G., Holm R. H.*, Intramolecular rearrangement reactions of tris-chelate complexes. I. General theory and the kinetics and probable mechanism of the isomerization and racemization of tris(5-methylhexane-2,4-dionato) cobalt(III), *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5319 (1970).
234. *Hseu T. M., Martin D. F., Moeller T.*, Partial resolution of some copper(II) and nickel(II) β -ketoimine compounds by means of a chromatographic technique, *Inorg. Chem.*, **2**, 587 (1963).
235. *Ramaiah K., Anderson F. E., Martin D. F.*, Preparation and resolution of a five coordinate complex — bis-acetylacetonepropylenediiminooxovanadium(IV), *Inorg. Chem.*, **3**, 296 (1964).
236. *Ramaiah K., Martin D. F.*, Five coordinate compounds. II. Studies on β -diketo and β -ketoimino complexes of oxovanadium(IV) ion, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **27**, 1663, (1965).
237. *Markovic V. G., Schweitzer G. K.*, The partial separations of some neutral β -diketone complexes into optically active isomers, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **33**, 3197 (1971).
238. *Okawa H., Yoshino T.*, Macro chelate rings. II. Synthesis and properties of 2,7-dimethyl-4,5-bis(salicylideneaminomethyl)xanthone as a quadridentate

- chelating agent and its metal complexes, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **43**, 805 (1970).
239. *Buchar E., Suchy K.*, Chromatography of certain inorganic isomers and complex compounds, *Mag. Kem. Foly.*, **64**, 45 (1958); *C. A.*, **52**, 11518f (1958).
240. *Dwyer F. P., McDermott T. E., Sargeson A. M.*, Stereospecific influences in metal complexes containing optically active ligands. VII. The isolation of the D- and L-isomers of bis-[(-)-propylenediamine]-ethylenediamine cobalt(III) and bis(ethylenediamine)-[(-)-propylenediamine] cobalt(III) ions, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2913 (1963).
241. *Legg J. I., Douglas B. E.*, Partial resolution of cobalt(III) chelate complexes by ion exchange cellulose chromatography, *Inorg. Chem.*, **7**, 1452 (1968).
242. *Brubaker G. R., Legg J. I., Douglas B. E.*, Total resolution of the hexakis(2-aminoethane-thio)tricobalt(III) cation by ion exchange chromatography, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3446 (1966).
243. *Schwab D. E., Rund J. V.*, Resolution of the optical isomers — Geometry of (di-chloro-bis-phenanthroline)rhodium chloride, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **32**, 3949 (1970).
244. *Yoshikawa Y., Yamasaki K.*, Chromatographic resolution of cobalt(III) complexes on ion exchange cellulose, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **4**, 697 (1968).
245. *Norden B.*, Circular dichroism spectrum and absolute configuration of tris(acetylacetonato)chromium(III), *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **11**, 387 (1975).
246. *Jonas I., Norden B.*, Circular dichroism and absolute configuration of tris(acetylacetonato)cobalt(III), *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **12**, 43 (1976).
247. *Jonas I., Norden B.*, Optical resolution by chromatography at low temperature, *Nature (London)*, **258**, 597 (1975).
248. *Norden B., Jonas I.*, Optical resolution of tris(acetylacetonato)aluminum(III) by low temperature chromatography, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **12**, 33 (1976).
249. *Yoshino Y., Sugiyama H., Nogaito S., Kinoshita H.*, Resolution of racemic complexes on ion exchange resins, *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo*, **16**, 57 (1966).
250. *Gaal J., Inszedy J.*, Chromatographic separation of optical isomers by means of outer sphere complex formation reactions, *Talanta*, **23**, 78 (1976).
251. *Gillard R. D., Mitchell P. R.*, An easy novel chromatographic resolution of complex cations, *Transition Met. Chem.*, **1**, 223 (1976).
252. *Celap M. B., Hodzic I. M., Janjic T. J.*, Resolution of neutral complexes of transition metals by stereoselective adsorption on optically active complexes. I. Partial resolution of tris(acetylacetonato) cobalt(III) and tris(acetylacetonato)-chromium(III) on cobalt(III) complexes, *J. Chromatogr.*, **198**, 172 (1980).
253. *Yamagishi A., Ohnishi R., Soma M.*, Chromatographic resolution of tris(acetylacetonato)cobalt(III) on a Δ -tris-(1,10-phenanthroline)-nickel(II) montmorillonite column, *Chem. Lett.*, **1982**, 85.
254. *Yamagishi A.*, Clay column chromatography — partial resolution of metal(III) tris(acetylacetonato) on a Δ -nickel(II) tris(1,10-phenanthroline)-montmorillonite column, *Inorg. Chem.*, **21**, 3393 (1982).
255. *Yamagishi A., Ohnishi R.*, Clay column chromatography for optical resolution: initial resolution of bis(acetylacetonato)(glycinato)cobalt(III) and (acetylacetonato)bis(glycinato)cobalt(III) on a Δ -tris(1,10-phenanthroline)nickel(II)-montmorillonite column, *Inorg. Chem.*, **21**, 4233 (1982).
256. *Yamagishi A.*, Partial resolution of tris(acetylacetonato)-ruthenium(III) on a liquid chromatography column of Δ -tris(1,10-phenanthroline)nickel(II) montmorillonite, *Chem. Commun.*, **1981**, 1168.
257. *Yamagishi A.*, Chirality recognition of a clay surface modified by an optically active metal chelate, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1983**, 679.

258. *Yamagishi A., Ohnishi R.*, Clay column chromatography for optical resolution — partial resolution of tris(acetylacetonato)metal(III) on a λ -tris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) montmorillonite column, *J. Chromatogr.*, **245**, 213 (1982).
259. *Yamagishi A.*, Clay as a medium for optical resolution — resolution of 2,3-dihydro-2-methyl-5,6-diphenylpyrazine on a λ -[Ru(phen)₃]²⁺(phen-1,10-phenanthroline) montmorillonite column, *Chem. Commun.*, **1983**, 9.
260. *Yamagishi A., Ohnishi R.*, Chromatographic separation of enantiomers of cyclic organic compounds on a λ -tris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) montmorillonite column, *Angew. Chem.*, **95**, 158 (1983).
261. *Yamagishi A.*, Clay column chromatography for optical resolution of tris(chelated) and bis(chelated) complexes on a λ -Ru-(1,10-phenanthroline)₃²⁺ montmorillonite column, *J. Chromatogr.*, **262**, 41 (1983).
262. *Yamagishi A.*, Chromatographic resolution of enantiomers having aromatic groups by an optically active clay-chelate adduct, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 732 (1985).
263. *Yamagishi A.*, Clay column chromatography for optical resolution. Resolution of aromatic compounds on a λ -Ru(1,10-phenanthroline)₃²⁺-montmorillonite column, *J. Chromatogr.*, **319**, 299 (1985).
264. *Yamamoto M., Iwamoto E., Kozasa A., Takemoto K., Yamamoto Y., Tatehara A.*, Partial resolution of Co(acac)₃ by salting-in chromatography on SP-Sephadex in Δ -[Ni(phen)₃]²⁺ form, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **16**, 71 (1980).
265. *Fujita M., Yoshikawa Y., Yamatera H.*, Preparation of optically active cation exchangers with L-tartrate groups and its application to the resolution of [Co(en)₃]³⁺ ion, *Chem. Lett.*, **1974**, 1515.
266. *Fujita M., Yoshikawa Y., Yamatera H.*, Enantiomers of tris(trimethylenediamine)cobalt(III) ion of 100% optical purity — preparation and circular dichroism study, *Chem. Commun.*, **1975**, 941.
267. *Fujita M., Sakano M., Yoshikawa Y., Yamatera H.*, Preparation of Sephadex derivatives with optically active groups and column chromatographic application to the resolution of some cobalt(III) complexes, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 3211 (1981).
268. *Carunchio V., Messina A., Sinibaldi M., Corradini D.*, Outer sphere ligand exchange chromatography on bonded chiral silica gel, *J. Liq. Chromatogr.*, **5**, 819 (1982).
269. *Yamazaki S., Yoneda H.*, Chromatographic study of optical resolution. IV. Complete resolution of the neutral complex, meridional isomer of tris(β -alaninato)cobalt(III), *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **15**, 195 (1979).
270. *Yukimoto T., Yoneda H.*, Chromatographic study of optical resolution. VI. Separation of isomers of facial tris(aminoacidato) mixed ligand chelates with *d*-tartrate and antimony *d*-tartrate adsorbed on an anion exchange resin, *J. Chromatogr.*, **210**, 477 (1981).
271. *Okamoto Y., Honda S., Yashima E., Yuki H.*, Chromatographic resolution. V. Complete chromatographic resolution of tris(acetylacetonato)-cobalt(III) and -chromium(III) on an optically active poly(triphenylmethylmethacrylate) column, *Chem. Lett.*, **1983**, 1221.
272. *Okamoto Y., Yashima E., Hatada K.*, Chromatographic resolution of tris(acetylacetonato)aluminum on an optically active poly(triphenylmethylmethacrylate) column, *Chem. Commun.*, **1984**, 1051.
273. *Yoshikawa Y., Yamasaki K.*, Chromatographic resolution of metal complexes on Sephadex ion exchangers, *Coord. Chem. Rev.*, **28**, 205 (1979).
274. *Ogino K., Saito U.*, Association involving optically active ions. I. Association constants of tris(ethylenediamine) cobalt(III) and tartrate ions, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40**, 826 (1967).
275. *Yoneda H.*, Stereochemical aspects of optical resolution of octahedral metal chelates by liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, **2**, 1157 (1979).

276. *Yoneda H., Yamazaki S., Yukimoto T.*, Optical resolution of facial and meridional tris(aminoacidato) cobalt(III) chelates by *d*-tartrate and antimony *d*-tartrate, in Stereochemistry of Optically Active Transition Metal Compounds, American Chemical Society Symp. Ser. No. 119, Douglas B. E., Saito Y. (eds.), 1980, 315.
277. *Yamazaki S., Yukimoto T., Yoneda H.*, Chromatographic study of optical resolution. III. Separation of isomers of facial tris(amino-acidato) cobalt(III) complexes with *d*-tartrate and antimony *d*-tartrate solutions, *J. Chromatogr.*, **175**, 317 (1979).
278. *Sakaguchi U., Tsuge A., Yoneda H.*, Chiral recognition in solution. V. Circular dichroism study of the chiral interaction between bis(tartrato)diantimonate(III) ions and trigonal hexanitrido cobalt(3+) $\text{Co}(\text{N})_6$ complexes in solution, *Inorg. Chem.*, **22**, 3745 (1983).
279. *Nakazawa H., Yoneda H.*, Chromatographic study of optical resolution. II. Separation of optically active cobalt(III) complexes using potassium antimony *d*-tartrate as eluent, *J. Chromatogr.*, **160**, 89 (1978).
280. *Kobayashi K., Shibata M.*, Ion exchange chromatographic studies of the $[\text{Co}(\text{N})_4(\text{O})_2]^+$ type complexes, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**, 2561 (1975).
281. *Searle G. H.*, The role of ion association in the chromatographic separation of isomeric cationic cobalt(III) amine complexes on cation exchange resins, particularly SP-Sephadex, *Aust. J. Chem.*, **30**, 2625 (1977).
282. *Miyoshi K., Oh C. E., Nakazawa H., Yoneda H.*, Induced circular dichroism spectra of some achiral and racemic cobalt(III) amine complexes in aqueous (R,R)-tartrate and (R,R)-tartrateantimonate(III) solution, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51**, 2946 (1978).
283. *Nakazawa H., Oh C. E., Miyoshi K., Yoneda H.*, Induced circular dichroism spectra of some racemic cis-bis-(ethylenediamine) cobalt(III) complexes in aqueous (R,R)-tartrate and (R,R)-tartrateantimonate(III) solution and their optical resolution by ion exchange chromatography, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 273 (1980).
284. *Taura T., Tamada H., Yoneda H.*, Stereoselectivity in ion pair formation. IV. Stereochemical consideration about specific ion association between optically active (amino acidato) bis(ethylenediamine) cobalt(III) and tartrate ions, *Inorg. Chem.*, **17**, 3127 (1978).
285. *Yoneda H., Yoshizawa T.*, Chromatographic study of optical resolution. I. Complete resolution of the neutral complex, facial isomer of tris(β -alaninato) cobalt(III), *Chem. Lett.*, **1976**, 707.
286. *Yamazaki S., Yoneda H.*, Chromatographic study of optical resolution. V. Resolution of cis-diaziodobis(ethylenediamine) and cis- α -diazido(triethylenetetramine) cobalt(III) complexes by antimony *d*-tartrate, *J. Chromatogr.*, **177**, 227 (1979).
287. *Nakazawa H., Sakaguchi U., Yoneda H.*, Chromatographic study of optical resolution. VII. Directional ion association for the optical resolution of cis- $[\text{Co}(\text{O})_2(\text{N})_4]^+$ type of complexes by the antimony *d*-tartrate ion, *J. Chromatogr.*, **213**, 323 (1981).
288. *Yamanari K., Hidaka J., Shimura Y.*, Stereochemistry of cobalt(III) complexes with thioethers. II. Geometrical isomers, absorption, and circular dichroism spectra of bis(tetradentate-N,S,O) complexes, *Bull. Soc. Chem. Jpn.*, **59**, 2643 (1977).
289. *Fujinami S., Tsuji K., Minegishi K., Shibata M.*, Synthesis and circular dichroism spectra of mer(N)-cis-(NH_3)- $[\text{Co}(\text{OO})(\text{NH}_3)(\text{py})(\text{H}_2\text{O})^+]$ and mer(N)- $[\text{Co}(\text{OO})(\text{en})(\text{py})(\text{H}_2\text{O})^+]$ complexes, *Bull. Soc. Chem. Jpn.*, **55**, 1319 (1982).
290. *Sakaguchi U., Imamoto I., Izumoto S., Yoneda H.*, The mode of stereoselective association between complex cation and complex anion, *Bull. Soc. Chem. Jpn.*, **56**, 153 (1983).
291. *Sakaguchi U., Yamamoto I., Izumoto S., Yoneda H.*, Inversion of the reten-

- tion volume order of enantiomers caused by the concentration of eluent, *Bull. Soc. Chem. Jpn.*, **56**, 1407 (1983).
292. *Izumoto S., Sakaguchi U., Yoneda H.*, Stereochemical aspects of the optical resolution of cis(N)- $[\text{Co}(\text{N})_2(\text{O})_4]^-$ complexes by reversed phase ion pair chromatography with cinchona alkaloid cations as the ion pairing reagents, *Bull. Soc. Chem. Jpn.*, **56**, 1646 (1983).
293. *Yoneda H.*, Mechanism of chromatographic separation of optically active metal complexes, *J. Chromatogr.*, **313**, 59 (1984).
294. *Yamazaki S., Yoneda H.*, Chromatographic study of optical resolution. VIII. Theoretical study of the chromatographic behavior of the enantiomers of racemic complex cations on a cation exchange column, *J. Chromatogr.*, **219**, 29 (1981).
295. *Yamazaki S., Yoneda H.*, Chromatographic study of optical resolution. IX. Optical resolution of monovalent complex cations on an anion exchange column, *J. Chromatogr.*, **235**, 289 (1982).
296. *Hewkin D. J., Prince R. H.*, The mechanism of octahedral complex formation by labile metal ions, *Coord. Chem. Rev.*, **5**, 45 (1970).
297. *Yoneda H., Baba T.*, Studies of thin layer chromatography of inorganic salts. V. Resolution of the racemic tris-ethylene-diamine-cobalt(III) complex by means of thin layer chromatography on silica gel, *J. Chromatogr.*, **53**, 610 (1970).
298. *Yoneda H., Miura T.*, Complete resolution of the racemic tris-ethylenediaminecobalt(III) complex into its optical antipodes by means of electrophoresis, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **43**, 574 (1970).
299. *Yoneda H., Miura T.*, Study of hydration and association of ions in solution. II. Complete resolution of tris(ethylenediamine) cobalt(III), chromium(III), and rhodium(III) complexes by means of paper electrophoresis, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **45**, 2126 (1972).
300. *Corradini C., Lederer M.*, Separation of optical isomers of metal complexes by paper electrophoresis in mixtures of aluminium chloride and tartrate, *J. Chromatogr.*, **157**, 455 (1978).
301. *Cardaci V., Ossicini L.*, Paper electrophoretic study of ion pair formations. XIII. Behavior of anionic trisoxalatocobalt(III) and trisoxalatochromium(III) in optically active electrolytes, *J. Chromatogr.*, **198**, 76 (1980).
302. *Fanali S., Cardaci V., Ossicini L.*, Paper electrophoretic study of ion pair formation. XIV. Resolution of optically active cobalt(III) complexes, *J. Chromatogr.*, **265**, 131 (1983).
303. *Fanali S., Ossicini L., Prosperi T.*, Paper electrophoretic study of ion pair formation. XV. Resolution of optically active cobalt(III)cyclohexanediamine complexes, *J. Chromatogr.*, **318**, 440 (1985).
304. *Schurig V.*, Enantiomerentrennung eines chiralen Olefins durch Komplexbildungschromatographie an einem optisch aktiven Rhodium(I) Komplex, *Angew. Chem.*, **89**, 113 (1977).
305. *Schurig V., Gil-Av E.*, Chromatographic resolution of chiral olefins — specific rotation of 3-methylcyclopentene and related compounds, *Isr. J. Chem.*, **15**, 96 (1976/77).
306. *Schurig V.*, Selektivität und Stereochemie der Olefin-Metall- π -Komplexbildung, *Chem. Ztg.*, **101**, 173 (1977).
307. *Schurig V.*, Resolution of enantiomers and isotopic compounds by selective complexation gas chromatography on metal complexes, *Chromatographia*, **13**, 263 (1980).
308. *Golding B. T., Sellars P. J., Wong A. K.*, Resolution of racemic epoxides on G.L.C. columns containing optically active lanthanoid complexes, *Chem. Commun.*, **1977**, 570.
309. *Schurig V., Bürkle W.*, Quantitative Enantiomerentrennung von trans-2,3-Epoxybutan durch Komplexbildungschromatographie an einem optisch aktiven Nickel(II)-Komplex, *Angew. Chem.*, **90**, 132 (1978).

310. Schurig V., Koppenhöfer B., Bürkle W., Korrelation der absoluten Konfiguration chiraler Epoxide durch Komplexierungschromatographie; Synthese und Enantiomerenreinheit von (+)- und (-)-1,2-Epoxypropan, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **17**, 937, 1978; *Angew. Chem.*, **90**, 993 (1978).
311. Schurig V., Wistuba D., Asymmetric microsomal epoxidation of simple prochiral olefines, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **23**, 796 (1984).
312. Weber R., Schurig V., Analytical resolution of Lineatin by complexation gas chromatography, *Naturwissenschaften*, **68**, 330 (1981).
313. Schurig V., Weber R., Klimetzek D., Kohnle U., Mori K., Enantiomeric composition of «Lineatin» in three sympatric ambrosia beetles, *Naturwissenschaften*, **69**, 602 (1982).
314. Koppenhöfer B., Hintzer K., Weber R., Schurig V., Quantitative separation of the enantiomeric pairs of the pheromone 2-ethyl-1,6-dioxaspiro[4.4]nonane by complexation chromatography on an optically active metal complex, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 471 (1980).
315. Weber R., Hintzer K., Schurig V., Enantiomer resolution of spiroketales by complexation gas chromatography on an optically active metal complex, *Naturwissenschaften*, **67**, 453 (1980).
316. Schurig V., Weber R., Manganese(II)-bis(3-heptafluorobutyryl-1R-camphorate) — a versatile agent for the resolution of racemic cyclic ethers by complexation gas chromatography, *J. Chromatogr.*, **217**, 51 (1981).
317. Schurig V., Weber R., Nicholson G. J., Oehlschlager A. C., Pierce, Jr., H., Pierce A. M., Borden J. H., Ryker L. C., Enantiomer composition of natural exo- and endo-brevicomin by complexation gas chromatography/selected ion mass spectrometry, *Naturwissenschaften*, **70**, 92 (1983).
318. Schurig V., Koppenhöfer B., Bürkle W., Preparation and determination of configurationally pure trans-(2S,3S)-2,3-epoxybutane, *J. Org. Chem.*, **45**, 538 (1980).
319. Hintzer K., Koppenhöfer B., Schurig V., Access to (S)-2-methyloxetane and the precursor (S)-1,3-butane-diol of high enantiomeric purity, *J. Org. Chem.*, **47**, 3850 (1982).
320. Schurig V., Bürkle W., Extending the scope of enantiomer resolution by complexation gas chromatography, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7573 (1982).
321. Schurig V., Bürkle W., Zlatkis A., Poole C. F., Quantitative resolution of pyrimidal nitrogen invertomers by complexation chromatography, *Naturwissenschaften*, **66**, 423 (1979).
322. Bürkle W., Karfunkel H., Schurig V., Dynamic phenomena during enantiomeric resolution by complexation gas chromatography — a kinetic study of enantiomerisation, *J. Chromatogr.*, **288**, 1 (1984).
323. Schurig V., Wistuba D., Analytical enantiomer separation of aliphatic diols as boronates and acetates by complexation gas chromatography, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 5633 (1984).
324. Schurig V., Homogeneous coating of glass and fused silica capillary columns with metal coordination compounds for the selective gas chromatographic separation of structural, stereo- and optical-isomers, пат. ФРГ DE 3247714; *C. A.*, **100**, 79243w (1984).
325. Schurig V., Weber R., Use of glass and fused-silica open tubular columns for the separation of structural, configurational, and optical isomers, *J. Chromatogr.*, **289**, 321 (1984).
326. Schurig V., Weber R., Derivatization free enantiomer separation of chiral alcohols and ketones by high resolution complexation gas chromatography, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **22**, 772, 1983; *Angew. Chem. Suppl.*, **1983**, 1130.
327. Schurig V., Leyrer U., Weber R., The use of glass and fused silica open tubular columns for the separation of structural, configurational and optical

- isomers by selective complexation GC, in *Proc. 6th Int. Symp. on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, Italy, May 1985, 18.
328. Oi N., Horiba M., Kitahara H., Doi T., Tani T., Sakakibara T., Direct separation of α -hydroxycarboxylic acid ester enantiomers by gas chromatography with optically active copper(II) complexes, *J. Chromatogr.*, **202**, 305 (1980).
329. Oi N., Horiba M., Kitahara H., Doi T., Tani T., Gas chromatographic separation of some optical isomers on optically active copper complexes, *Bunseki Kagaku*, **29**, 156 (1980).
330. Oi N., Shiba K., Tani T., Kitahara H., Doi T., Gas chromatographic separation of some enantiomers on optically active copper(II) complexes, *J. Chromatogr.*, **211**, 274 (1981).
331. Oi N., Doi T., Kitahara H., Inda Y., Direct separation of some alcohol enantiomers by gas chromatography with optically active stationary phases, *Bunseki Kagaku*, **30**, 78 (1981).
332. König W. A., Separation of enantiomers by capillary gas chromatography with chiral stationary phases, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **5**, 588 (1982).

ЛИГАНДЫ, НЕ СОДЕРЖАЩИЕ АЗОТА

Х. Уолтон

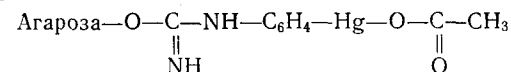
6.1. Серусодержащие лиганды

Сера со степенью окисления +2 является донором электронов, «мягким основанием», которое преимущественно соединяется с «мягкими кислотами» — ионами или связанными атомами меди, серебра, цинка, кадмия и ртути. Тиолы — это органические соединения с группами —RH, известные как «меркаптаны» за их сродство к ртути.

Широкое распространение получило использование катионообменных смол, заряженных ртутью(II) для сорбции соединений серы из нефти [1]. Поскольку обычные смолы гелевого типа не набухают в неполярной среде, применяют макропористые смолы, которые эффективно сорбируют соединения серы, удерживая эти соединения настолько прочно, что их не удается удалить с сорбента. Медь(II) в фазе акриловой смолы био-рекс 70 сорбирует арил- и алкилсульфиды из углеводородных смесей, но не настолько сильно, чтобы их нельзя было удалить. Вог и Дулей [2] пропускали сырую нефть через небольшую колонку размером 260×9 мм, заполненную этим заряженным медью сорбентом, а элюирование проводили *n*-пентаном. Первыми выходили алифатические углеводороды, затем ароматические углеводороды и, наконец, в виде широкой зоны серусодержащие соединения, большинство из которых относится к дисульфидам или циклическим соединениям серы. Был отмечен хорошо известный стерический эффект: алкильные заместители, связанные с атомом серы, затрудняли удерживание аналогично связанным с атомом азота заместителям, затрудняющим удерживание аминов. Элюируемые зоны были очень широкими, как и можно было ожидать на основании физико-химических свойств применяемых смол, что делало невозможным последующий анализ сульфидных фракций жидкостной хроматографией. Авторам тем не менее удалось отделить фракцию ароматических соединений от фракции сульфидов, элюируя последнюю смесью пентана (90%) и диэтилового эфира (10%). Каждую фракцию затем анализировали с помощью газовой хроматографии.

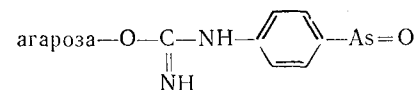
В биохимической литературе появились сообщения о разделении тиолов и дитиолов с помощью «аффинной хроматографии». Слуитерман и Виджнес [3] приготовили сорбент на осно-

ве полисахарида, заряженного ртутью; для этого агарозу обрабатывали бромцианом, а затем полученный продукт — *n*-ацетоксимеркуранилином $\text{CH}_3\text{COOHg}-\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$, в результате чего получался продукт структуры:

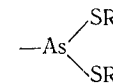


На колонке с этим сорбентом фермент папаин был разделен на две фракции, одна из которых была обогащена сульфгидрильными (тиольными, —SH) группами и элюировалась раствором хлорида ртути.

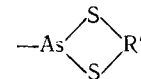
Недостаток этого сорбента состоит в том, что соединения, содержащие тиольные группы, приходилось элюировать солями ртути или другими тиолами. Для выделения тиольных фракций в флавинадениннуклеотиде и коферменте А использовали элюирование с 2-меркаптоэтанолом [4]. Чтобы улучшить эту методику, шведские исследователи [5] применяли сорбент, содержащий мышьяк, полученный из агарозы реакцией с бромцианом с последующей обработкой оксидом *n*-аминофениларсина; полученный ими продукт имел структуру:



Это соединение связывает монотиолы, образуя



и дитиолы, образуя

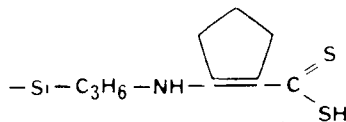


Монотиолы вытесняют 0,01 М раствором едкого натра, а дитиолы — 0,2 М раствором едкого натра.

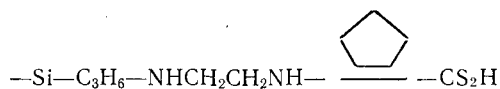
Химопапаин был отделен от папаинового латекса хроматографированием на полистирольной смоле, сульфированной обычным способом и в незначительной степени заряженной ртутью. В качестве элюента использовали аммиачно-ацетатный раствор [6].

Для высокоэффективной лигандообменной хроматографии органических серусодержащих соединений нужны эффективные неподвижные фазы, которые можно использовать в неполярных растворителях. Такие материалы уже синтезированы на основе силикагеля [7]. Один из них содержит привитые 8-мер-

каптохинолиновые функциональные группы, а другой — группы дитиокарбоновой кислоты —CSSH. Так, например, при взаимодействии 2-амино-1-циклопентен-1-дитиокарбоновой кислоты с силикагелем, на поверхности которого находятся пропиламиногруппы, образуется



Между пропильной и аминциклопентеновыми группами можно ввести мостиковую группу —NHCH₂CH₂—, получив



затем сорбент насыщают медью (II). На короткой колонке размером 200×4 мм с этим сорбентом было достигнуто быстрое и эффективное разделение диалкилсульфидов. В качестве элюента использовали *n*-гексан с добавкой 0,5—2,0% полярного модификатора, например метанола или ацетонитрила; детектирование проводили по УФ-поглощению при 230 нм. За 8 мин были разделены практически полностью шесть компонентов (рис. 6.1). Коэффициенты емкости были обратно пропорциональны содержанию метанола, т. е. одна молекула метанола вытесняет по лигандообменному механизму одну молекулу диалкилсульфида.

Авторы работы [7] привели данные о коэффициентах емкости для 17 веществ на четырех неподвижных фазах, часть из которых содержала медь. Анализ данных показывает важную роль стерических затруднений в удерживании. Сорбент с мостиковыми группами —NHCH₂CH₂—, который может связываться с медью по трем из четырех координационных связей, удерживает простые диалкилсульфиды с возрастающей интенсивностью в ряду: ди-*трет*-бутилсульфид < ди-*n*-бутил < ди-*n*-пропил < диэтил < диметил < тетрагидротиофен; последний удерживается сильнее всех других. Первый член этого ряда наиболее стерически затруднен и удерживается слабее других.

Авторы этой работы использовали также неподвижную фазу, заряженную серебром, а в качестве элюента — метанол. Ими было получено хорошее разделение, но порядок элюирования оказался обратным наблюдаемому при использовании меди и гексана, что указывает на доминирование сольватации или «гидрофобного взаимодействия».

В гл. 2 мы описали работу Скороход и Варравы [8], в которой указывалось, что в ряде случаев комплексы металл — тиомочевина в фазе катионообменной смолы намного стабильнее, чем в растворе, другими словами, что взаимодействие лиганда и матрицы смолы играет очень важную роль. Еще более сильные эффекты наблюдались на алюмосиликатных ионообменниках. Следует помнить, что взаимодействие металл — лиганд в ионообменнике имеет очень сложный характер и определяется не только образованием связи металл — лиганд.

6.2. Кислородсодержащие лиганды

6.2.1. Углеводы и полигидроксисоединения

В современной лигандообменной хроматографии наиболее важными кислородсодержащими лигандами являются углеводы. Действительно, из всех применений лигандообменной хроматографии второе место после аминокислот занимают сахара и другие углеводы, упоминаемые наиболее часто.

Сахара и сахариды можно анализировать с помощью жидкостной колонной хроматографии несколькими различными способами. Хонда [9] опубликовал подробный обзор, в котором значительное место уделено олигосахаридам. Здесь мы приведем краткий обзор, представляющий интерес для химиков, занимающихся анализом смесей углеводов, а затем более детально опишем методики проведения лигандного обмена.

В настоящее время используются следующие сочетания неподвижных и подвижных фаз:

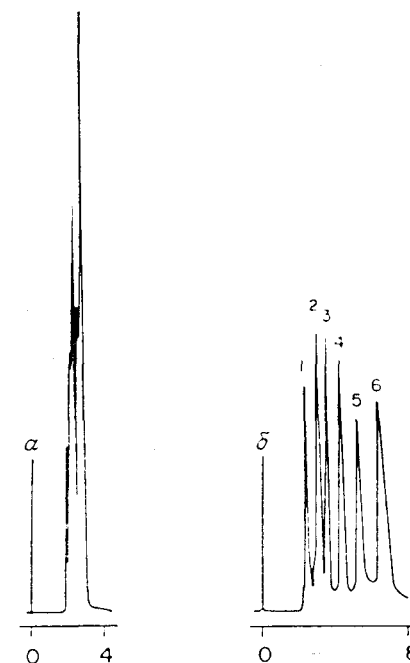


Рис. 6.1. Хроматограммы диалкилсульфидов на связанной 2-амино-1-циклопентен-1-карбодитионой кислоте. В молекуле сорбента имеется мостиковая группа; формула циклопентена дана в тексте [а — без меди; б — с медью (II)]. Порядок пиков на хроматограмме б следующий: ди-*n*-гексилсульфид; ди-*n*-пропилсульфид, этил-*n*-пропилсульфид, диэтилсульфид и тетрагидротиофен (элюируется последним) [7].

1. Колонка, заполненная силикагелем с привитыми аминогруппами (иногда цианогруппами), в качестве элюента смесь вода — ацетонитрил [10—15]. Объемное содержание ацетонитрила колеблется от 50 до 85%. Основной механизм удерживания, по-видимому, состоит в образовании водородных связей [12]. Повышение содержания воды в элюенте снижает удерживание. Получены хорошие коэффициенты разделения; олигосахариды удерживаются тем сильнее, чем больше их молекулярный вес.

2. Колонка с сильноосновной анионообменной смолой обычно низкой емкости с поверхностными функциональными группами; в качестве элюента 0,15 М водный раствор едкого натра. В такой среде сахара депротонируются, образуя анионы, которые разделяются на анионообменнике [16]. Высокая чувствительность (на микрограммовом уровне) обеспечивается с помощью импульсного амперометрического детектора; метод экспрессный; смесь обычных моно- и дисахаридов разделяется менее чем за 10 мин. Олигосахариды хорошо разрешены, причем удерживание тем сильнее, чем выше молекулярный вес. Возможно разложение веществ в колонке [17].

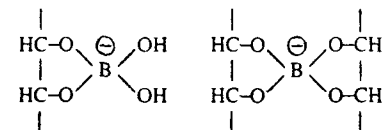
3. Колонка высокой емкости с ионообменной смолой гелевого или макропористого типа, которая может быть анионо- или катионообменником. Элюент — смесь воды с этанолом с концентрацией последнего от 75 до 95%. Чем выше содержание спирта, тем сильнее удерживание. Механизм разделения распределительный; в фазе сорбента содержание воды больше чем в элюенте, а сахара лучше растворяются в воде, чем в спирте, вследствие образования водородных связей [18]. Наилучшие результаты получены на сильноосновной анионообменной смоле в сульфатной форме. Влияние противоиона в распределительной хроматографии на катионообменных смолах описано в гл. 2 (разд. 2.3); K^+ обеспечивает более сильное удерживание сахара, чем Na^+ , в то время как Na^+ дает более сильное удерживание, чем Li^+ .

Высокую чувствительность (на микрограммовом уровне) можно получить путем дериватизации углевода после выхода его из колонки, но по сравнению с новыми методиками этот способ более сложный и медленный.

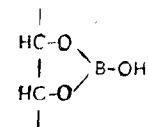
4. Колонка с сильноосновным анионообменником в боратной форме с водным раствором бората в качестве элюента.

Этот метод основан на образовании и анионном обмене сахар-боратных комплексов анионов и имеет что-то общее с лигандным обменом. Он не подходит под определение лигандообменной хроматографии, сформулированное в гл. 1, поскольку в нем отсутствует ион металла, но в этом методе происходит образование и диссоциация комплексов незаряженных органи-

ческих лигандов с неорганическими ионами [19]. Циклические комплексы, образующиеся из борат-ионов и *цис*-1,2-диолю, имеют структуру [20]



Соответствующие этим анионам кислоты намного сильнее борной кислоты, что позволяет титровать борную кислоту после добавления маннита. Нейтральные комплексы борной кислоты с 1,2-диолю



очень нестабильны, но нейтральные комплексы 1,3-диолю образуются, и их можно экстрагировать из водных растворов [21].

О константах устойчивости этих комплексов известно очень мало, в особенности комплексов, содержащих сахара или многоатомные спирты. Возможно, сложность борат-ионов в водных растворах обескуражит исследователей или поставит в тупик многообразием путей ассоциации с сахарами и полиолами. Комплекс этиленгликоля с борат-ионом (1:1) характеризуется константой образования, равной 1,0 л/моль [20]; комплекс глюкозы и маннита (2:1), как было найдено, имеет общие константы образования β_2 , равные соответственно $1,9 \cdot 10^2$ и $1,4 \cdot 10^5$ [21]. В анионообменной хроматографии боратных комплексов, концентрация борат-ионов выше в фазе ионообменника, чем в элюенте, и можно ожидать, что сахара и полиолы будут удерживаться тем сильнее, чем прочнее их боратные комплексы. Ларсон и Самуэльсон [23] выявили аналогию между удерживаемыми объемами сахаров и их электрофоретической подвижностью в боратных растворах, но эта аналогия не точна. Даже когда маннит образует боратный комплекс 2:1, который в 700 раз стабильнее комплекса с глюкозой (см. выше), различие в удерживании незначительно. Сорбит, глюкоза и маннит последовательно элюируются с анионообменника боратным буфером [24]. Таким образом, даже если известны константы устойчивости комплексов, то они мало что дают для определения порядка элюирования.

Обычно в качестве элюента используют растворы с концентрацией бората 0,1—0,5 М и рН 7—9. Удерживание снижается при повышении рН и концентрации бората [25, 29]. Объемы

элюирования изменяются в широких пределах, в связи с чем часто применяют градиентное элюирование. В отличие от привитых аминофаз, чьи свойства ухудшаются при повторном использовании, смолы, применяемые в боратном методе, стабильны, поэтому боратный метод легко автоматизировать [9, 24—29], однако из-за отсутствия универсального детектора трудно разработать общий метод для всех углеводов. Рефрактометр нельзя использовать в градиентных системах, так как в ряде случаев он не обладает достаточно хорошей чувствительностью. При использовании боратного элюента после колонки часто проводят специфические реакции с элюатом, причем многие из используемых реагентов вступают во взаимодействие только с восстанавливающими сахарами; следовательно, условия элюирования должны соответствовать методу детектирования.

В типичной изократической методике, разработанной для восстанавливающих моно- и дисахаридов, используют колонку размером 75×6 мм, заполненную сильноосновной смолой с диаметром частиц 10 мкм при температуре 50 °С (при более высокой температуре происходит медленное разложение смолы); расход элюента 0,4 М раствора бората с рН 8,0 составляет 40 мл/ч [26]. Соединения выходят из колонки в следующем порядке (в скобках указано время удерживания в минутах): 2-дезоксирибоза (7), мальтоза (8,8), лактоза (9,3), рибоза (14,4), ликсоза (14,8), манноза (18,6), фруктоза (25,0), арабиноза (26,3), галактоза (30,3), ксилоза (40,1), сорбоза (41,3) и глюкоза (55,2). Детектирование проводили восстановлением бидинхонината меди(II) до пурпурного комплекса меди(I), поглощение которого измеряли при 570 нм; таким способом легко определяли микрограммовые количества сахаров.

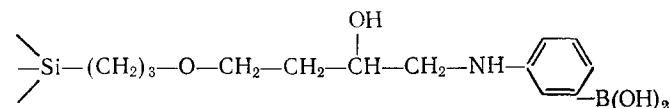
Такая же последовательность элюирования наблюдалась в градиентной системе, которая обычно обеспечивает лучшее разрешение за более короткое время. В одной из градиентных систем используются три буфера [30]: первый—0,13 М раствор бората калия с рН 7,5, второй—0,25 М раствор бората калия с рН 9,1, третий—0,35 М раствор этого же бората с рН 9,6. Применяли ступенчатый и непрерывный варианты градиентного элюирования; полный цикл анализа, завершавшийся выходом глюкозы, занимает 5,5 ч. Большую длительность анализа можно, вероятно, объяснить использованием смолы гелевого типа вместо смолы с поверхностными функциональными группами. Для детектирования применяли орсинол; сахароза и целлобиоза выходили перед мальтозой, фруктоза элюируется между арабинозой и галактозой.

Хонда и др. [29] дали подробное описание автоматизированной системы для анализа углеводов, в которой предусмотрены изократический режим, ступенчатое или непрерывное гра-

диентное элюирование. В ступенчатом варианте используют три раствора: 0,2 М раствор бората при рН 7,4, 0,35 М раствор бората при рН 7,7 и 0,50 М раствор бората при рН 9,2. Непрерывное градиентное элюирование обеспечивает лучшее разрешение за счет усложнения методики. Ступенчатое градиентное элюирование проводили на колонке размером 150×4 мм со специально приготовленной сильноосновной анионообменной смолой с диаметром частиц 11 мкм (хитачи 2633) при температуре 65 °С и расходе элюента 0,5 мл/мин. Для обнаружения использовали реакцию восстанавливающих сахаров с 2-цианацетамидом при 100 °С и рН 10,5, которая приводила к образованию продукта, поглощающего при 276 нм с последующей флуоресценцией, что обеспечивало низкий предел обнаружения (приблизительно 0,1 нмоль или 20 нг моносахарида). Глюкоза, последний из элюируемых сахаров, выходила из колонки через 90 мин после начала анализа. В отличие от аминофазы анионообменник в боратной форме удерживает дисахариды слабее моносахаридов, а трисахариды еще слабее [27].

Для детектирования в боратных элюентах можно также использовать этилендиамин [31] и иодную кислоту [24, 32]; последняя позволяет проводить обнаружение сахарных спиртов, таких как маннит и сорбит, а также альдозы и кетозы.

К интересным вариантам анионного обмена боратных комплексов относится применение модифицированных силикагелей с боратными функциональными группами [33]:



В качестве элюента используют 0,01 М раствор пирофосфата натрия с последующим рефрактометрическим детектированием. Порядок элюирования здесь совершенно иной, чем при анионном обмене боратных комплексов: глюкоза удерживается очень слабо, затем выходят сахароза и галактоза. Фруктоза удерживается достаточно прочно, маннит и сорбит еще сильнее.

5. Катионообменные смолы с некомплексообразующим противоионом. Мы уже отмечали, что неионизирующиеся органические соединения распределяются между водой и набухшей ионообменной смолой под действием по меньшей мере двух механизмов (гл. 2, разд. 2.3). Один из них представляет собой неполярное или обменное взаимодействие между неполярными углеродными цепями органических молекул и полистирольным каркасом смолы. Если органические вещества имеют ароматическую структуру, это взаимодействие дополняется перекрыванием π -электронов. Другой механизм состоит в образовании во-

дородных связей между полярными группами, особенно —ОН-группами органических молекул и молекулами воды как внутри, так и снаружи смолы. Первое взаимодействие способствует проникновению органических молекул в фазу смолы, второе — выходу разделяемых молекул из смолы, поскольку в фазе элюента больше возможностей для образования водородных связей. На эти взаимодействия влияет степень гидратации неорганического противоиона.

Молекулы сахаров с многочисленными гидроксильными группами стремятся остаться в элюенте; так, было найдено, что соотношение между количеством воды и сахара в фазе сорбента меньше, чем в элюенте. В результате сравнения противоионов Li^+ , Na^+ и K^+ в катионообменнике на основе сульфированного полистирола было экспериментально найдено, что катионообменник в Li^+ -форме сорбирует сахара в наименьшей, а катионообменник в K^+ -форме в наибольшей степени. Это различие объясняется большей сольватацией Li^+ , что уменьшает количество молекул воды доступных для образования водородных связей с сахарами.

В 1968 г. Саундерс [34] для разделения сахарозы, глюкозы, ксилозы и фруктозы, а также других сахаров использовал большую колонку с катионообменной смолой (4% шивки) в K^+ -форме и воду в качестве элюента. Сахара выходили из колонки в указанном порядке. Другие исследователи [35] для этих же целей применяли катионообменник в K^+ -форме с мелкими частицами. Недавно Песина и сотр. [36] на колонке размером 300×8 мм с мелкими частицами катионообменника в водородной форме провели разделение не только углеводов и сахарных спиртов, но и короткоцепочечных спиртов, альдегидов, кетонов и карбоновых кислот. В качестве элюента они использовали 0,01 М раствор серной кислоты. Судя по объемам элюирования, сахара элюируются с большими удерживаемыми объемами, чем общий объем воды, учитывая воду в гранулах и между гранул смолы. Молекулы сахаров частично вытесняются из смолы, в то время как менее полярные соединения типа бутанолов, масляного альдегида и фурфуrolа в некоторой степени удерживаются смолой. Гидрофобное взаимодействие с полимерным каркасом оказалось сильнее водородного связывания.

В ходе исследования удерживания сахаров, сахарных спиртов (альдитолей), алифатических спиртов и других соединений на катионообменных смолах в различных ионных формах Уолтон [37] измерял межчастичный мертвый объем, вводя разбавленные растворы соли в водный элюент, и общий объем воды в колонке, вводя оксид дейтерия. Для сахаров (сахарозы, глюкозы, фруктозы, рибозы и др.) и полиолов (глицерина, пентэритрита, маннита и сорбита) характерны удерживаемые объ-

емы, промежуточные между межчастичным мертвым объемом и общим объемом воды или D_2O . Таким образом, эти соединения частично исключены из фазы катионообменника. В любом случае их удерживание сильнее при использовании в качестве противоиона K^+ по сравнению с Li^+ .

При добавлении в элюент органического растворителя, например этанола, метанола или ацетонитрила, удерживание сахаров и полиолов резко возрастает. Ряд исследователей воспользовался этим преимуществом [38—40]. Самуэльсон [18] в своей методике применял элюент, обогащенный этанолом. Причины этого эффекта обсуждались выше.

Для катионообменных смол с противоионами Li^+ , Na^+ , K^+ и H^+ отсутствуют непосредственные указания, что эти ионы взаимодействуют с органическими веществами; их воздействие можно представить просто как ионную гидратацию. При использовании в качестве противоионов Ca^{2+} и La^{3+} отмечалось сильное изменение удерживания, что указывает на координационные взаимодействия. Лигандный обмен в настоящее время является важным механизмом хроматографического разделения [37, 41, 42].

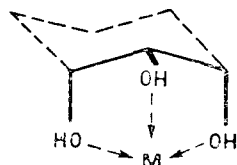
6. Катионообменные смолы с противоионом, образующим координационные комплексы с сахарами.

Гулдинг [41] в 1975 г. опубликовал данные о первом систематическом исследовании хроматографии сахаров и полиолов на катионообменных смолах и влиянии различных катионов на удерживание. Ему нужно было разработать быстрый метод анализа, для того чтобы получать по возможности чистые сахара для тестов на живых организмах. Элюирование боратым раствором дало неудовлетворительные результаты, поэтому в качестве элюента применяли воду. Еще ранее Саундерс [34], успешно использовавший катионообменные смолы в K^+ -форме, разработал простой метод и опубликовал в 1974 г. обзор [43].

Гулдинг на колонке размером 500×3 мм, заполненной катионообменником гелевого типа с размером гранул 11 мкм, проводил элюирование водой при комнатной температуре с последующим рефрактометрическим детектированием. Расход элюента составлял 0,1 мл/мин. Он получил довольно хорошее разделение за 20—40 мин, но при этом оказалось, что разделение α - и β -форм нескольких сахаров было неполным. Позднее было показано [42], что α - и β -формы можно разделить полностью при низкой температуре (3—4 °C), а также подтверждено наблюдение Гулдинга, что смолы в Ca^{2+} -форме дают иной порядок элюирования этих изомеров, чем катионообменные смолы, заряженные щелочными металлами.

Сравнивая различные противоионы, Гулдинг показал, что комплексообразующие катионы Ag^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} и

La^{3+} обеспечивают более сильное удерживание, чем катионы щелочных металлов, что приводит к разрезанию пиков и лучшему разрешению. В основе этих эффектов лежит, по-видимому, координационное взаимодействие между ионами металла и гидроксильными группами сахаров и полиолов, причем удерживание коррелирует со стереохимическими свойствами этих соединений. Соединения с аксиально-экваториально-аксиальной последовательностью гидроксильных групп благоприятствуют образованию тридентатных комплексов



Такие соединения наиболее прочно удерживаются катионообменником в Ca^{2+} -форме. Так, например, из пентоз сильнее всех удерживается рибоза, а из гексоз — талоза и аллоза.

В литературе можно встретить довольно немногочисленные данные об ассоциации сахаров и полиолов с Ca^{2+} и другими катионами. Анджиал и Дэвис [44] и Анджиал [45] для умеренной ассоциации Ca^{2+} и D-аллозы в водном растворе использовали ЯМР. Добавление CaCl_2 к раствору сахара усиливает резонанс α -пиранозной формы, тогда как в присутствии β -пиранозы и двух форм фуранозы резонанс ослабляется. На основании этого был сделан вывод, что α -D-аллопираноза с аксиально-экваториально-аксиальной последовательностью гидроксильных групп образует комплекс с Ca^{2+} с константой устойчивости 6 л/моль и комплекс с La^{3+} с константой устойчивости 10 л/моль, в то время как комплексы с Na^+ и Mg^{2+} , если они и образуются, имеют константы устойчивости менее 0,1 л/моль. В растворах Ca^{2+} с глюкозой, маннозой или арабинозой признаки образования комплекса отсутствуют.

Используя ион-селективные электроды, были найдены константы устойчивости комплексов свинца с рибозой, ксилозой и арабинозой, составлявшие соответственно 1,9, 0,4 и 0,4 л/моль, в то время как константа устойчивости комплекса рибозы с Ca^{2+} равна 1,6 л/моль [46]. Аналогичное значение было найдено и другими исследователями [47], которые также отмечали, что ксилоза не образует комплекса с кальцием. Электрофоретическая подвижность сахаров в растворе ацетата кальция, дающая приблизительное представление о прочности комплексов, показывает, что рибоза выделяется среди других сахаров как гексоз, так и пентоз своей высокой подвижностью, что указывает на стабильность ее комплекса с ионами кальция

[48]. Как уже было показано, рибоза выделяется среди других сахаров прочностью удерживания на катионообменных колонках в Ca^{2+} -форме [37, 42, 47].

В ходе исследования влияния маннита и сорбита на растворимость сульфата кальция было найдено, что эти лиганды образуют с Ca^{2+} комплексы с константами 0,7 и 1,2 л/моль соответственно [37]. Эти константы устойчивости малы по сравнению с константами устойчивости комплексов аминов и аминокислот с металлами. Соответствующее хроматографическое удерживание было также мало, но достаточно для хорошего разрешения на эффективных колонках. Слабое удерживание позволяет проводить быстрый анализ, сравнимый с анионным обменом боратных комплексов.

В настоящее время опубликованы результаты многих исследований хроматографического разделения сахаров и полиолов на катионообменных смолах, заряженных кальцием. Как мы уже показали, этот способ хроматографирования является одним из наиболее популярных приложений лигандообменной хроматографии*. Применяемые в нем условия эксперимента можно суммировать следующим образом.

Сорбент обычно представляет собой смолу гелевого типа с размерами частиц 10 мкм и менее. Фитт и сотр. [49] отмечали, что лучшие результаты были получены для смолы со степенью сшивки 4%, хотя смола со степенью сшивки 6 и 8% также давала довольно хорошие результаты. Напротив, Хонда и сотр. [42] в своих экспериментах использовали сильносшитые смолы. Большинство авторов удовлетворялись одной из коммерческих колонок, разработанных специально для анализа углеводов, о содержимом которых в открытых публикациях сообщалось мало сведений. Размеры колонок обычно составляли 300×8 мм, хотя использовали и более длинные колонки. Поскольку коэффициенты емкости были малы и многие сахара, не образующие комплексов с ионами кальция, элюировались сразу после мертвого объема, для достижения необходимого разрешения приходилось применять достаточно длинные колонки.

Колонки обычно работают при температуре 80—85 °С, хотя можно использовать и более низкие (55 °С) температуры. При более высоких температурах ускоряется диффузия и получаются более узкие пики, но удерживание уменьшается. Высокие температуры применяют для ускорения конверсии α - и β -форм или мутаротации сахаров, в результате чего сахара дают единый

* Наиболее популярным применением лигандообменной хроматографии является разделение оптических изомеров веществ, впервые осуществленное в ИНЭОС АН СССР, о чем свидетельствуют литературные источники и практическое использование достижений ЛОХ. — Прим. перев.

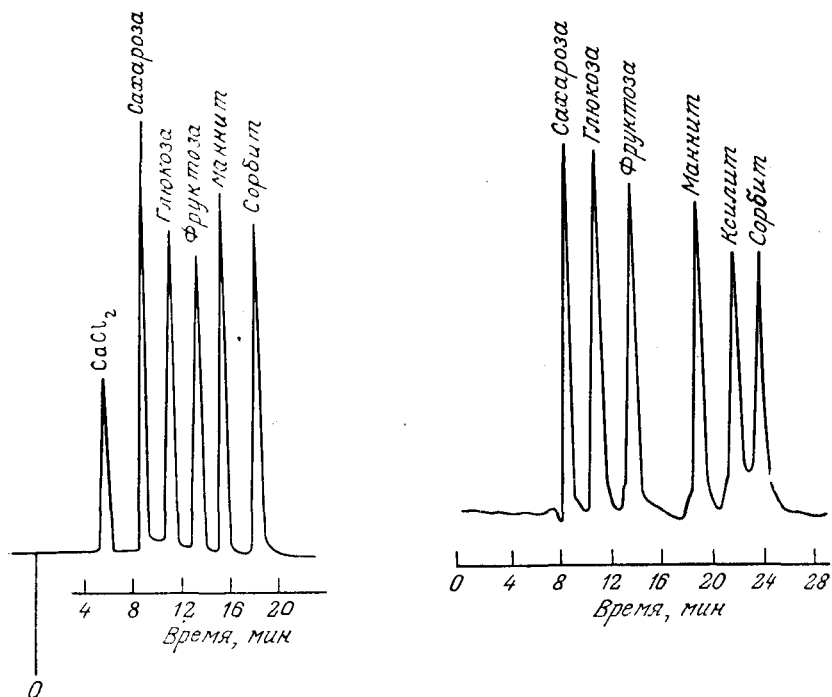


Рис. 6.2. Хроматограмма обычных сахаров и сахарных спиртов на заряженной кальцием ионообменной смоле. Колонка размером 300×6,5 мм, температура 85 °С, элюент вода, расход 0,4 мл/мин. Количество каждого компонента 100 мкг [52].

Рис. 6.3. Хроматограмма обычных сахаров и сахарных спиртов на заряженной кальцием ионообменной смоле. Колонка, как на рис. 6.2; температура 80 °С, элюент 25%-ный (по объему) ацетонитрил, расход 0,5 мл/мин. Следует отметить, что здесь объемы элюирования выше в сравнении с водным элюентом (рис. 6.2), и, кроме того, имеется пик ксилита [53].

хроматографический пик. Мутаротацию можно катализировать добавлением и элюент третичных аминов [50, 51].

Инверсия сахарозы и других дисахаридов нежелательна, но она катализируется кислотой средой и будет протекать в том случае, когда ионы водорода накапливаются в насадке колонки. Этого можно избежать, время от времени промывая колонку раствором соли кальция [52, 53] и добавляя в водный элюент ацетат кальция (10^{-4} М) [54].

В качестве элюента обычно используют воду, хотя в ряде случаев добавляют до 25% метанола или ацетонитрила для увеличения удерживания [50, 53]. Чаще всего детектирование проводят на рефрактометре; для того чтобы получить более

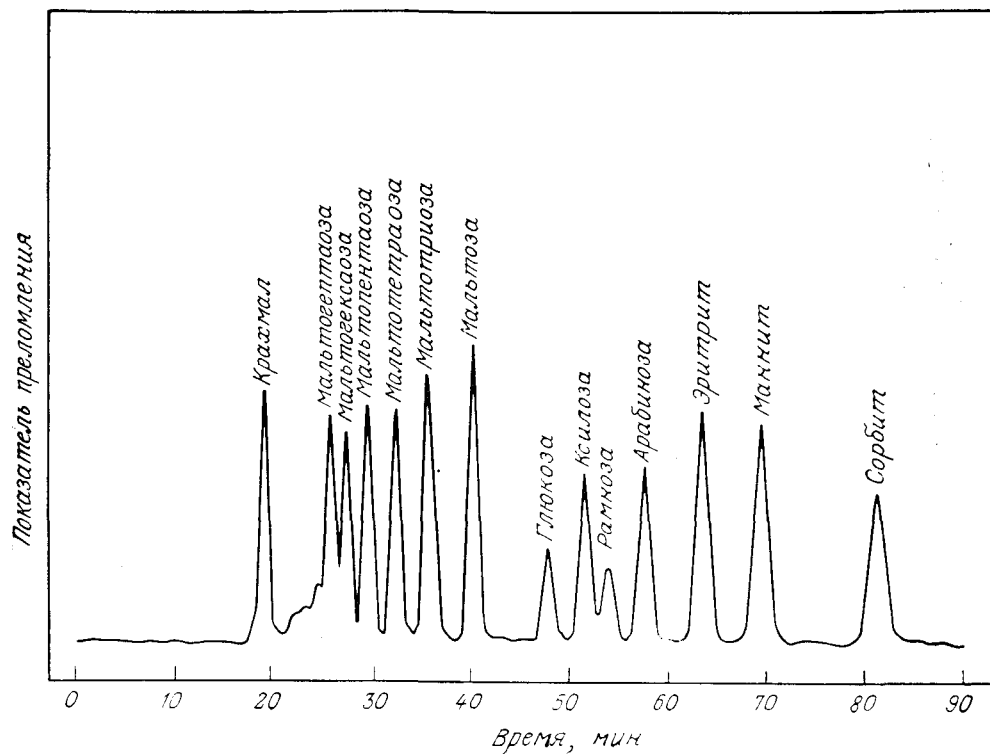


Рис. 6.4. Хроматограмма сахаров и олигосахаридов на заряженной кальцием ионообменной смоле. Колонка размером 900×7,8 мм, температура 85 °С, элюент вода, расход 0,5 мл/мин [58].

высокую чувствительность, элюат можно обработать 2-циан-ацетамидом и проводить обнаружение на флуоресцентном детекторе [55].

На рис. 6.2 и 6.3 показана хроматограмма продуктов разделения на коммерческих колонках с водой и смесью ацетонитрил—вода (1:3 по объему) в качестве элюента. На рис. 6.4 представлена хроматограмма продуктов разделения, проведенного на трех соединенных последовательно коммерческих колонках.

Порядок элюирования показан в табл. 6.1, где сравниваются удерживаемые объемы на сульфированном полистироле со степенью сшивки 6%, являющемся каркасом ионообменника, для четырех противоионов. Эти объемы нормализуют по отношению к удерживаемому объему оксида дейтерия, принятого за единицу. Пики солей получают введением разбавленных рас-

творов солей исследуемых катионов, например $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ в насыщенных кальцием насадках. Принимая, что соли исключаются из смолы в соответствии с равновесием Доннана, получают «пики солей», дающие мертвые объемы между частицами насадки в колонке. Это допущение неприменимо к $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ из-за сильной ассоциации ионов.

Все сахара, за исключением рибозы, элюируются перед оксидом дейтерия, что указывает на вытеснение из набухшей смо-

Таблица 6.1. Удерживание сахаров и полиолов на сульфированном полистироле со степенью сшивки 6% [37]

Вещество	Противоион			
	Li+	K+	Ca ²⁺	La ³⁺
Солевой пик	0,385	0,47	0,50	0,72
Сахароза	0,52	0,60	0,57	0,60
Лактоза	—	—	0,56	0,60
Глюкоза	0,58	0,76	0,67	0,65
Ксилоза	—	0,82	0,77	0,71
Сорбоза	—	—	0,80	0,71
Фруктоза	0,59	0,83	0,82	0,77
Арабиноза	—	—	0,90	0,77
Пентаэритрит	0,75	0,73	0,90	1,08
Глицерин	0,77	0,82	0,96	1,10
Маннит	0,64	0,73	1,10	1,44
Сорбит	0,665	0,74	1,36	2,60
Рибоза	0,72	0,94	1,43	2,05

Примечание. Удерживание оксида дейтерия составляет 1,00. Значения удерживаемых объемов D_2O составляют для Li⁺ 5,81, K⁺ — 5,62, Ca²⁺ — 5,58, La³⁺ — 4,95 мл. Температура колонки 60 °С.

лы в подвижную жидкую фазу. Вероятно, основным фактором, определяющим распределение этих сахаров, является образование водородных связей. Из изученных соединений только рибоза и сахарные спирты (маннит и сорбит) координируются в некоторой степени с ионами кальция. Учитывая молярную концентрацию ионов кальция в фазе сорбента, можно предположить, что комплексы кальция с полиолами имеют приблизительно одинаковую устойчивость в фазе элюента, состоящего из воды, и в фазе ионообменника [37].

Порядок элюирования, представленный в табл. 6.1, был установлен разными группами исследователей [41, 51, 56]. Бауст и сотр. [57] подчеркнули, что он почти обратен порядку элюирования с аминофазы. Олигосахариды быстро элюируются с ионообменной смолы в Ca^{2+} -форме, причем чем выше их молеку-

лярный вес, тем слабее они удерживаются [58—60]. Фитт [49] нашел линейное соотношение между числом звеньев глюкозы в олигомере (от $n=1$ до $n=6$) и логарифмом исправленного удерживаемого объема. На аминофазе олигомеры удерживаются тем сильнее, чем больше их молекулярный вес. То же самое соотношение справедливо для распределительной хроматографии на анионо- и катионообменных смолах в растворах с высоким содержанием спиртов. Мартинсон и Самуэльсон [61] показали, что олигомеры глюкозы удерживаются тем сильнее, чем выше их молекулярный вес, причем с ростом числа звеньев глюкозы логарифмическая зависимость k' имеет линейный вид; в целом свободная энергия удерживания была пропорциональна числу гидроксильных групп в молекуле. Подвижная фаза состояла из этанола (70%) и воды (30%). Вероятно, что при отсутствии координационных связей с ионами металла удерживание в основном обусловлено образованием водородных связей с молекулами воды в неподвижной фазе. На практике при проведении анализа смесей олигомеров метод распределительной хроматографии по Самуэльсону или использование аминофазы более выгодно в сравнении с использованием катионообменников в Ca^{2+} -форме и воды в качестве подвижной фазы.

Колонки с заряженным кальцием сорбентом и водный элюент применяются для анализа простых смесей из трех-четырех сахаров [62—66]; в ранних статьях описано использование смол со степенью сшивки 4% [59, 62]. При наличии в пробах аминокислот, карбоновых кислот или неорганических солей желательно применять предколонки [66, 67]. Для анализа сахаридов [65] и полиолов [63] описаны автоматические методы. При использовании рефрактометра предел обнаружения для большинства сахаров и полиолов составляет приблизительно 1 мкг. Предколонки рекомендуется устанавливать в тех случаях, когда в анализируемых смесях присутствуют аминокислоты, карбоновые кислоты или неорганические соли [66, 67].

Для препаративного разделения глюкозы и фруктозы была разработана противоточная система со смолой в Ca^{2+} -форме [68]. Для разделения глюкозы, фруктозы и маннита Вортел и ван Беккум [69] использовали новую неподвижную фазу — молекулярные сита (цеолиты). С натрием в качестве замещающего катиона не удается разделить глюкозу и фруктозу, при использовании же кальция такое разделение возможно, причем фруктоза удерживается сильнее глюкозы, как и при разделении на смоле в Ca^{2+} -форме. В случае неорганических ионообменников трудно оценить вклад водородных связей в удерживание; вполне вероятно, что разделение происходит благодаря комплексообразованию фруктозы с кальцием, на что указывал Гулдинг [41].

В хроматографии сахаров в качестве иона-комплексобразователя обычно применяют ионы кальция, хотя для этих же целей можно эффективно использовать и другие ионы. Мы упоминали об использовании заряженных лантаном смол для разделения углеводов. Гулдинг [41] указал на такую возможность; его данные по удерживанию приведены в табл. 6.1. Замена кальция на лантан значительно увеличивает удерживание полиолов и улучшает их разделение. Петрус и др. [70] разделили 14 альдитолов на катионообменной смоле, заряженной лантаном, в водном элюенте. В этой статье проведено сравнение с другими противоионами, особенно Ca^{2+} и Ba^{2+} . Полиолы удерживаются наиболее прочно в присутствии лантана и дают наибольшие коэффициенты разделения, однако в присутствии бария некоторые альдоли удерживаются еще сильнее. В наших экспериментах препятствием к использованию лантана служило размывание пиков, вызванное низкой набухаемостью смолы, низким содержанием воды и медленной диффузией из фазы ионообменника; тем не менее применение лантана обеспечивает высокую селективность, как это показано далее.

Применение ионов свинца(II) в катионообменных смолах обеспечивает лучшее разрешение мономерных сахаров (пентоз и гексоз), чем использование кальция [60]. При разделении олигосахаридов Скобел и Пробст [59] нашли, что применение серебра в составе смолы со степенью сшивки 4% обеспечивает более эффективное разделение с большим числом теоретических тарелок, чем применение кальция с такой же смолой. Применение заряженной кальцием смолы позволяет получать отдельные пики олигосахаридов до $D_p=8$ (D_p — это степень полимеризации или число звеньев глюкозы), в то время как использование смолы, заряженной ионами серебра(I), дает четкие пики до $D_p=12$ (рис. 6.5). Опыты показали, что использование только серебра неэффективно, лучшее разрешение получено на смоле, заряженной 70% ионов серебра(I) и 30% (в эквивалентном исчислении) ионов кальция. На рис. 6.5 представлена хроматограмма углеводов гидролизованной кукурузной патоки.

Необходимо упомянуть также о разделении глюкозы, галактозы и трех аминсахаров с помощью комплексообразования в подвижной фазе. В качестве насадки применяли аминофазу, а в качестве элюента воду с добавкой сульфата кадмия [71].

Ионы меди(II) обычно использовали в ЛОХ сахаров и полиатомных спиртов сначала в заполненных смолой колонках при пропускании через них элюента под действием силы тяжести [72], а затем — в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии [73] — на колонках, заполненных сферическими пористыми частицами силикагеля ($d_p=5$ мкм), пропитанными медью(II) по методу Фуко (гл. 2, ссылки [43, 44]). Этот ме-

тод заключается в следующем: силикагель перемешивают с раствором сульфата меди в водно-аммиачной среде, а затем промывают и перед заполнением колонки высушивают. Для элюирования сахаров использовали водный раствор ацетонитрила в соотношении 1:3 (по объему), 1,5 М по аммиаку и $2 \cdot 10^{-5}$ М по меди(II). Обнаружение проводилось по поглощению УФ-излучения сахарно-медных комплексов при 254 нм; предел обнаружения составлял одну десятую величины, получаемой путем измерения показателя преломления. Разделение было очень хорошим, а порядок элюирования существенно отличался от порядка элюирования на заряженных ионами кальция обменниках. Для исследованных сахаров он был следующим: рамноза (первая), ксилоза, фруктоза, глюкоза, сахароза, мальтоза, лактоза (последняя). Удерживание и разделение пиков повышались с увеличением содержания ацетонитрила. По всей видимости, этот метод перспективен для анализа дисахаридов.

Устойчивость комплексов сахаров и полиолов с двенадцатью ионами металла сравнивали с помощью тонкослойной хроматографии [74]. Наибольшей стабильностью обладают комплексы с медью(II), за ними следуют комплексы с хромом(III).

Железо(III) образует комплексы с сахарами в водных растворах с константами образования 100 л/моль или выше [75], но попытки разделения сахаров с помощью катионообменника, заряженного железом(III), оказались лишь частично успешными [76].

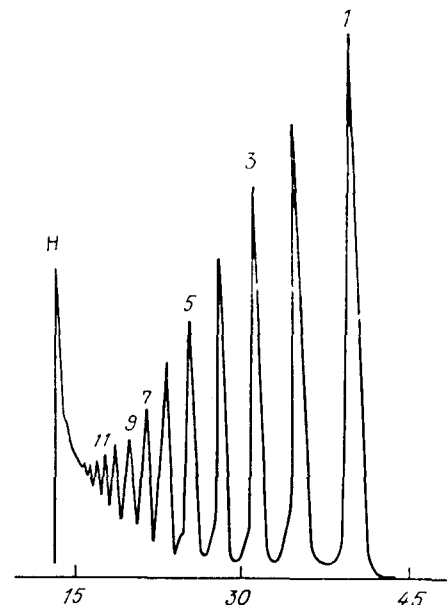
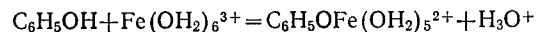


Рис. 6.5. Хроматограмма гидролизованной кукурузной патоки на ионообменной смоле с 5% сшивки, заряженной ионами серебра (71 экв.%) и кальция (29 экв.%). Колонка размером 300×7,8 мм, размер частиц 10—15 мкм, температура 85 °С, расход 0,25 мл/мин. Цифры над пиками показывают степень полимеризации; «H» означает «выше», за исключением полисахаридов [59].

6.2.2. Фенолы

Фенолы образуют с железом (III) хорошо различимые комплексы темно-красного или пурпурного цвета, что используют для качественных тестов на фенолы. Их свойства детально изучены, а константы устойчивости измерены [77, 78].

Первичная реакция фенола с железом (III) в кислом водном растворе протекает следующим образом:



Константа равновесия этой реакции равна $10^{-2,04}$. Объединив эту величину с $pK_a = 9,80$ ионизации фенола как кислоты, можно найти логарифм константы устойчивости $\text{C}_6\text{H}_5\text{OFe}(\text{OH})_2^{2+}$, равный 7,76. Хлор- и нитрофенолы образуют комплексы, в большинстве случаев являющиеся более сильными кислотами, чем сам фенол, так что константы равновесия замещения протонов в приведенной выше реакции оказываются приблизительно такими же. Количественная оценка ассоциации фенола с железом (III) должна учитывать гидролиз $\text{Fe}(\text{OH})_2^{3+}$ [78].

Обычно железо (III) применяют для селективного извлечения фенолов из воды или других сред. Каолин, обработанный хлоридом железа, сорбирует из сырой нефти слабокислые фенолы, а также соединения других классов, такие как карбазолы и амиды [79]. Эти соединения смывают с сорбента метиленхлоридом. Фенолы, в особенности хлорфенолы, извлекают из загрязненной воды сорбцией на иминодиацетатной хелатообразующей смоле хелекс-100, заряженной железом (III) [80]. Перед пропусканием воды через колонку к ней полезно добавлять кислоту до pH меньше 3. После сорбции колонку промывают 1 M раствором едкого натра в 20%-ном этаноле. Извлечение составляет 70—80% для фенола и монохлорфенолов, но для фенолов с большим числом атомов хлора извлечение практически было полным, начиная с концентрации 100 мкг/л в загрязненной воде.

Петронио и др. [81, 82] показали, что различные замещенные фенолы можно успешно смыть с насадки, заряженной железом (III), используя элюенты с возрастающим pH. Фенол элюируется первым при pH 8,5, затем при pH 10 выходят в указанном порядке нитро-, дихлор- и пентахлорфенол. Разница в прочности сорбции здесь достаточно велика, что нельзя объяснить только различиями в константах образования. По-видимому, важную роль здесь играют гидрофобные связи с полистирольной матрицей. Аналогичная последовательность элюирования замещенных фенолов найдена и при обращенно-фазовом варианте на силикагелях с привитыми C_{18} -группами.

Хлор- и нитрогруппы аналогично алкильным заместителям увеличивают удерживание фенолов.

Масловска и Пиетек [83] осуществили разделение замещенных фенолов сначала на сульфированной полистирольной смоле, заряженной железом (III), а затем на этой же смоле, заряженной церием (III) [84]. В первом случае в качестве элюента применяли раствор перхлората натрия, содержащий хлорную кислоту с градиентом pH от 3 до 5. Порядок элюирования был следующим: хлор-, бром-, нитро- и метил-*m*-крезол. Во втором случае в качестве элюента использовали 0,015 M серную кислоту в 30%-ном ацетонитриле. Таким способом было разделено семь компонентов, начиная с незамещенного фенола; хлорированные фенолы выходили последовательно. Изомеры хлорфенолов разделялись хорошо. Эффективность колонок оказалась низкой, поскольку частицы смолы были крупными (200—400 меш), однако предел обнаружения был менее 1 нмоль. Более эффективные насадки на основе силикагеля с привитым 8-гидроксихинолином, заряженные железом (III), были опробованы Шаваном и Язореком [85]; в качестве элюента применяли ацетатный буфер в 40%-ном ацетонитриле. И в этом случае было найдено, что заместители Cl, CH_3 и NO_2 увеличивают удерживание.

Фенолы относятся к распространенным загрязнителям окружающей среды, однако методом лигандного обмена их стали концентрировать и анализировать только недавно. Выделение этих веществ из загрязненной воды представляется экономически важным. Для выделения фенолов из промышленных стоков Чанда и др. [86] использовали сульфированные и иминодиацетатные катионообменные полистирольные смолы, заряженные железом (III). Сорбированные фенолы затем смывали со смолы и выделяли в чистом виде. Из отработанных вод при коксовании угля и газификации аналогичным образом удаляли тиоцианат-ионы, а затем выделяли их [87]. Оксид алюминия с адсорбированным железом (III) обратимо связывает фенолы и поэтому может быть использован для отделения фенолов посредством лигандообменной хроматографии; коэффициенты распределения для семнадцати фенолов были измерены в шести системах растворителей [88].

6.2.3. Карбоновые кислоты

Анионы карбоновых кислот связываются с большинством ионов металлов, образуя 1:1-, 1:2- и т. п. комплексы, константы устойчивости которых можно найти в справочниках [77]. Например, с медью (II) и цинком ацетат-ионы образуют комплексы с K_1 приблизительно 100 и 10 соответственно. Более устой-

чивые комплексы образуются с гидроксикислотами, способными образовывать бидентатные хелатные кольца. В связи с этим естественно использовать заряженные ионы металла катионообменники для сорбции карбоксилат-ионов.

В 1974 г. Бедетти и сотр. [89] сорбировали на иминодиацетатной хелатообразующей смоле хелекс-100, заряженной ионами никеля, ряд гидрокси- и дикарбоновых кислот из разбавленных растворов аммиака. Элюирование 10^{-5} М раствором аммиака продемонстрировало последовательное возрастание констант устойчивости комплексов с никелем гликолат-, сукцинат-, малонат- и оксалат-ионов, которые выходили из колонки в этом же порядке. Почти в то же время Фунасака и сотр. [90, 91] разделили несколько гидроксibenзойных и гидроксинафталиновых кислот на колонках с карбоксильными (полиакриловыми) и полистирольными сульфированными катионообменниками, заряженными ионами железа (III), меди (II), свинца (II) и титана (IV). Элюирование проводили этанолом или водой. орто-Изомеры гидроксibenзойных кислот (салициловой кислоты) элюировались первыми, затем выходили *мета*- и, наконец, *пара*-изомеры. Эти исследователи проводили предварительное разделение аминокислот на нитрозонафтолов на сульфированном катионообменнике, заряженном медью (II) и железом (III) соответственно, используя раствор аммиака в качестве элюента [92, 93]. Позднее Масловска и Пиетек [94] провели сравнение Al^{3+} , Fe^{3+} и Se^{3+} в качестве противоионов при хроматографировании ароматических кислот на сульфированном полистирольном ионообменнике. Элюентом служил 0,01 М водный раствор серной кислоты. С ионами железа (III) было получено наилучшее разрешение пиков; кислоты элюировались за 20 мин в следующем порядке: бензойная, коричная, 4-гидроксibenзойная, 2,3-дигидроксibenзойная, 2,4-дигидроксibenзойная, 4-гидрокси-3-метоксibenзойная, *цис*-2-гидроксикоричная, 4-гидрокси-3-метоксикоричная. Порядок элюирования иллюстрирует взаимодействие π -электронов элюируемого соединения и матрицы смолы, а также комплексообразование с ионами железа. Доминирующим, по-видимому, является эффект комплексообразования.

Отто и сотр. [95] провели сравнение удерживания ароматических кислот и нейтральных ароматических соединений катионообменной сульфированной полистирольной смолы с противоионами Na^+ и La^{3+} , применяя ацетатный буфер с pH 5 в качестве элюента. Для предотвращения вымывания La^{3+} из колонки в элюент необходимо добавлять соли лантана. В случае лантана ароматические кислоты удерживаются гораздо сильнее и элюируются в следующем порядке: мочева, бензойная, 4-метоксibenзойная, коричная и миндальная. Отдельные экспери-

менты показали, что La^{3+} ассоциируется с анионами органических кислот, образуя комплекс 1:1 с двумя положительными зарядами LaA^{2+} , наиболее устойчивым из которых является комплекс с миндальной кислотой с константой устойчивости 130 л/моль. Эта система селективна по отношению к ароматическим карбоновым и гидроксикислотам. Ее использование в химическом анализе ограничено из-за довольно большого времени элюирования (до 60 мин), широких зон, обусловленных, как было показано выше, низким содержанием воды в смоле, насыщенной трехзарядными катионами, и как результат медленной диффузией.

Ионообменная смола, заряженная лантаном, сорбирует алифатические гидроксикислоты (яблочную, винную, лимонную) очень сильно и в подходящих условиях может использоваться для их разделения в течение нескольких дней [37].

Силикагелевые фазы с привитыми γ -гидроксипропиловыми группами, заряженными ионами меди, описаны в гл. 2 (ссылка [48]). Миндальную кислоту расщепляют на оптические изомеры с помощью 10^{-4} М водного раствора сульфата меди в качестве элюента. В этой же системе миндальная кислота была отделена от гидроксиминдальной, 2- и 3-фенилмолочной и 2-гидроксиапроновой кислоты.

Используя внешнесферную координацию, можно разделить оптические изомеры различных гидроксикислот. Гаал и Инцеди [96] расщепили миндальную кислоту на *д*- и *л*-изомеры на полиакриловом катионообменнике с оптически активными катионами трис(этилендиамин)кобальта (III); была разделена на изомеры также аспарагиновая кислота. В качестве элюента они использовали раствор сульфата натрия. Карунчио и сотр. [97] и Синибальди и сотр. [98] приняли широкое исследование внешнесферной координации. Они приготовили силикагель с привитыми хиральными группами — $NHCH_2CH_2NH_2Coep_3^{3+}$, где ep — этилендиамин (кобальт в этой привитой группе координирован с шестью атомами азота), и разделили оптические изомеры яблочной и винной кислот, а также *д*- и *л*-формы трис(оксалатных) комплексов с кобальта (III) и хрома (III). В качестве элюента использовали 0,02 М раствор фосфата с pH 6,2. Нуклеозиды и цефалоспорины были разделены в этой же системе.

Халмос и Инцеди [99] использовали внешнесферную координацию в подвижной фазе для разделения анионов малеиновой и fumarовой кислот. Неподвижная фаза представляла собой сильноосновный анионообменник, подвижная фаза содержала комплексную соль $Coep_3Cl_3$ или $Co(NH_3)_6Cl_3$ плюс буфер для доведения pH с 8 до 10. Малеат-ион с *цис*-конфигурацией связывался значительно сильнее, чем fumarат-ион (*транс*) и со-

ответственно малеат выходил из колонки перед fumarатом. Координация в подвижной фазе усиливает селективность анионообменника, что также приводит к более раннему элюированию малеата.

Ароматические кислоты были разделены Ли и сотр. [100] в 1970 г. с помощью лигандного обмена в подвижной фазе. В качестве неподвижной фазы они использовали сильноосновную анионообменную смолу с частицами размером 200—400 меш, а в качестве подвижной фазы — 0,05 М раствор хлорида железа (III) в водно-спиртовой среде. Ионы железа (III) образуют катионные комплексы с кислотами, что уменьшает удраживание. Кислоты, образующие наиболее прочные комплексы, элюируются первыми. Комплексы сильно окрашены, что позволяет проводить спектрофотометрические измерения, а также следить за окрашенными полосами в стеклянных колонках. Среди разделенных кислот были салициловая, сульфосалициловая и нитросалициловая кислоты. Хроматографические зоны были широкими, а разрешение недостаточно хорошим, но если эти эксперименты воспроизвести на современном оборудовании и современных ионообменниках, то можно получить ценные результаты.

6.2.4. Прочие кислородсодержащие лиганды

Наиболее интересным применением внешнесферной координации является извлечение неионных ПАВ из загрязненных вод и разделение гомологов ПАВ [101]. В качестве неподвижной фазы используют иминодиацетатную хелатообразующую смолу с катионами $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ или, что лучше, $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OH}_2^{3+}$. Водный $5 \cdot 10^{-5}$ М раствор полигидроксиэтиленового поверхностно-активного вещества $\text{C}_9\text{H}_{19}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ пропускали через небольшую колонку с хелатообразующей смолой, которая удерживала эти соединения, а также катионные, но не анионные ПАВ. Промывание колонки спиртовым раствором аммиака позволяет удалить неионные ПАВ, а катионные ПАВ остаются в насадке.

Макропористые заряженные ионами металлов смолы применяют для анализа сырой нефти. Вебстер и др. [102, 103] предложили схему сорбции различных классов соединений, в том числе ароматических кислот и β -дикетонных, на смолах, заряженных медью (II), никелем (II) и железом (III). Кофари [104] и Шанкар и Джоши [105] фракционировали ДНК и РНК с помощью сульфированной полистирольной смолы, насыщенной алюминием, и различных буферных растворов в качестве элюента. Взаимодействие металла с лигандом в основном происходит за счет фосфатных групп нуклеиновых кислот.

Чоу и Грушка [106] разделяли нуклеотиды и нуклеозиды методом внешнесферной координации. В качестве неподвижной фазы применяли силикагель с привитым трис(этилендиамино)-кобальтом (III), аналогичным использованному Карунчио и сотр. [97]; роль элюента играл фосфатный буфер, содержащий ионы магния.

Литература

1. Snyder L. R., Nitrogen and oxygen compound types in petroleum, *Anal. Chem.*, **41**, 314 (1969).
2. Vogh J. W., Dooley J. E., Separation of organic sulfides from aromatic concentrates by ligand-exchange chromatography, *Anal. Chem.*, **47**, 816 (1975).
3. Sluyterman L. A. E., Wijdenes J., An agarose mercurial column for separation of mercaptopapain and nonmercaptopapain, *Biochem. Biophys. Acta*, **200**, 593 (1970).
4. Matuo Y., Sano R., Tosa T., Chibata I., Purification of flavin-adenine dinucleotide and coenzyme A on *p*-acetoxymercurilaniline-agarose columns, *Anal. Biochem.*, **68**, 349 (1975).
5. Hannestad U., Lundqvist P., Sörbo B., An agarose derivative containing an arsenical for affinity chromatography of thiols, *Anal. Biochem.*, **126**, 200 (1982).
6. Joshi P. N., Shankar V., Abraham K. J., Sreenivasan K., Separation of chymopapain from papaya latex on Amberlite IR-120-Hg, *J. Chromatogr.*, **121**, 65 (1976).
7. Takayanagi H., Hatano O., Fujimura K., Ando T., Ligand-exchange high-performance liquid chromatography of dialkyl sulfides, *Anal. Chem.*, **57**, 1840 (1985).
8. Скороход О. Р., Варрара А. Г., Комплексы тиомочевины с кадмием в сульфокатионитах KV-2, ЖФХ, **46**, 1708 (1976).
9. Honda S., High-performance liquid chromatography of mono- and oligosaccharides, *Anal. Biochem.*, **140**, 1 (1984).
10. Palmer J. K., A versatile system for sugar analysis via liquid chromatography, *Anal. Lett.*, **8**, 215 (1975).
11. Schwarzenback R., A chemically bonded stationary phase for carbohydrate analysis, *J. Chromatogr.*, **117**, 206 (1976).
12. Rabel F. M., Caputo A. G., Butts E. T., Separation of carbohydrates on a new polar bonded phase, *J. Chromatogr.*, **126**, 731 (1976).
13. D'Amboise M., Noel D., Hanai T., Characterization of bonded amine packing for liquid chromatography of carbohydrates, *Carbohydr. Res.*, **79**, 1 (1980).
14. Verhaar L. A. T., Kuster B. F. M., Liquid chromatography of sugars on silica-based stationary phases, *J. Chromatogr.*, **220**, 313 (1981).
15. Verhaar L. A. T., Kuster B. F. M., Elucidation of mechanism of sugar retention on amine-bonded silica, *J. Chromatogr.*, **234**, 57 (1982).
16. Rooklin R. D., Phol C. A., Determination of carbohydrates by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric determination, *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, 1577 (1983).
17. Baust J. G., Lee R. E., James H., Differential binding of sugars and polyhydric alcohols to ion-exchange resins; inappropriateness to quantitative HPLC, *J. Liq. Chromatogr.*, **5**, 767 (1982).
18. Samuelson O., Partition chromatography of sugars, sugar alcohols and sugar derivatives, *Ion Exchange: A Series of Advances*, Vol. 2, Marcel Dekker, New York, 1969, chap. 5.

19. *Khym J. X., Zill L. P.*, The separation of monosaccharides by ion exchange, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2090 (1952).
20. *van Duyn M., Peters J. A., Kieboom A. P. G., van Bekkum H.*, Studies on borate esters, *Tetrahedron*, **40**, 2901 (1984).
21. *Paal T. L.*, Study of glycol-boric acid complex formation equilibria, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **103**, 181 (1980); as cited in *C. A.*, **93**, 32552t, 1980.
22. *Davis H. B., Mott C. J. B.*, Interaction of boric acid with carbohydrates and related substances, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **76**, 1991 (1980).
23. *Larsson K., Samuelson O.*, Anion-exchange chromatography of alditols in borate medium, *Carbohydr. Res.*, **50**, 1 (1976).
24. *Simatupang M. H., Sinner M., Dietrichs H. H.*, Simultaneous determination of reducing sugars and sugar alcohols, *J. Chromatogr.*, **155**, 446 (1978).
25. *Simatupang M. H.*, Ion-exchange chromatography of some neutral monosaccharides and uronic acids, *J. Chromatogr.*, **178**, 588 (1979).
26. *Reimerdes E. H., Rothkitt K. D., Schauer R.*, Determination of carbohydrates by anion exchange of their borate complexes, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **318**, 285 (1984).
27. *Honda S., Matsuda Y., Takahashi M., Kakehi K., Ganno S.*, Fluorimetric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide and application to automated analysis, *Anal. Chem.*, **52**, 1079 (1980).
28. *Honda S., Takahashi M., Nishimura Y., Kakehi K., Ganno S.*, Sensitive UV monitoring of aldoses in automated borate complex anion-exchange chromatography, *Anal. Biochem.*, **118**, 162 (1981).
29. *Honda S., Takahashi M., Kakehi K., Ganno S.*, Rapid automated analysis of monosaccharides, *Anal. Biochem.*, **113**, 130 (1981).
30. *Kennedy J. F., Fox J. E.*, Fully automatic ion exchange and gel permeation chromatography of neutral mono- and oligosaccharides, *Carbohydr. Res.*, **54**, 13 (1977).
31. *Mopper K., Dawson R., Lieberzeit G., Hansen H. P.*, Borate complex ion-exchange chromatography with fluorimetric detection for determination of saccharides, *Anal. Chem.*, **52**, 2018 (1980).
32. *Nordin P.*, Monitoring of carbohydrates with periodate, *Anal. Biochem.*, **131**, 492 (1983).
33. *Glad M., Ohlson S., Hansson L., Maansson M. O., Mosbach K.*, High-performance liquid affinity chromatography of nucleosides, nucleotides and carbohydrates with boronic acid substituted silica, *J. Chromatogr.*, **200**, 254 (1980).
34. *Saunders R. M.*, Separation of sugars on an ion-exchange resin, *Carbohydr. Res.*, **7**, 76 (1968).
35. *Wong-Chong J., Martin E. A.*, HPLC for the analysis of saccharides in sugar cane, *Sugar Azucar*, **75**, 64 (1980); *C. A.*, **93**, 206460d (1980).
36. *Pecina R., Bonn G., Burtscher E., Bobleter O.*, HPLC elution behaviour of alcohols, aldehydes, ketones, organic acids and carbohydrates on a strong cation-exchange stationary phase, *J. Chromatogr.*, **287**, 245 (1984).
37. *Walton H. F.*, Counter-ion effects in partition chromatography, *J. Chromatogr.*, **332**, 203 (1985).
38. *Hobbs J. S., Lawrence J. G.*, Separation of carbohydrates on cation-exchange resin columns having organic counter-ions, *J. Chromatogr.*, **72**, 311 (1972).
39. *Kuwamoto T., Okada E.*, Separation of mono- and disaccharides by HPLC with a strong cation-exchange resin and an acetonitrile-rich eluent, *J. Chromatogr.*, **258**, 284 (1983).
40. *Honda S., Suzuki S.*, Common conditions for HPLC of aldoses, hexosamines and sialic acids in glycoproteins, *Anal. Biochem.*, **142**, 167 (1984).
41. *Goulding R. W.*, Liquid chromatography of sugars and related polyhydric alcohols on cation exchangers: effect of cation variation, *J. Chromatogr.*, **103**, 229 (1975).
42. *Honda S., Suzuki S., Kakehi K.*, Analysis of aldose anomers by HPLC on cation-exchange columns, *J. Chromatogr.*, **291**, 317 (1984).
43. *Jandera P., Churacek J.*, Ion-exchange chromatography of aldehydes, ketones, ethers, alcohols, polyols and saccharides, *J. Chromatogr.*, **98**, 55 (1974).
44. *Angyal S. J., Davies K. P.*, Complexing of sugars with metal ions, *Chem. Commun.*, **1971**, 500.
45. *Angyal S. J.*, Complexing of polyols with cations, *Tetrahedron*, **30**, 1695 (1974).
46. *Ekström L. G., Olin A.*, Complex formation between Pb^{2+} , Ca^{2+} and some pentoses, *Acta Chem. Scand. Ser. A*, **31**, 838 (1977).
47. *Lönnerberg H., Vesala A.*, Complexing of glycofuranosides with calcium ions, *Carbohydr. Res.*, **78**, 53 (1980).
48. *Angyal S. J., Mills J. A.*, Complexes of carbohydrates with metal ions: paper electrophoresis of polyols in solutions of calcium ions, *Aust. J. Chem.*, **32**, 1993 (1979).
49. *Fitt L. E., Hassler W., Just D. E.*, A rapid method to determine the composition of corn syrup by liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **187**, 381 (1980).
50. *Angyal S. J., Bethell G. S., Beveridge R. J.*, Separation of sugars and polyols on cation-exchange resins in the Ca form, *Carbohydr. Res.*, **73**, 9 (1979).
51. *Verhaar L. A. T., Kuster B. F. M.*, Improved column efficiency in chromatographic analysis of sugars on cation-exchange resins by use of water-triethylamine eluents, *J. Chromatogr.*, **210**, 279 (1981).
52. *Vidalvalverde C., Martin-Villa C.*, Improved separation of polyols and carbohydrates by HPLC, *J. Liq. Chromatogr.*, **5**, 1941 (1982).
53. *Vidalvalverde C., Olmedilla B., Martin-Villa C.*, Reliable separation of xylitol from some carbohydrates and polyols by HPLC, *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 2003 (1984).
54. *Duarte-Coelho A. C., Dumoulin E. D., Guerin J. T.*, HPLC determination of sucrose, glucose, fructose in complex products, *J. Liq. Chromatogr.*, **8**, 59 (1985).
55. *Schlabach T. D., Robinson J.*, Improvements in sensitivity with the cyanoacetamide reaction for determination of reducing sugars, *J. Chromatogr.*, **282**, 169 (1983).
56. *Dokladova J., Barton A. Y., Mackenzie E. A.*, HPLC determination of sorbitol, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 664 (1980).
57. *Baust J. G., Lee R. E., Rojas R. R., Hendrix D. L., Friday D., James H.*, Separation of low-molecular-weight carbohydrates and polyols by HPLC: amine-modified silica vs. ion exchange, *J. Chromatogr.*, **261**, 65 (1983).
58. *Schmidt J., John M., Wandrey C.*, Rapid separation of malto-, xylo- and cello-oligosaccharides, *J. Chromatogr.*, **213**, 151 (1981).
59. *Scobell H. D., Probst K. M.*, Rapid high-resolution separation of oligosaccharides on silver-form cation-exchange resins, *J. Chromatogr.*, **212**, 51 (1981).
60. *Schwald W., Concin R., Bonn G., Bobleter O.*, Analysis of oligomeric and monomeric carbohydrates, *Chromatographia*, **20**, 35 (1985).
61. *Martinson E., Samuelson O.*, Partition chromatography of sugars on ion-exchange resins, *J. Chromatogr.*, **50**, 429 (1970).
62. *Ladisch M. R., Huebner A. L., Tsao G. T.*, High-speed LC of cellodextrins and other saccharide mixtures, *J. Chromatogr.*, **147**, 185 (1978).
63. *Samarco E. C., Parente E. S.*, Automated HPLC system for determination of mannitol, sorbitol and xylitol, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 76 (1982).
64. *Guardiola J., Schultze K. W.*, Thin-layer and liquid chromatography for quality control in manufacture of infusion solutions, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **318**, 237 (1984).

65. Scobell H. D., Probst K. M., Steele E. M., Automated LC system for analysis of carbohydrate mixtures, *Cereal Chem.*, **54**, 905 (1977).
66. McBee G. C., Maness N. O., Determination of sucrose, glucose and fructose in plant tissue, *J. Chromatogr.*, **264**, 474 (1985).
67. Fitt L. E., Convenient in-line purification of saccharide mixtures in automated HPLC, *J. Chromatogr.*, **152**, 243 (1978).
68. Barker P. E., Abusabah E. K. E., Separation of mixtures of glucose and fructose using countercurrent chromatographic techniques, *Chromatographia*, **20**, 9 (1985).
69. Wortel T. M., van Bekkum H., Carbohydrate separation by X-zeolites: cation and solvent effects, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **97**, 156 (1978).
70. Petrus L., Bilik V., Kuniak L., Stankovic L., Chromatographic separation of alditols on a cation-exchange resin in lanthanum form, *Chem. Zvesti*, **34**, 530 (1980).
71. Dua V. K., Bush C. A., HPLC separation of amino sugars and peptides with metal-modified mobile phases, *J. Chromatogr.*, **244**, 128 (1982).
72. Bourne E. J., Searle F., Weigel H., Complexes between polyhydroxy compounds and copper(II) ions, *Carbohydr. Res.*, **16**, 185 (1971).
73. Leonard J. L., Guyon F., Fabiani P., HPLC of sugars on Cu(II)-modified silica gel, *Chromatographia*, **18**, 600 (1984).
74. Briggs J., Finch P., Matulewicz M. C., Weigel H., Complexes of Cu(II), Ca and other metal ions with carbohydrates, *Carbohydr. Res.*, **97**, 181 (1981).
75. Zay I., Gaizer F., Burger K., Iron(III) complex formation equilibria of sugar type ligands, *Inorg. Chem. Acta*, **80**, L9 (1983).
76. Shaw V., Walton H. F., Chromatography of alcohols and sugars on Fe(III)-loaded resin, *J. Chromatogr.*, **68**, 267 (1972).
77. Martell A. E., Smith R. M. (eds.), *Critical Stability Constants*, Vol. 3, Plenum Press, New York, 1977.
78. Milburn R. M., The stability of ion(III)-phenol complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2064 (1955).
79. McKay J. F., Jewell D. M., Latham D. R., The separation of acidic compound types isolated from high-boiling petroleum distillates, *Sep. Sci.*, **7**, 361 (1972).
80. Petronio B. M., Lagana A., Russo M. V., Some applications of ligand exchange: recovery of phenolic compounds from water, *Talanta*, **28**, 215 (1981).
81. Petronio B. M., De Caris E., Ianuzzi L., Separation of phenolic compounds, *Talanta*, **29**, 691 (1982).
82. Petronio B. M., Lagana A., Andrea G. D., Preparation and properties of phenol-formaldehyde-based resin in the iron(III) form, *Talanta*, **31**, 357 (1984).
83. Maslowska J., Pietek W., Effect of complex formation in the separation of phenols by ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **201**, 293 (1980).
84. Maslowska J., Pietek W., Separation of chlorophenols on a cation exchanger in cerium(III) form, *Chromatographia*, **18**, 704 (1984).
85. Shahwan G. J., Jezorek J. R., Liquid chromatography of phenols on an 8-quinolinol-silica gel-iron(III) stationary phase, *J. Chromatogr.*, **256**, 39 (1983).
86. Chanda M., O'Driscoll K. F., Rempel G. L., Removal of organic compounds by ligand sorption on polymer-anchored ferric ion, *React. Polym.*, **1**, 183 (1983).
87. Chanda M., O'Driscoll K. F., Rempel G. L., Removal and recovery of thiocyanate by ligand sorption on polymer-bound ferric ion, *React. Polym.*, **2**, 175 (1984).
88. Rawat J. P., Iqbal M., Ligand exchange separation of phenols on alumina in Fe(III) form, *Chromatographia*, **17**, 701 (1983).

89. Bedetti R., Carunchio V., Marino A., Application of ligand exchange to separation of some aliphatic carboxylic acids, *J. Chromatogr.*, **95**, 127 (1974).
90. Funasaka W., Hanai T., Fujimura K., Ando T., Complex chromatography between the metal ion of a cation-exchange resin and organic compounds, *J. Chromatogr.*, **78**, 424 (1973).
91. Fujimura K., Koyama T., Tanigawa T., Funasaka W., Ligand-exchange chromatography: separation of hydroxybenzoic and hydroxynaphthoic isomers, *J. Chromatogr.*, **85**, 101 (1973).
92. Funasaka W., Fujimura K., Kuriyana S., Separation of aminobenzoic acid isomers by ligand-exchange chromatography, *Bunseki Kagaku*, **19**, 104 (1970).
93. Fukimura K., Matsubara M., Funasaka W., Separation of nitrosonaphthol isomers, *J. Chromatogr.*, **59**, 383 (1971).
94. Maslowska J., Pietek W., Use of ligand exchange for the separation of aromatic acids, *Chromatographia*, **20**, 46 (1985).
95. Otto J., de Hernandez C. M., Walton H. F., Chromatography of aromatic acids on lanthanum-loaded ion-exchange resins, *J. Chromatogr.*, **247**, 91 (1982).
96. Gaal J., Inczedy J., Chromatographic separation of optical isomers by outer-sphere complex formation, *Talanta*, **23**, 78 (1976).
97. Carunchio V., Messina A., Sinibaldi M., Corradini D., Outer-sphere ligand-exchange chromatography on bonded chiral silica gel, *J. Liq. Chromatogr.*, **5**, 819 (1982).
98. Sinibaldi M., Carunchio V., Messina A., Corradini D., Chromatography on bonded silica gel modified with amino complexes of cobalt(III), *Ann. Chim. (Rome)*, **74**, 175 (1984).
99. Halmos P., Inczedy J., Use of outer-sphere complex formation reactions in ion-exchange chromatography: separation of maleate and fumarate ions, *Talanta*, **29**, 647 (1982).
100. Lee K. S., Lee D. W., Lee E. K. Y., Anion-exchange chromatography of aromatic acids in ferric chloride-organic solvent medium, *Anal. Chem.*, **42**, 554 (1970).
101. Carunchio V., Liberatori A., Messina A., Petronio B. M., Ligand-exchange techniques in analytical methods for surfactants, *Ann. Chim. (Rome)*, **69**, 165 (1979).
102. Webster P. V., Wilson J. N., Franks M. C., Macro-reticular ion-exchange resins: some analytical applications to petroleum products, *Anal. Chim. Acta*, **38**, 193 (1967).
103. Webster P. V., Wilson J. N., Franks M. C., Applications of ion-exchange resins in nonaqueous media to separation and analysis of petroleum additives, *J. Inst. Petrol.*, **56**, 50 (1970).
104. Kothari R. M., Aspects of fractionation of DNA on an IR-120-Al(III) column, *J. Chromatogr.*, **53**, 580 (1970); Kothari R. M., **56**, 151 (1971); Kothari R. M., *J. Chromatogr.*, **57**, 83 (1971); Kothari R. M., *J. Chromatogr.*, **59**, 194 (1971); Kothari R. M., *J. Chromatogr.*, **64**, 85 (1972).
105. Shankar V., Joshi P. N., Fractionation of RNA on a metal-ion equilibrated cation exchanger, *J. Chromatogr.*, **90**, 99 (1974); Shankar V., Joshi P. N., *J. Chromatogr.*, **95**, 65 (1974).
106. Chow F. K., Grushka E., HPLC of nucleotides and nucleosides using outer-sphere and inner-sphere metal-solute complexes, *J. Chromatogr.*, **185**, 361 (1979).

КОМПЛЕКСЫ МЕТАЛЛ — ОЛЕФИН

Дж. Навратил

7.1. Хроматография с применением серебра

Если ЛОХ можно интерпретировать достаточно широко и включать в нее все виды хроматографии, в которых ионы металлов находятся в неподвижной фазе, а взаимодействия металл — лиганд вызывают удерживание лигандов, то хроматографию с использованием серебра можно отнести к ЛОХ. Эта методика позволяет проводить разделение молекул с олефиновыми двойными связями или с ароматическими циклами, которые координируются с ионами серебра с помощью π -электронов. Поскольку хроматография с использованием серебра описана во многих работах и достаточно далеко отстоит от других лигандообменных хроматографических методов, мы не будем проводить углубленный анализ всей информации, как это сделано в других главах.

Образование комплексов ионов серебра (I) с олефинами было впервые использовано в хроматографии Брэдфордом [1] в 1955 г. Он проводил газовую хроматографию на оригинальной неподвижной фазе — растворе нитрата серебра в глицерине. Олефины удерживались нитратом серебра и отделялись от насыщенных углеводородов. Позднее Беднас и Руссель [2] разделили таким способом *цис*- и *транс*-бутен-2, причем *транс*-изомеры выходили из колонки первыми. Этим же способом были разделены 3- и 4-метил-1-пентены [3]. Чепмен и Куммел [4] разделили изомеры додецена на оксиде алюминия, обработанном твердым нитратом серебра.

В жидкостной хроматографии также стали применять серебро [4]. Парафины слабо сорбируются на оксиде алюминия, обработанном нитратом серебра, и легко элюируются пентеном. Октадецен удерживается прочнее; его *транс*-изомеры первыми элюируются пентеном, содержащим 1—3% эфира. Кислородсодержащие соединения выходят из колонки позднее.

В качестве носителя для ионов серебра использовали катионообменные смолы. Это позволяет включить «хроматографию с применением серебра» в число вариантов ЛОХ в соответствии с определением данного метода, приведенным в статье Музарел-

ли [5], который первым подробно описал применение заряженных серебром смол и различных лигандов в качестве вытесняющего агента. Элюентом для разделения эфиров олеиновой и линолевой кислот служил раствор бутена в метаноле. Для этих же целей служила смесь воды и метанола. Сложные смеси изомерных *цис*- и *транс*-диенов, эфиров природных ненасыщенных кислот были разделены на макропористых смолах, заряженных ионами серебра [6, 7]; таким способом из смеси был выделен *цис*-15-октадеценоат [8]. Недавно было описано разделение гетероциклических ароматических соединений на зипаксе SCX, заряженном серебром, 1%-ным раствором CH_3OH в гексане в качестве элюента [9, 10]. Помимо взаимодействия π -электронов свой вклад в разделение внесло комплексообразование серебра с азотом.

Следующим шагом в развитии метода хроматографии с использованием серебра стало, очевидно, его применение в тонкослойном варианте разделения. Обычно в этом виде хроматографии ионообменные смолы не применяют и логично было бы использовать силикагель, пропитанный нитратом серебра. Изомеры октадеканоата разделяли на тонком слое силикагеля, обработанном нитратом серебра и приведенного в равновесие с воздухом, влажность которого составляла 30%. В качестве элюента служил толуол при -20°C [11], а в смеси хлороформ — метанол разделяли ненасыщенные кислоты из водорослей [12]. Смеси гексана с эфиром применяли для разделения изомеров октадекадиеноатов [13].

Бенс и сотр. [14] обнаружили интересный синергический эффект при использовании смеси бензола и циклогексана для перемещения триглицеридов по ТСХ-пластинке, покрытой силикагелем с нитратом серебра. Каждый из растворителей вызывал лишь незначительное перемещение, в то время как смесь 1:1 давала максимальные значения величин R_f . Тристеарин, не содержащий двойных связей в молекуле, характеризовался величиной $R_f=0,98$. Перемещение по пластинке тем меньше, чем больше двойных связей в молекуле.

Стероиды [15] и фосфолипиды [16] были разделены с помощью ТСХ на слое оксида алюминия или силикагеля с нитратом серебра. И в этом случае скорость перемещения по пластинке была тем ниже, чем выше степень ненасыщенности.

Хроматография с использованием серебра, в особенности ее тонкослойный вариант, приобрели популярность и широкое распространение при исследовании и разделении липидов [17]. Природные липиды, состоящие преимущественно из нейтральных липидов, фосфолипидов и гликолипидов, удалось отделить друг от друга и от других веществ. Эти сходные между собой соединения отличаются только длиной цепи, степенью ненасы-

ценности и (или) замещения составляющих их ацильных или алкильных звеньев.

Николс [18] в 1952 г. первым изучал комплексы серебра с липидами; он предложил использовать бумажную хроматографию с нитратом серебра в жидкой фазе для разделения *цис-транс*-изомеров олеата и элаидата.

Хроматографию липидов с применением серебра одновременно описали де Врие [19] и Моррис [20]. Де Врие разделял метиловые эфиры жирных кислот, триглицериды и стеролы на колонках с насадкой, обработанной серебром, тогда как Моррис на тонких слоях сорбента, обработанных нитратом серебра, разделял метиловые эфиры жирных кислот, а также эпокси- и гидроксизамещенных жирных кислот.

Смеси метиловых эфиров жирных кислот были разделены в соответствии с числом *цис*- и (или) *транс*-двойных связей в их молекулах; для выделения, обнаружения и определения свойств липидов было использовано большое число методик. Более того, природные липиды (нейтральные глицериды, фосфолипиды и гликолипиды) легче анализировать с помощью хроматографии с применением серебра, чем газовой хроматографией.

7.2. Другие методы разделения на солях металлов

В этом разделе мы рассмотрим ряд разделений, проводимых так же, как и в методе с применением серебра, но с другими металлами. Начнем с тонкослойной хроматографии. Стероиды были разделены на силикагеле, обработанном солями свинца и ртути [21], а нитротолуолы на силикагеле, смешанном с цинковой пылью [22]. Во втором случае роль активной неподвижной фазы играл оксид цинка; нитросоединения, по-видимому, восстанавливаются до соответствующих аминов.

Шимомура и Уолтон [23] провели широкое исследование возможностей разделения ароматических аминов методом ТСХ на сорбентах, содержащих ионы металла. Первоначально они пытались применять тонкоизмельченные неорганические ионообменники типа фосфата циркония и молекулярных сит, но на них было получено сильное размывание, плохое разрешение или то и другое одновременно. Очень хорошие результаты ими были получены на силикагеле и активированном оксиде алюминия, обработанными нитратами цинка, кадмия и никеля. Обработку проводили путем смешивания сухих сорбентов с двойным (по массе) количеством 10%-ных растворов нитратов металлов с последующим нанесением полученной суспензии на подложку и высушиванием при 110 °С. Пластинки сравнения

готовили путем нанесения только сорбента, силикагеля или оксида алюминия, без солей металлов. Обнаружение проводили с помощью нингидрина или путем гашения флуоресценции родамина Б. Были испытаны двадцать аминов и пять различных смесей растворителей, состоящих из неполярного компонента (бензол, тетрагидрид углерода, хлороформ) и полярного (метанол, ацетон, метилэтилкетон) компонентов. На пластинках с солями металла при меньшей скорости перемещения хроматографических зон аминов было достигнуто лучшее разрешение. Некоторые величины R_f представлены в табл. 7.1.

Таблица 7.1. Тонкослойное хроматографирование на сорбентах, обработанных солями металлов (величины R_f)

Соединение	Бензол — металл (5 : 1)		Бензол — метилэтилкетон (3 : 1)		Бензол — металл (20 : 1)	
	Силикагель		Силикагель		Оксид алюминия	
	SiO ₂	с Zn	SiO ₂	с Cd	Al ₂ O ₃	с Zn
Анилин	0,53	0,28	0,47	0,21	0,83	0,40
o-Толуидин	0,60	0,45	0,51	0,29	0,86	0,70
m-Толуидин	0,55	0,27	0,47	0,15	0,83	0,46
p-Толуидин	0,50	0,17	0,43	0,10	0,82	0,22
2,4-Ксидин	0,58	0,31	0,48	0,25	0,86	0,48
N-Метиланилин	0,68	0,56	0,62	0,57	—	—
N,N-Диметиланилин	0,74	0,67	0,69	0,61	—	—
N,N-Диэтиланилин	0,78	0,28	0,73	0,35	—	—
α-Нафтиламин	0,60	0,59	0,52	0,44	0,85	0,79
β-Нафтиламин	0,55	0,44	0,47	0,21	0,85	0,55
N-Метилнафтиламин	0,72	0,82	0,67	0,72	—	—
p-Фенетидин	0,49	0,11	0,31	0,06	0,70	0,12
Метил-p-аминобензоат	0,49	0,50	0,46	0,45	0,70	0,82

С помощью силикагеля, пропитанного основным ацетатом свинца, в тонком слое разделяли антоцианины, антоцианидины и сахара [24]; в качестве элюента применяли смесь бутанола, метанола и воды. В отсутствие соли только на силикагеле разделения не наблюдалось. На оксиде алюминия антоцианины разделялись с помощью 1%-ного раствора соляной кислоты в метаноле, что указывает на образование комплексов ионов алюминия с антоцианинами.

С помощью хлорида железа, адсорбированного на каолине, удалось эффективно выделить неосновные соединения азота из нефти. Эти соединения первоначально сорбировали на колонке, а затем элюировали 1,2-дихлорэтаном [26]. Они выходили в

виде комплексов железа(III), которые затем пропускали через сильноосновную макропористую смолу, где ионы железа сорбировались, высвобождая органические азотсодержащие соединения. Едва ли можно с уверенностью сказать, что такую последовательность операций следует называть лигандным обменом, но здесь соединения не сорбируются одним лишь катионообменником; сорбция зависит именно от образования комплексов железа(III).

В своих публикациях по лигандному обмену Гельферих высказал мнение, что этот метод должен быть применим и к газовой хроматографии. Газовая хроматография с применением серебра описана в предыдущем разделе. Пексок и Вэри [27] показали, что фталоцианины металлов, диспергированные в силиконовом масле, можно использовать как неподвижную фазу в газожидкостной хроматографии. Амины, спирты и нитрилы селективно удерживаются фталоцианинами меди(II), цинка, железа(II), кобальта(II), никеля(II), алюминия и хрома(III), в то время как присутствие этих соединений в силиконовом масле не сказывается на удерживании углеводов.

В 1959 г. Барбер и сотр. [28] применяли жидкие пленки стеаратов металлов на целите в качестве неподвижных фаз в газовой хроматографии. В качестве газа-носителя использовали смесь аммиака и водорода. По сравнению с апиезоновым маслом стеараты металлов сильно удерживают амины, а также спирты. Примечательно, что первичные алифатические амины с линейной цепью удерживаются сильнее, чем с разветвленной. Такой же эффект наблюдался и в жидкостной хроматографии с ионообменными смолами, заряженными ионами металлов.

В лаборатории Уолтона были предприняты попытки использования макропористых смол в качестве неподвижных фаз в газовой хроматографии, а также проведены эксперименты с жидким ионообменником ди(2-этилгексил)фосфатом, насыщенным ионами металла и нанесенным на хромосорб. Если в качестве газа-носителя использовать гелий, то сорбированные амины вытеснялись с трудом. Аммиак и смесь аммиака с гелием вытесняли амины со значительными временами удерживания, но пики были сильно асимметричными.

Литература

1. Bradford B. W., The chromatographic analysis of hydrocarbon mixtures, J. Inst. Petrol., **41**, 80 (1955).
2. Bednas M. E., Russell D. S., A study of silver nitrate solutions in gas chromatography, Can. J. Chem., **36**, 1272 (1958).

3. Smith B., Ohlson R., Gas chromatographic separation of 3- and 4-methyl-1-pentene, Acta Chem. Scand., **13**, 1253 (1959).
4. Chapman L. R., Kuennel D. F., Liquid-solid and capillary gas-liquid chromatography of internal olefin isomers, Anal. Chem., **37**, 1598 (1965).
5. Wurstler C. F., Copenhagen J. H., Shafer P. R., Separation of the methyl esters of oleic, linoleic, and linolenic acids by column chromatography using cation exchange resin containing silver ion, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 513 (1963).
7. Emken E. A., Scholfield C. R., Davison V. L., Frankel E. N., Separation of conjugated methyl octadecadienoate and thienoate geometric isomers by silver-resin column and preparative gas-liquid chromatography, J. Am. Oil Chem. Soc., **44**, 373 (1967).
8. Schofield C. R., Emken E. A., Isolation of methyl *cis*-15-octadecanoate by chromatography on a silver-treated macroreticular exchange resin, Lipids, **1**, 235 (1966).
9. Vivilecchia R., Thiebaud M., Frei R. W., Separation of polynuclear aza-heterocyclics by high-performance liquid chromatography, using a silver-impregnated adsorbent, J. Chromatogr. Sci., **10**, 411 (1972).
10. Frei R. W., Beall K., Cassidy R. M., Determination of aromatic nitrogen heterocycles in air samples by high-speed liquid chromatography, Mikrochim. Acta, **1974**, 859.
11. Morris L. J., Wharry D. M., Hammond E. M., Chromatographic behavior of isomeric long-chain aliphatic compounds II — argentation thin-layer chromatography of isomeric octadecenoates, J. Chromatogr., **31**, 69 (1967).
12. Dutta S. P., Barnta A. K., Separation of *cis*- and *trans*- isomers of α,β -unsaturated acids by thin-layer chromatography, J. Chromatogr., **29**, 263 (1967).
13. Christie W. W., Chromatography of isomeric methylene interrupted methyl *cis,cis*-octadecadienoates, J. Chromatogr., **31**, 69 (1967).
14. Burns D. T., Stretton R. J., Shepherd G. F., Dallas M. S. J., Synergistic complexation effects in thin-layer chromatography of certain triglycerides on silica impregnated with silver nitrate, J. Chromatogr., **44**, 399 (1969).
15. Kammerek R., Lee W.-H., Paliokas A., Schroepfer G. J., Thin-layer chromatography of sterols on neutral alumina impregnated with silver nitrate, J. Lipid Res., **8**, 282 (1967).
16. Hoebet S. P., Viswanathan C. V., Lundberg W. O., Fractionation of a natural mixture of alkenyl acyl and diacyl ethanolamine phosphatides by argentation adsorption thin-layer chromatography, J. Chromatogr., **34**, 195 (1968).
17. Morris L. J., Nichols B. W., Argentation thin-layer chromatography of lipids, Prog. Thin-Layer Chromatogr. Relat. Methods, **1**, 74 (1972).
18. Nichols P. L., Coordination of silver ion with methyl esters of oleic and elaidic acids, J. Am. Chem. Soc., **74**, 1091 (1952).
19. de Vries B., Paper presented at Sixth Congr. Int. Soc. Fat Research, London, April 1962; as cited in Chem. Ind. (London), **1962**, 1049.
20. Morris L. J., Paper presented at Sixth Congr. Int. Soc. Fat Research, London, April 1962; as cited in Chem. Ind. (London), **1962**, 1238.
21. Stahl E., Dunnschricht-Chromatographie, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, 1967, p. 534.
22. Yasuda S. K., Separation and identification of tetryl and related compounds by two-dimensional thin-layer chromatography, J. Chromatogr., **50**, 453 (1970).
23. Shimomura K., Walton H. F., Thin-layer chromatography of amines by ligand exchange, Sep. Sci., **3**, 493 (1968).
24. Pifferi P. G., Thin-layer chromatography of sugars, anthocyanins and anthocyanidines on Kieselgel G impregnated with basic lead acetate, J. Chromatogr., **43**, 530 (1969).

25. *Birkhofer L., Kaiser C., Donikem M.*, Trennung von Athocyangemischen Durch Komplexbildung an Aluminiumoxid, *J. Chromatogr.*, **22**, 303 (1966).
26. *Jewell D. M., Snyder R. E.*, Selective separation of «nonbasic» nitrogen compounds from petroleum by anion exchange of ferric chloride complexes, *J. Chromatogr.*, **38**, 351 (1968).
27. *Pescok R. L., Vary E. M.*, Gas-solid-liquid chromatography: dispersed metal phthalocyanines as substrate, *Anal. Chem.*, **39**, 287 (1967).
28. *Barber D. W., Phillips C. S. G., Tusa F. F., Berdin A.*, The chromatography of gases and vapours. VI. Use of the stearates of bivalent Mn, Co, Ni, Cu and Zn as column liquids in gas-liquid chromatography, *J. Chem. Soc.*, **1959**, 18.

ВЫВОДЫ

Дж. Навратил

В книге представлено расширенное толкование лигандообменной хроматографии как общего метода, включающего различные методики разделения органических соединений на основе процессов комплексообразования с ионами металлов. Метод ЛОХ универсален и отличается высокой селективностью, особенно стереоселективностью. Условия эксперимента можно варьировать в широких пределах, что позволяет сильно изменять селективность. Конечно, ЛОХ имеет свои практические трудности, но они преодолимы в обозримом будущем. Основные трудности ЛОХ описаны ниже.

Медленный массоперенос. Именно этим обусловлены сильное размывание хроматографических зон и низкие объемные скорости. Эта же проблема, возникающая при использовании традиционных ионообменных смол, обусловлена как медленной диффузией, так и медленным протеканием химических реакций. Для того чтобы избежать низкой скорости лигандного обмена с ионом металла в фазе смолы, нужно проводить лигандный обмен исключительно в подвижной фазе. Медленная диффузия не так заметна при использовании мелкодисперсных насадок и различных привитых фаз как ионных, так и неионных.

Отсутствие жесткости и химической стабильности у неподвижных фаз. Одной из лучших смол для ЛОХ является акриловая смола био-рекс 70. К сожалению, эта смола неустойчива при больших скоростях потока и градиентах давления, поскольку ее гранулы недостаточно жесткие. Жесткие привитые фазы на основе силикагеля устойчивы к большим перепадам давления, но химическая стабильность этих сорбентов в водных растворах с рН более 8 недостаточно высока, а именно такие элюенты часто используются в ЛОХ. Эти трудности, по видимому, можно преодолеть, синтезировав пористый полимер с анионными функциональными группами, сочетающий химическую и механическую устойчивость с хорошими хроматографическими свойствами: однородным распределением по поверхности активных участков и быстрым массопереносом. Из доступных в настоящее время неионогенных полимеров основное место принадлежит макропористому полистиролу с хорошими хро-

матографическими свойствами, но эти свойства несколько ухудшаются при прививке ионных групп. Пористые полимеры с функциональными карбоксильными группами должны найти широкое применение в ЛОХ.

Обнаружение. Используемые в ЛОХ элюенты содержат ионы металла и вытесняющие лиганды, в большинстве случаев затрудняющие обнаружение. Проведение специальной химической обработки элюата, выходящего из хроматографической колонки, помогает решить только часть проблем обнаружения. Чаще других в ЛОХ применяют детекторы, основанные на измерении УФ-излучения переменной длины волны и флуоресцентного излучения. Возможно, в результате проводимых исследований будет сконструирован специальный детектор для лигандообменной хроматографии.

Коротко об авторах

Вадим Александрович Даванков, докт. хим. наук, профессор, работает в ИНЭОС АН СССР с 1962 г., где им были подготовлены и защищены кандидатская и докторская диссертации. С 1975 г. Даванков возглавляет лабораторию стереохимии сорбционных процессов.

К основной сфере научных интересов Даванкова относится разделение оптических изомеров методом колоночной жидкостной хроматографии и с помощью иммобилизованных ферментов. В 1968 г. при участии С. В. Рогожина лигандообменная хроматография была запатентована как общий метод расщепления рацематов на пары энантиомеров. В дальнейшем были предприняты широкие исследования структуры и энантиоселективности комплексов двухвалентной меди с аминокислотами и диаминами, а также поиск новых типов полимерных сеток, завершившийся созданием макросетчатого изопористого полистирола, сверхсшитого полистирола стирсорб и других полимерных систем. Список научных трудов Даванкова включает более 250 публикаций.

В. А. Даванков — заместитель председателя Научного совета по хроматографии АН СССР и возглавляет секцию жидкостной хроматографии этого совета. В 1978 г. награжден медалью им. Цвета, учрежденной Академией наук СССР.

Джеймс Д. Навратил защитил диссертацию по химии в университете Боулдера (шт. Колорадо) и с 1961 г. начал работать в фирме Rockwell International, занимая различные должности в аналитических лабораториях и научно-исследовательском отделе, а в настоящее время занимает пост руководителя химических исследований. С 1978 по 1981 г. Навратил работал в Международном агентстве по атомной энергии в Вене. Он является

также адъюнкт-профессором факультета химии и геохимии Горной школы шт. Колорадо (Голден). В 1977 г. был признан лучшим инженером-исследователем фирмы Rockwell International.

Основная сфера научных интересов Навратила — химическое разделение и химия актиноидов. Он основал и стал одним из издателей журнала «Экстракция растворителями и ионный обмен» (Solvent Extraction and Ion Exchange), одновременно работая в редакционных советах семи журналов. Навратил активный член Американского химического общества, основал секцию научных и технологических исследований в области разделения и стал ее председателем. Навратил — лауреат премии Американского химического общества шт. Колорадо (1984 г.) и двух премий IR-100 (1983 и 1985 г.). Он автор и соавтор более 100 научных публикаций, совместно с другими специалистами отредактировал девять книг и написал в соавторстве книгу «Сорбенты на основе пенополиуретана в науке о разделении» (Polyurethane Foam Sorbents in Separation Science).

Харолд Ф. Уолтон, доктор философии Оксфордского университета, работал на химическом факультете университета шт. Колорадо с 1947 г. до выхода на пенсию в 1982 г., после чего провел несколько месяцев в парижской Высшей школе физики и химии по приглашению проф. Р. Россе. Уолтон вернулся в университет шт. Колорадо и занял должность старшего научного сотрудника в Объединенном институте исследований окружающей среды и заслуженного профессора в отставке по химии. Он одним из первых начал заниматься лигандообменной хроматографией и продолжал исследования в этой области вплоть до своей отставки. В 1976 г. был награжден премией Американского химического общества (секция шт. Колорадо).

Уолтон преподавал в нескольких странах Латинской Америки, больше всего в Перу, где был избран чл.-корр. Перуанского химического общества и почетным профессором университетов Труджило и Сан Маркос в Лиме.

Уолтон автор семи книг, в том числе (совместно с В. Риманом) — книги «Ионообменная хроматография в аналитической химии» (М.: Мир, 1973), написал несколько глав в изданиях, подготовленных совместно с другими авторами, выпустил в свет около 120 научных статей. Он занимается ионным обменом, хроматографией, растворами электролитов, электрохимией, геохимией и анализом загрязнений воды.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агенты**
 силилирующие 144—145
 сшивающие 101—104
 хиральные расщепляющие 157, 165, 189, 224
- Азиридины**, разделение 58—61
 коэффициенты распределения 59
- Алкалоиды**, разделение 64—65
- Алколамины**, разделение 58—61
- Альдегид о-фталевый** 28, 176
- Аминокислоты**
 анализ 80, 177—179, 182—183
 — полный 72—73, 81—82
 взаимодействие с хлорметилированным полистиролом 102—120
 комплексы 71—76, 82, 105, 119, 121, 132, 133, 177, 183, 201
 меченные ¹⁴C 74
 немодифицированные, расщепление 166—168, 180
 обнаружение 27—29
 отделение от аминоксахаров 75
 — N-метиламинокислот 82
 — пептидов на полимерных сорбентах 70—76
 — модифицированных силикагелях 76—83
 порядок элюирования энантиомеров 154, 166—171, 180, 193
 привитые к полистиролу 101—120, 132, 133, 136
 — силикагелю 23, 84
 разделение 10, 22, 62—64, 72, 73, 77, 201
 — на полимерных сорбентах 70—76
 — силикагеле 25
- рацемические, расщепление 120—140, 147, 149, 154—160, 175, 188—192
 — методом ТСХ 162—164
 — селективность 127, 128, 135, 140, 146
 — влияние добавок 173—179
 реакции 102—103
 удерживание на сорбенте 146, 158
 циклические 140
- Аминоссахара**
 отделение от аминокислот 75
 — пептидов 80
 порядок элюирования 64
 разделение 22, 61—64
- Аминофосфоновые кислоты** привитые 125
- Амины**
 алифатические 49—50
 — коэффициенты распределения 51
 — порядок элюирования 30, 50
 ароматические 51—55
 — времена удерживания 55
 — детектирование 26
 — меченные изотопами 27
 — порядок элюирования 30, 51—53
 — разделение 54—55, 280—281
 ассоциация с металлами 34—37
 комплексы 8, 49
 разделение 49—66
 — методом ТСХ 54
 элюирование из системы металл—сорбент 31
- Аммиак** как лиганд 32—34
- Амфетаминовые препараты**, разделение 52—53
- Анализатор аминокислотный** лигандообменный 71—73, 177
- Анилин** 54—55, 281
- Антоцианины**, разделение 281
- Белки**, разделение 83—91
- Бис-комплексы** неподвижные, устойчивость 203—205
- Бутиламины**, разделение 50—51
- Вещества** поверхностно-активные (ПАВ) 272
- Взаимодействие**
 двухточечное 97, 194
 трехточечное 97—101, 185
- Винная кислота** привитая 22, 156
- Гидразины**, разделение 58—62
- Гидратация ионов** 43—44
- Гидроксикислоты**
 комплексы 270
 разделение 23, 271
 сорбция 271
- Глюкоза**
 анализ 255
 отделение от фруктозы 265
 сорбция 44
 удерживание на полистироле 264—265
- Гомарин** 42
- Дансиламинокислоты**
 разделение смесей 81, 163, 170—173, 177—179
 распознавание хиральное 196
 рацемические, расщепление 143—146, 175, 176, 200
 удерживание 200
- Детектирование**, способы 25—29, 57
- Диалкилсульфиды**, разделение 252—253
- 1,3-Диаминогидроксипропан** 7—8
- Диамины**
 алифатические 55—57
 комплексообразование 35—36
 порядок элюирования 30, 56
 разделение 49
- Ди- и трипептиды**, разделение 24, 81
- Диолы**, порядок элюирования 228
- Дитиолы**, разделение 250—251
- ДНК и РНК**, разделение 65
- Европий (III)**, комплексы 222
- Железо (III)**, комплексы 18, 23, 156, 281, 282
 с сахарами 267
 — фенолами 268
- Ионы**
 комплексные, расщепление 206—220
 металлов в ЛОХ 16—18
 — на неподвижных фазах 82
- Ирвинга — Вильямса* ряд 16
- Кадмий (II)**, комплексы 17, 23, 36
- Кальций (II)**, комплексы 18, 43
- Катехоламины**, разделение 22
- Катионы**
 «жесткие» 16, 18
 «мягкие» 16, 17
- Кислоты**
 ароматические, разделение 272
 карбоновые, комплексы 269—272
 — порядок элюирования 270
- Кобальт (II)**, комплексы 223, 282
- Кобальт (III)**, комплексы 14, 16, 17, 22, 206—220
- Комплексы**
 диастереомерные, образование 198—206
 металл — аммиак в фазе полистирола 32—35
 металл — олефин 278—282
 оценка устойчивости 38
 разнолигандные тройные 172, 181, 190, 195

- рацемические, расщепление 207
стабильные, обмен лигандами 206—220
тридентатные 260
хиральные в подвижной фазе 164—185
— расщепление 229
- Коэффициенты емкости 201
Кремнезем, растворимость 26
- Лиганд**, определение 8—9
Лигандный обмен во внешней сфере 206—220
Лигандообменники хиральные полимерные 101—138
увеличение набухаемости 105
- Лиганды**
азотсодержащие 65—66
кислородсодержащие 253—273
не содержащие азота 250—273
оптически-активные, связывание 143—144
привитые к силикагелю 138—163
серусодержащие 250—253
хиральные, покрытие силикагеля 156—163
- Линеатин, расщепление 222
Липиды, разделение 279, 280
- Марганец (II)**, комплексы 223, 229
- Медь (II)**, комплексы 7, 8, 16—17, 21—23, 29, 79, 82, 105, 156, 180, 222, 230, 282
разнолигандные 135—136, 185—198
— константы устойчивости 203—205
с аминокислотами 71—76, 82, 105, 119, 121, 132, 133, 177, 183, 201
— аммиаком 7, 8, 32—34, 49
— N-бензилпропином 131—132
— диаминами 134—135
— лизинном 105
— пептидами 71
— сахарами 267
— этилендиамином 37—40
- N-Метиламинокислоты, отделение от аминокислот 82
Метиламины, разделение 50—51
R,S-3-Метилциклопентен, расщепление 221
Миндальная кислота 121—124, 130, 143, 160, 184, 271
Модификаторы хиральные 157—158
Модифицирование насадки 160
- Насадки полимерные** 73—75
Нефтепродукты, разделение 57, 250, 272
Никель (II), комплексы 16, 17, 30, 222, 223—228, 270, 282
Нуклеозиды, разделение 65—66, 273
Нуклеотиды, разделение 22, 65—66, 273
- Оксираны хлорированные**, расщепление 225—227
- Олефины**
комплексы с металлами 278—282
разделение 49
эпоксидирование 222
- Олигосахариды**
анализ 253—267
порядок элюирования 256, 257, 264, 265
удерживание на полистироле 264
- Папаин**, разделение 251
- Пептиды**
комплексы с медью (II) 71
отделение от аминокислот 70—76
— — — на модифицированных силикагелях 76—83
— — — аминокислотами 80
разделение 24, 79
- Пиколин**, комплексы 36, 55
Пиридин, комплексы 38, 40
Пиридоксаль 27—28
Пластинки хиральные 162—163
Платина (IV), комплексы 14, 17
Полиамины
ароматические 55—57

- порядок элюирования 30, 56
Полимеры макросетчатые 104—120
Полистирол хлорметилованный поперечная сшивка 103—104
синтез хиральных сорбентов 101—120, 152—153
Пролин, изомеры оптические 11—12
Пропиламины, разделение 51
- Равновесие металл — лиганд** 32—40
Разбавители 151—152
Распознавание энантиомеров хиральное 98, 146—148, 185—198, 214—215
Рацематы, расщепление с помощью ТСХ 164—165
Родий (I), комплексы 220—221
Ртуть (II), комплексы 17—18
- Сахара**
анализ 253—267
комплексы 259—260, 261, 267
распределение 44
удерживание на полистироле 264
- Свинец (II)**, комплексы 260
Серебро (I), комплексы 17
с аммиаком 32—34
— олефинами 278—282
— этилендиамином 35, 36, 40
- Силикагели**
модифицированные 76—83
обработанные солями металлов 280—282
с привитыми группами 22, 23, 81
растворимость 24—25
фазы хиральные на 138—156, 198—200, 252, 271
— — — покрытие 156—163
- Системы обращенно-фазовые** 80, 82, 157, 159, 162, 165—185, 193, 197, 206
- Смоли с привитыми группами** 106—117
- Соединения органические неионные** 40—44
Сорбенты
конфигурационная стабильность 119
характеристики 18—25, 151
хиральные, разрешающая способность 125—126, 129, 131, 132
— расщепление комплексов 206—220
— синтез 104—120, 148, 151 213
— стабильность 152
- Спермидин** 56—57
Спермин 56—57
Стероиды, разделение 279
Сурьма (III), комплексы с гартратом 214—220
- Термодинамика лигандного обмена** 198—206
- Тетрагидрофураны**, разделение алкилзамещенных 224
- Тираны рацемические**, расщепление 227—228
- Тиолы**, разделение 250—251
- Тиомочевина**, комплексы 17, 36, 38, 40
- Титаны рацемические**, расщепление 227—228
- Тригонеллин** 42—44
- Углеводороды ароматические**, распределение 41
- Углеводы**. См. также Сахара
анализ 253—268
хиральные 209—212
- Удерживание лигандов** 200—205
- Фазы хиральные**
на основе силикагеля 138—156
— — — стабильность 152—153
неподвижные 101—163
полимерные 152—154
привитые хелатирующие 80
синтез 101—120
с основными аминогруппами 80
- Фенолы** 43—44
комплексы 268
разделение 269

- Феромоны 223—225, 229
 Фосфолипиды, разделение 279
- Хелаты металлов как хиральные до-
 бавки 166—172
- Хром(III), комплексы 14, 17, 209—
 211, 220, 267, 282
- Хроматография
 «аффинная на лабильных лиган-
 дах» 88—91
 газовая, разделение энантимеров
 220—230
 лигандообменная, недостатки 284—
 285
 — определение 7, 13
 «металло-хелат-аффинная» 83—91
- Цвиттер-ионы аминокислот 42—43
- Цинк(II), комплексы 16, 17, 36, 38,
 282
 с гидрофобным триамином 14
- Элюенты 25—29
 «хиральные» 165—174, 192—193,
 198, 207—212, 216
- Элюирование, способы 84—85, 120—
 121
- Энантиоселективность, определение
 97—101
- Эпоксиды асимметрические, разделе-
 ние 221—222
- Этаноламины
 коэффициенты распределения 59
 разделение 58—61
 связывание 35
- Этилендиамин
 комплексы 35—40
 удерживание 56
- Этиленимин 59—60
- Эфиры
 метиловые аминокислот 112
 — жирных кислот 280
 циклические, расщепление 223—225

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие	6
Глава 1. Введение: История, основные принципы, терминология. Х. Уол- тон, В. А. Даванков	7
Литература	15
Глава 2. Общие вопросы. Х. Уолтон	16
2.1. Условия эксперимента	16
2.1.1. Ионы металла	16
2.1.2. Сорбенты	18
2.1.3. Элюенты и обнаружение	25
2.1.4. Порядок элюирования	29
2.2. Равновесие металл—лиганд в фазе сорбента и в растворах	32
2.3. Распределение неионных органических соединений между сор- бентами и растворами	40
Литература	44
Глава 3. Разделение аминов. Дж. Навратил	49
3.1. Алифатические амины	49
3.2. Ароматические амины	51
3.3. Алифатические диамины и полиамины	55
3.4. Азиридины, алканоламины и гидразины	58
3.5. Аминосахара	61
3.6. Алкалоиды	64
3.7. Другие азотсодержащие лиганды	65
Литература	66
Глава 4. Разделение аминокислот, пептидов и белков. В. А. Даванков	70
4.1. Разделение аминокислот и пептидов на полимерных сорбентах	70
4.2. Разделение аминокислот и пептидов на модифицированных си- ликагелях	76
4.3. Разделение белков с помощью «металло-хелат-аффинной» хро- матографии	83
Литература	91
Глава 5. Разделение энантимеров. В. А. Даванков	97
5.1. Введение и основные понятия; трехточечное взаимодействие	97
5.2. Хиральные неподвижные фазы	101

5.2.1. Хиральные полимерные лигандообменники	101
5.2.2. Хиральные фазы на основе силикагеля	138
5.2.3. Покрытие силикагеля хиральными лигандами	156
5.3. Хиральные комплексы в подвижной фазе	164
5.4. Механизм хирального распознавания энантиомеров	185
5.5. Термодинамика образования диастереомерных сорбционных комплексов	198
5.6. Лигандный обмен во внешней координационной сфере стабильных комплексов	206
5.7. Разделение энантиомеров методом газовой хроматографии	220
Литература	230
Глава 6. Лиганды, не содержащие азота. Х. Уолтон	250
6.1. Серусодержащие лиганды	250
6.2. Кислородсодержащие лиганды	253
6.2.1. Углеводы и полигидроксисоединения	253
6.2.2. Фенолы	268
6.2.3. Карбоновые кислоты	269
6.2.4. Прочие кислородсодержащие лиганды	272
Литература	273
Глава 7. Комплексы металл — олефин. Дж. Навратил	278
7.1. Хроматография с применением серебра	278
7.2. Другие методы разделения на солях металлов	280
Литература	282
Глава 8. Выводы. Дж. Навратил	285
Предметный указатель	288

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».

Научное издание

Вадим Александрович Даванков,
Джеймс Д. Навратил, Харолд Ф. Уолтон

ЛИГАНДОБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Заведующий редакцией академик О. А. Реутов
Зам. зав. редакцией Н. А. Козырева
Старший научный редактор Б. М. Комарова
Мл. научный редактор Н. Н. Устякова
Художник В. С. Потапов
Художественный редактор М. Н. Кузьмина
Технические редакторы Н. И. Манохина, А. Ю. Жигалова
Корректор Л. Д. Панова

ИБ № 6641

Сдано в набор 18.04.89. Подписано к печати 11.10.89. Формат 60×90¹/₁₆. Бумага книжно-журн. Печать высокая. Гарнитура литературная. Объем 9,25 бум. л. Усл. печ. л. 18,5. Усл. кр.-отт. 18,5. Уч.-изд. л. 20,02. Изд. № 3/5811. Тираж 2700 экз. Зак. 997. Цена 3 р. 90 коп.

Издательство «Мир» В/О «Совэкспорткнига» Государственного комитета СССР по печати. 129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по печати. 113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.