

РГБ ОД

25 ДЕК 2001

*На правах рукописи*

**Ананьева Ирина Алексеевна**

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ  
ХРОМАТОГРАФИЯ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ  
АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ**

02.00.02 – Аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук



Москва – 2001

Работа выполнена в лаборатории хроматографических методов анализа кафедры  
аналитической химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор Шпигун О.А.  
кандидат химических наук, доцент Шаповалова Е.Н.

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор Яшин Я.И.  
кандидат химических наук Боганов А.М.

Ведущая организация:

Институт физической химии РАН

Защита состоится 26 декабря 2001 года в 16 ч. 10 мин. в аудитории 344 на заседании  
диссертационного совета Д.053.05.60 по химическим наукам при Московском  
государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу:

119899, Москва, Ленинские горы, МГУ, Химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ им  
М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 26 ноября 2001 года.

Отзывы и замечания просьба отправлять по адресу:

119899, Москва, Ленинские горы, МГУ, Химический факультет, кафедра  
аналитической химии, ученому секретарю диссертационного совета.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат химических наук



Торочешникова И.И.

E072.511c d51.7, 0

**Актуальность темы.** Оптически активные соединения играют исключительно важную роль во многих биохимических процессах, их определение имеет принципиальное значение для аналитической химии, теоретической органической химии, медицины, фармакологии. Контроль оптической чистоты производимых лекарственных средств в настоящее время введен во всех промышленно развитых странах. Именно высокоэффективная жидкостная хроматография позволяет решить сложнейшие проблемы анализа энантиомерного состава хиральных соединений, препаративного получения оптически чистых изомеров различных классов соединений. Хроматографическое разделение энантиомеров принципиально возможно только в системах, содержащих хиральный селектор, призванный распознавать пространственную конфигурацию двух идентичных по всем своим физическим и химическим свойствам изомеров. В связи с этим все сильнее возрастает интерес к разработке новых хиральных селекторов.

Вследствие сложности явления хирального распознавания «универсального» сорбента, который бы позволил решить все проблемы разделения оптических изомеров, не существует, каждый сорбент имеет свои преимущества, свою область применения, свои недостатки. Для создания эффективных хроматографических методов разделения энантиомеров необходимо более углубленное изучение процессов хирального распознавания энантиомеров. Весьма перспективны для создания хиральных неподвижных фаз полисахариды и, в частности,  $\beta$ -циклодекстрины и его производные. Важным достижением в создании новых хиральных селекторов было открытие макроциклических антибиотиков, которые предоставляют широкие возможности для разделения различных классов энантиомеров благодаря сложному механизму хирального распознавания на хиральной поверхности.

Для рационального выбора хирального селектора и условий энантиоразделения необходимо четкое понимание процессов, происходящих во время хроматографического разделения, и влияние на эти процессы различных факторов. Поэтому важно изучение закономерностей удерживания и разделения энантиомеров и возможности предсказания классов соединений, к которым будет проявлять энантиоселективность тот или иной селектор.

Актуальна проблема разделения энантиомеров аминокислот, играющих важную роль в процессах питания и входящих в состав белков в организме человека. Определение и разделение биогенных аминов, аминспиртов и их энантиомеров, которые участвуют в метаболических процессах в организме и используются как лекарственные препараты,

является одной из наиболее важных задач в биохимии. В ряде случаев оптические изомеры не могут быть разделены прямым путем и их переводят в форму производных.

Необходимость разделения энантиомеров фармацевтических препаратов, таких как  $\beta$ -блокаторы, обусловлена их различным фармакологическим действием в биологических системах.

**Цель работы:** изучение закономерностей хроматографического поведения и выбор условий разделения энантиомеров аминокислот с предварительной дериватизацией и без нее, биогенных аминов, аминоспиртов и N-гидроксипропиламинов на хиральных неподвижных фазах и разделение биогенных аминов и аминоспиртов на различных неподвижных фазах. Для достижения этой цели были решены следующие задачи:

- изучена возможность хирального распознавания различных классов энантиомеров на новом хиральном селекторе – аминированном  $\beta$ -циклодекстрине в обращенно-фазовом и полярно-органическом режимах жидкостной хроматографии;
- изучены особенности хроматографического удерживания и энантиоразделения производных аминокислот на циклодекстриновых и антибиотиковых неподвижных фазах;
- установлена корреляция хроматографических параметров с параметром гидрофобности производных аминокислот на циклодекстриновых и антибиотиковых неподвижных фазах;
- исследованы особенности хроматографического поведения аминокислот на циклодекстриновых и антибиотиковых неподвижных фазах;
- изучены особенности разделения N-гидроксипропиламинов, биологически активных аминов и аминоспиртов;
- выбраны условия использования различных хиральных селекторов для определения оптической чистоты коммерчески доступных лекарственных форм и химических препаратов аминокислот.

**Научная новизна.** Изучены закономерности удерживания и энантиоразделения производных аминокислот на циклодекстриновых и антибиотиковых неподвижных фазах как функции гидрофобности сорбатов.

Предложен новый хиральный селектор - аминированный  $\beta$ -циклодекстрин. Показано, что аминированный  $\beta$ -циклодекстрин в отличие от немодифицированного  $\beta$ -циклодекстрина проявляет селективность к энантиомерам N-tert-бутоксикарбонил-производным (БОК) аминокислот.

Сопоставлена распознавательная способность хиральных сорбентов на основе макроциклических антибиотиков. Исследовано влияние различия в структурах тикопланина и тикопланина агликона на энантиоселективность неподвижной фазы.

Найдены условия хроматографического разделения энантиомеров некоторых биогенных аминов и аминоспиртов, а также их смесей.

**Практическая значимость работы.** Получены данные по разделению энантиомеров производных аминокислот и самих аминокислот на колонках с немодифицированным  $\beta$ -циклодекстрином, аминированным  $\beta$ -циклодекстрином и макроциклическими антибиотиками.

Результаты изучения энантиоразделения аминокислот на макроциклических антибиотиках позволили выбрать условия разделения энантиомеров аминокислот и определения оптической чистоты коммерчески доступных реактивов. Найдены условия хроматографического определения и разделения лекарственного препарата адреналина,  $\beta$ -блокатора атенолола, химических препаратов аминокислот и их оптической чистоты.

**На защиту выносятся следующие положения:**

1. Данные по изучению хроматографического поведения энантиомеров производных аминокислот на циклодекстриновых неподвижных фазах в обращенно-фазовом и полярно-органическом режимах жидкостной хроматографии. Результаты сопоставления разделения энантиомеров производных аминокислот на немодифицированном  $\beta$ -циклодекстрине и аминированном  $\beta$ -циклодекстрине.

2. Выводы о закономерностях удерживания и энантиоразделения производных аминокислот как функции гидрофобности сорбатов.

3. Закономерности энантиоразделения аминокислот на антибиотиковых хиральных неподвижных фазах.

4. Сравнение закономерностей энантиораспознавания на циклодекстриновых и антибиотиковых хиральных неподвижных фазах.

5. Выбор условий разделения энантиомеров  $\beta$ -блокаторов, биогенных аминов, аминоспиртов и их смесей.

6. Условия определения оптической чистоты некоторых соединений.

**Апробация работы.** Основное содержание работы изложено в 16 публикациях. Результаты исследований докладывались на «Всероссийском симпозиуме по химии поверхности, адсорбции и хроматографии (Москва, 1999 г.), Всероссийской конференции «Химический анализ веществ и материалов» (Москва, 2000 г.), «10<sup>th</sup> Russian-Japan Joint

Symposium on Analytical Chemistry» (Moscow – St.Petersburg., 2000), IX Международной конференции по теоретическим вопросам адсорбции и адсорбционной хроматографии «Современное состояние и перспективы развития теории адсорбции» (Москва, 2001 г.), II Международной научно-технической конференции «Высокие технологии в промышленности России» (Москва, 2001 г.), 13<sup>th</sup> International Symposium “Chirality 2001” (Orlando, Florida USA, 2001), International Congress on Analytical Sciences (Tokyo, Japan, 2001), 11<sup>th</sup> International Symposium “Advanced and Application of Chromatography in Industry” (Bratislava, Slovak Republic, 2001), 2<sup>nd</sup> International Symposium “Separation in BioSciences” (Praha, Czech republic 2001), VIII Всероссийском симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии и капиллярному электрофорезу (Москва, 2001 г.), VI Международной конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана» (Москва, 2001 г.).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 4 статьи и 12 тезисов докладов.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора 5 глав экспериментальной части, общих выводов, приложения и списка цитируемой литературы. Материал диссертации изложен на 188 страницах машинописного текста содержит 84 рисунка и 52 таблицы, в списке цитируемой литературы 105 наименований.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### *Обзор литературы*

Обсуждены особенности теории хирального распознавания, рассмотрены основные типы взаимодействий, возможных в процессах энантиоселективного распознавания.

Проанализированы особенности строения хиральных неподвижных фаз на основе полисахаридов, их производных и макроциклических антибиотиков, рассмотрены возможности их применения в различных режимах жидкостной хроматографии для разделения оптически активных соединений.

### *Экспериментальная часть*

В работе использовали отечественный жидкостной микроколоночный хроматограф «Милхром», оснащенный спектрофотометрическим детектором «ОМБ» (190-360 нм) и стальными колонками (64x2 мм), жидкостной хроматограф фирмы «Элсико» со спектрофотометрическим детектором (190-360 нм) и стальные колонки (150x3 мм), жидкостной хроматограф фирмы «Shimadzu» SLC-10A со спектрофотометрическим

детектором фирмы «Shimadzu» SPD-10AV, насосом LC-10AT и интегратором «Shimadzu» CR601 и стальные колонки (250x4.6 мм), жидкостной хроматограф фирмы «Яуза» с имперометрическим детектором и стальные колонки (250x4.6 мм). Объемы вводимой пробы и объемные скорости потока элюента составили соответственно: для хроматографа «Милихром» – 10 мкл и 100 мкл/мин, для хроматографа фирмы «Элсико» – 20 мкл и 0.5 мл/мин, для хроматографа фирмы «Shimadzu» – 20 мкл и 1.0 мл/мин, для хроматографа фирмы «Яуза» – 20 мкл и 1 мл/мин.

В качестве неподвижных фаз применяли сорбенты: Silasorb C18 (10 мкм) фирмы «Lachema» (Чехия); силикагель Silasorb 600 фирмы «Lachema» (Чехия), модифицированный хитозаном, фенилзотиоцианатом хитозана и аминированным  $\beta$ -циклодекстрином, предоставленные центром «Биоинженерия РАН»; «Cyclobond 2000», «Chirobiotic T», «Chirobiotic V» и «Chirobiotic Tag» фирмы «Advanced Separation Technology» (США).

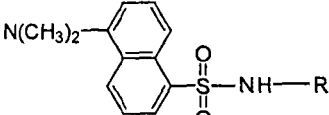
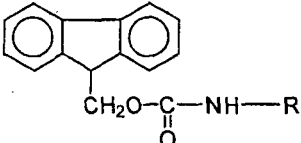
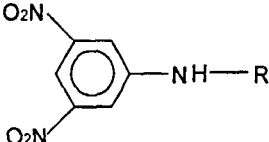
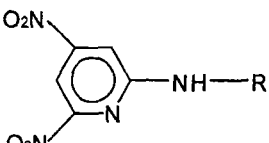
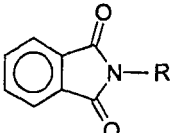
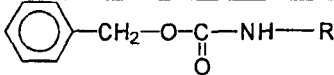
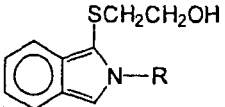
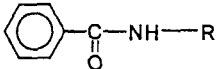
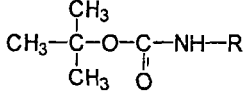
В качестве подвижных фаз использовали смеси ацетонитрила, метанола, этанола, диоксана, тетрагидрофурана и различными буферными растворами или водой; ацетонитрил и метанол с добавкой уксусной кислоты и триэтиламина; смеси ацетонитрила, метанола или изопропанола с добавкой уксусной кислоты и триэтиламина; смеси гексана и изопропанола.

pH водных растворов контролировали на иономере ЭВ-74 со стеклянным и хлорид серебряным электродами.

### ***Разделение оптических изомеров производных аминокислот***

$\beta$ -циклодекстриновые хиральные неподвижные фазы позволяют разделять широкий круг соединений, главным условием энантиоселективности является определенный размер молекулы сорбата. Оптические изомеры аминокислот не могут быть разделены на  $\beta$ -циклодекстринах прямым путем, так как размер молекул слишком мал, чтобы образовывать комплекс включения с  $\beta$ -циклодекстрином. Для того чтобы решить эту задачу аминокислоты переводят в форму производных. Расширение возможностей циклодекстриновых хиральных фаз обусловлено их модификацией. В качестве нового хирального селектора предложен аминированный  $\beta$ -циклодекстрин. На примере энантиомеров производных аминокислот с различными модифицирующими группами, структуры которых приведены в табл. 1, было проведено сравнение хиральной способности немодифицированного («Cyclobond 2000») и аминированного  $\beta$ -циклодекстринов.

Таблица 1. Модифицирующие агенты аминокислот

Структурная формула	Обозначение
	Дансил
	ФМОК
	ДНФ
	ДНП
	Фталил
	КБЗ
	ОФА
	Бензоил
	БОК

R – остаток аминокислоты



Удерживание и селективность разделения оптических изомеров в значительной степени зависят от подвижной фазы: природы и содержания органического компонента, pH, состава буферного раствора. Разделение производных аминокислот проводили в обращенно-фазовом и полярно-органическом (при содержании полярного органического растворителя > 90 %) режимах жидкостной хроматографии.

Оптимальным значением pH подвижной фазы для элюирования большинства производных аминокислот является область около 4.0, за исключением производных с о-фталевым альдегидом, которые неустойчивы при pH < 7.0. Их разделяли при элюировании подвижной фазой содержащей буферный раствор с pH 7.0.

Установлено, что из четырех исследованных растворителей (диоксан, тетрагидрофуран, ацетонитрил, метанол) максимальные значения селективности были достигнуты при использовании метанола. Удовлетворительные результаты были получены и при использовании ацетонитрила.

В работе было исследовано влияние соотношения метанола и буферного раствора ацетата триэтиламина (ТЕАА, 1%, pH 4.1) в подвижной фазе на коэффициент удерживания и разрешение для КБЗ-производных аминокислот и БОК-производных аминокислот на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине. Полученные зависимости для КБЗ-DL-аланина и БОК-DL-аланина показаны на рис. 1. Аналогичное поведение проявляли и другие изученные КБЗ-производные и БОК-производные. Такой характер зависимости связан с изменением механизма удерживания сорбатов при высоком содержании полярного органического растворителя в подвижной фазе.

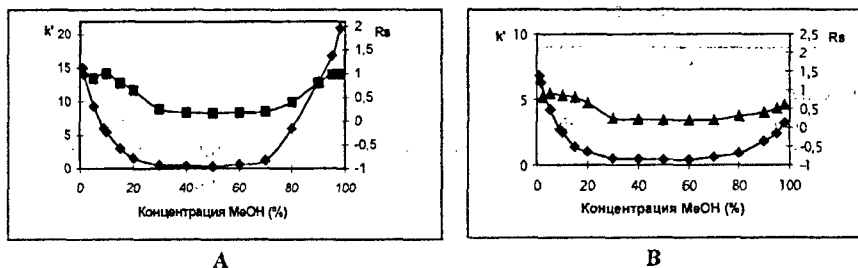


Рис. 1. Влияние процентного содержания метанола в подвижной фазе на удерживание ( $k'$ ) (◆) и разрешение ( $R_s$ ) (■) А - КБЗ-DL-аланина; В - БОК-DL-аланина. Колонка аминированный  $\beta$ -циклодекстрин, 250x4.6 мм. Подвижная фаза содержала определенный процент метанола и ТЕАА 1% (pH 4.1). Скорость потока 1 мл/мин,  $\lambda=254$ нм.

При работе с подвижными фазами, содержащими от 90 до 100% ацетонитрила или метанола, реализуется, так называемый, полярно-органический вариант жидкостной хроматографии. При высокой концентрации органического компонента в подвижной фазе он занимает полости  $\beta$ -циклодекстрина, делая их недоступными для образования комплекса включения с хиральным соединением. Разделение происходит за счет образования водородных связей, диполь-дипольных и стерических взаимодействий.

Значения коэффициентов емкости и энантиоразрешения, полученные на новой неподвижной фазе - аминированном  $\beta$ -циклодекстрине, показывают возможность использования больших концентраций метанола для успешного разделения изомеров производных аминокислот.

На рис. 2 представлены зависимости логарифмов коэффициентов емкости ОФА-DL-тирозина, ОФА-DL-фенилаланина, ОФА-DL-лейцина на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине и ОФА-DL-тирозина, ОФА-DL-фенилаланина, ОФА-метил-DL-триптофана на немодифицированном  $\beta$ -циклодекстрине при содержании метанола в подвижной фазе 10-20%. Видно, что с увеличением концентрации метанола удерживание всех производных уменьшается.

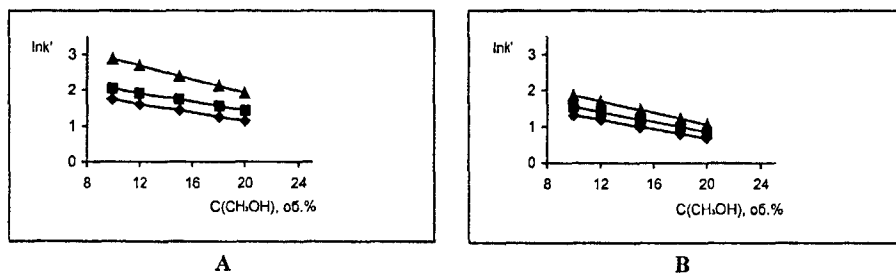


Рис. 2. Влияние концентрации метанола на удерживание А - ОФА-DL-тирозина (▲), ОФА-DL-фенилаланина (■), ОФА-DL-лейцина (◆) на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине (250x4.6 мм); В - ОФА-DL-тирозина (▲), ОФА-DL-фенилаланина (■), ОФА-метил-DL-триптофана (◆) на  $\beta$ -циклодекстрине (250x4.6 мм). Подвижная фаза метанол - ТЕАА 1% (рН 7.1).

Удерживание ОФА-DL-тирозина на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине заметно отличается от удерживания других ОФА-производных аминокислот, что обусловлено увеличением числа групп, способных к образованию водородных связей с аминогруппами на поверхности  $\beta$ -циклодекстрина. Следует отметить, что для обеих хиральных неподвижных фаз в изученном интервале концентраций метанола зависимость  $\lg k'$  от концентрации

метанола линейна (коэффициент корреляции составляет 0.9994-0.9999). Линейность полученных зависимостей подтверждает обращенно-фазовый механизм удерживания на  $\beta$ -циклодекстринах при элюировании сорбатов водно-органическими смесями.

В связи с тем, что гидрофобные взаимодействия играют определяющую роль в удерживании и хиральном распознавании на циклодекстриновых неподвижных фазах и важны при разделении энантиомеров на макроциклических антибиотиках, необходимо учитывать гидрофобность сорбатов при изучении закономерностей удерживания и механизмов энантиораспознавания.

Гидрофобность веществ принято оценивать при помощи параметров Ханша, представляющих логарифм константы распределения вещества в водно-органической системе. Константу распределения вещества, связанную со свободной энергией ( $\Delta G$ ) межфазного распределения, можно представить в виде суммы инкрементов «чистой гидрофобности» и «силы образования Н-связи»:

$$\lg P = \frac{m \cdot \Delta\mu_L + y\Delta\mu_H}{2,3KT}$$

где  $m$  – число инертных фрагментов, не способных к образованию Н-связей, в молекуле тестируемого вещества,  $y$  – число фрагментов, образующих межмолекулярные Н-связи,  $\mu_L$ ,  $\mu_H$  – химические потенциалы межфазного распределения соответствующих инертных и специфически взаимодействующих фрагментов.

В настоящей работе в качестве меры гидрофобности использовали значения коэффициентов распределения различных хиральных молекул между водой и *n*-октанолом ( $\lg D$ ) в зависимости от pH. Чем выше значение  $D$ , тем больше сродство молекулы к гидрофобному сорбенту. В действительности параметр  $\lg P$  дает величину распределения нейтральной формы в системе октанол-вода, поэтому в ряде случаев  $\lg P$  и максимальная величина  $\lg D$  совпадать не будут, так как в  $\lg D$  учитывается в какой форме при заданном pH находится соединение. Зависимость параметра гидрофобности  $\lg D$  от pH для некоторых соединений на рис. 3 и в табл. 2.

Для расчета  $\lg D$  использована программа “© Advanced Chemistry Development Inc., 2001 г.”.

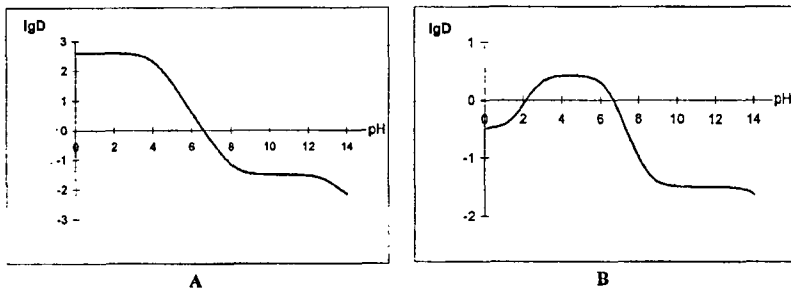


Рис. 3. Зависимость коэффициента распределения в системе октанол-вода от pH для А - pH KB3-DL-валина и В - OFA-DL-валина.

Таблица 2. Значения коэффициентов распределения различных производных DL-валина в системе октанол-вода

Вещество	lgP*	lgD**
ДНП-DL-валин	1.52±0.39	1.51
Бензоил-DL-валин	1.54±0.54	1.53
БОК-DL-валин	2.20±0.52	-0.16
Фталил-DL-валин	2.42±0.32	2.42
ДНФ-DL-валин	2.56±0.38	2.50
KB3-DL-валин	2.59±0.55	2.59
OFA-DL-валин	2.60±0.53	0.42
Дансил-DL-валин	3.52±0.41	2.70
ФМОК-DL-валин	4.42±0.41	4.42

\* - значение гидрофобности для нейтрального соединения;

\*\* - максимальное значение гидрофобности в изученной области pH.

Полученные хроматографические данные показывают, что удерживание на немодифицированном β-циклодекстрине растет с увеличением числа циклов в структуре сорбата и при наличии групп усиливающих π-π взаимодействия, в ряду (в скобках указаны значения lgP):

OFA-DL-валин (2.60) < бензоил-DL-валин (1.54) < фталил-DL-валин (2.42) < ДНФ-DL-валин (1.52) < ДНП-DL-валин (2.56) < KB3-DL-валин (2.59) < дансил-DL-валин (3.52) < ФМОК-DL-валин (4.42)

Данный ряд подтверждает, что удерживание сорбатов зависит от гидрофобности модифицирующего агента, но в тоже время становится заметен вклад других взаимодействий – образование водородных связей, диполь-дипольных и ионных взаимодействий. В связи с этим ряд гидрофобности не полностью соответствует порядку элюирования соединений. Присутствие электроноакцепторных групп в структуре модификатора увеличивает

удерживание сорбата, о чем свидетельствует сравнительно большое значение удерживания для ДНФ-DL-валина. Небольшое удерживание ОФА-DL-валина объясняется тем, что теоретическая величина гидрофобности равна 2.60, а практически максимальное значение составляет только 0.42.

Сравнивая удерживающую способность немодифицированного  $\beta$ -циклодекстрина и аминированного  $\beta$ -циклодекстрина на примере дансил-, ДНП(ДНФ)-, ОФА-производных аминокислот, можно сказать, что она сопоставима. Изменение удерживания зависит от свойств модификатора: для дансил, КБЗ-производных оно несколько уменьшается, а для ДНП и ОФА – увеличивается. Вероятно, в удерживание сорбатов на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине, кроме вышеописанных гидрофобных взаимодействий, значительный вклад вносят электростатические взаимодействия ионизированных сорбатов и протонированных аминогрупп  $\beta$ -циклодекстрина. Порядок элюирования производных аминокислот сохраняется. Удерживание изученных производных аминокислот на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине растет в ряду (в скобках указаны значения  $\lg P$ ):

БОК-DL-валин (2.20) < ОФА-DL-валин (2.60) < бензоил-DL-валин (1.54) < фталил-DL-валин (2.42) < ДНФ-DL-валин (1.52) < ДНП-DL-валин (2.56) < КБЗ-DL-валин (2.59) < дансил-DL-валин (3.52) < ФМОК-DL-валин (4.42)

Небольшое удерживание БОК-DL-валина, так же как и ОФА-DL-валина, показывает, что реальная величина гидрофобности в несколько раз отличается от рассчитанной для нейтральной молекулы (табл. 2).

В табл. 3 представлены хроматографические параметры для тех из изученных производных аминокислот, оптические изомеры которых удалось разделить на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине. На рис. 4 представлены хроматограммы разделения энантимеров ДНП-DL-норлейцина на немодифицированном  $\beta$ -циклодекстрине и искусственной смеси ОФА-DL-тирозина на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине.

Интересным результатом является разделение БОК-производных аминокислот на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине, что ранее было возможно только на гидроксипропильных производных  $\beta$ -циклодекстрина. Можно предположить, что такая особенность хиральной поверхности связана с появлением аминогруппы, взаимодействие сорбатов с которой вносит вклад в хиральное распознавание. На рис. 4 (С) показана хроматограмма энантиоразделения БОК-N-метил-DL-аланина.

Таблица 3. Хроматографические параметры разделения энантиоселективных производных аминокислот на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине

Вещество	Коэффициент емкости <sup>1</sup>	Коэффициент селективности	Разрешение	Эффективность <sup>2</sup>
Подвижная фаза: метанол/ТЕАА* (10/90)				
КБЗ-DL-аланин	5.67	1.13	1.01	4570
КБЗ-DL-метионин	8.38	1.16	0.90	2260
КБЗ-DL-норлейцин	6.88	1.16	0.98	2410
КБЗ-DL-лейцин	9.25	1.22	1.03	2700
КБЗ-DL-валин	6.23	1.17	1.08	4550
Подвижная фаза: метанол/ТЕАА* (20/80)				
КБЗ-DL-фенилаланин	6.22	1.12	1.01	3020
КБЗ-DL-тирозин	7.46	1.10	0.84	2880
КБЗ-DL-триптофан	10.0	1.17	1.15	3240
Подвижная фаза: метанол/ТЕАА* (10/90)				
Бензоил-DL-валин	3.90	1.13	0.80	4710
Бензоил-DL-фенилаланин	7.42	1.07	0.60	4310
Дансил-DL-норлейцин	12.77	1.25	0.97	1400
Подвижная фаза: метанол/ТЕАА* (30/70)				
Дансил-DL-лейцин	12.18	1.65	1.2	1000
Дансил-DL-норвалин	6.29	1.12	0.7	2000
Дансил-DL-валин	8.78	1.27	1.25	1820
Дансил-DL-фенилаланин	14.89	1.09	0.4	1520
ФМОК-DL-валин	5.15	1.18	1.25	2660
ФМОК-DL-лейцин	5.4	1.09	0.40	1780
Подвижная фаза: метанол/ТЕАА* (10/90)				
ОФА-DL-лейцин	5.78	1.16	0.95	2690
ОФА-DL-изолейцин	8.11	1.32	1.50	2010
ОФА-DL-норлейцин	4.87	1.08	0.60	4540
ОФА-DL-треонин	1.91	1.19	1.30	4460
ОФА-DL-аспарагиновая кислота	7.63	1.20	0.70	2450
ОФА-DL-глутаминовая кислота	8.38	1.18	0.62	4160
Подвижная фаза: метанол/ТЕАА** (20/80)				
ОФА-DL-фенилаланин	4.21	1.37	1.57	2320
ОФА-DL-тирозин	6.99	1.50	2.41	3100

Продолжение табл. 3

Вещество	Коэффициент емкости <sup>1</sup>	Коэффициент селективности	Разрешение	Эффективность <sup>2</sup>
Подвижная фаза: метанол/ТЕАА* (20/80)				
Фталил-DL-валин	5.85	1.13	0.60	720
ДНФ-DL-норвалин	8.97	1.08	0.71	2800
ДНФ-DL-метионин	10.17	1.07	0.69	2710
ДНФ-DL-этиопин	12.12	1.08	0.67	2820
ДНФ-DL-норлейцин	9.63	1.08	0.82	3340
ДНФ-DL-цитрулин	6.86	1.08	0.79	1830
ДНП-DL-лейцин	4.74	1.16	1.31	3120
Подвижная фаза: метанол/ТЕАА* (5/95)				
БОК-DL-триптофан	9.47	1.12	0.50	780
БОК-DL-фенилаланин	6.18	1.24	0.95	1190
БОК-метил-DL-фенилаланин	4.65	1.18	0.60	1520
БОК-DL-валин	3.69	1.19	0.75	1400
БОК-DL-аланин	4.22	1.24	0.9	1280
БОК-метил-DL-аланин	3.01	1.37	0.92	1310
БОК-фенил-DL-аланин	5.99	1.22	0.9	1390

1 - коэффициент емкости для первого элюируемого энантиомера;

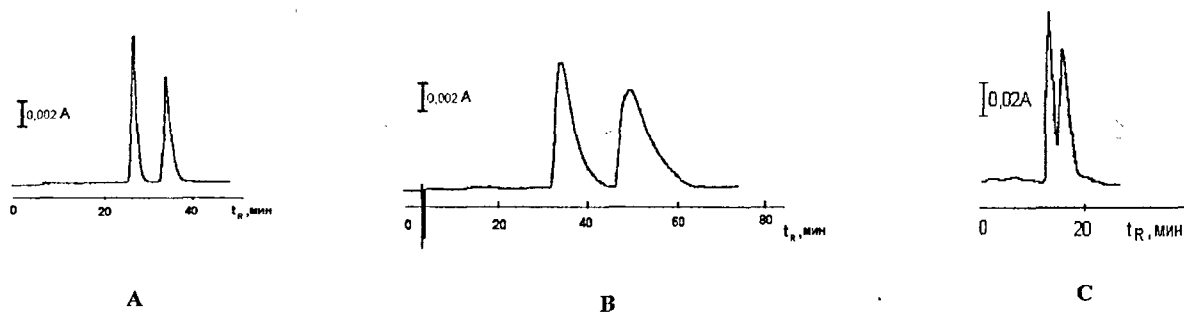
2 - число теоретических тарелок на метр;

\* - 1% ацетат триэтиламина, pH 4.1;

\*\* - 1% ацетат триэтиламина, pH 7.0.

Анализ экспериментальных данных показывает, что в отличие от немодифицированного  $\beta$ -циклодекстрина коэффициенты емкости и разрешение на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине зависят от структуры аминокислоты, кроме гидрофобных и  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий значительный вклад в удерживание вносят электростатические взаимодействия ионизированных сорбатов и протонированных аминогрупп  $\beta$ -циклодекстрина.

Следует отметить, что аминированном  $\beta$ -циклодекстрине спектр разделяемых соединений по сравнению с немодифицированным  $\beta$ -циклодекстрином значительно расширяется. Полученные результаты, позволяют сделать вывод, что предложенный в качестве новой хиральной неподвижной фазы аминированный  $\beta$ -циклодекстрин является селективным для разделения энантиомеров производных аминокислот.



**Рис. 4.** Хроматограмма энантиоразделения А - ДНП-DL-норлейцина, колонка “Сусlobond 2000” (250x4.6 мм), подвижная фаза метанол/ТЕАА 1% (рН 4.1) (20/80) ( $\lambda=254$  нм); В – искусственной смеси ОФА-D-тирозина и ОФА-L-тирозина, колонка аминированный  $\beta$ -циклодекстрин (250x4.6 мм), подвижная фаза метанол/ТЕАА 1% (рН 7.1) (20/80) ( $\lambda=254$  нм); С - БОК-метил-DL-аланина. Колонка аминированный  $\beta$ -циклодекстрин (250x4.6 мм). Подвижная фаза метанол/ТЕАА 1% (рН 4.1) (5/95) ( $\lambda=230$  нм). Скорость потока 1 мл/мин.



В работе изучены хиральные неподвижные фазы на основе макроциклических антибиотиков тикопламин (“Chirobiotic T”, “Chirobiotic Tag”) и ванкомицин (“Chirobiotic V”) для разделения оптических изомеров производных аминокислот с различными модификаторами (табл. 1) и выбраны условия разделения.

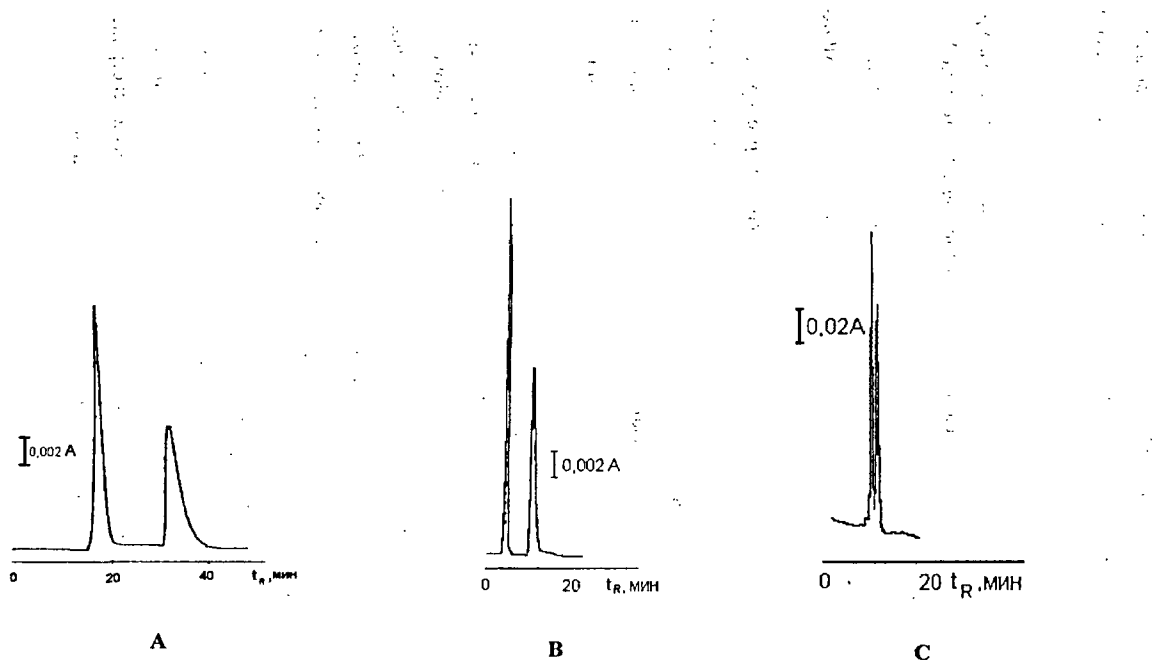
Анализ полученных данных показывает, что удерживание сорбатов растет с увеличением числа циклов и при наличии акцепторных заместителей в структуре модификатора аминокислоты для колонок “Chirobiotic T”, “Chirobiotic Tag”, “Chirobiotic V” в ряду (в скобках указаны значения  $\lg P$ ):

бензоил-DL-валин (1.54) < ОФА-DL-валин (2.60) < фталил-DL-валин (2.42) < КБЗ-DL-валин (2.59) < ДНФ-DL-валин (1.52) < ДНП-DL-валин (2.56) < дансил-DL-валин (3.52) < ФМОК-DL-валин (4.42)

Как видно из полученных рядов, удерживание не так строго коррелируется с гидрофобностью производных аминокислот, но тем не менее гидрофобность сорбатов играет одну из первостепенных ролей в удерживании дансил- и ФМОК-производных. Множество потенциальных центров на поверхности макроциклического антибиотика способны взаимодействовать с молекулой сорбата по различным механизмам, определяя удерживание и энантиоразделение.

На колонке “Chirobiotic T” удалось успешно разделить 39 производных аминокислот, из них 32 с  $R_S > 1.5$ , колонка “Chirobiotic Tag” оказалась селективна к 18 энантиомерам производных аминокислот, 16 из них были разделены с  $R_S > 1.5$ , колонка “Chirobiotic V” проявила хиральную селективность к 20 производным, и разделение в большинстве случаев неполное ( $R_S < 1.5$ ). Полученные результаты хроматографического разделения позволяют сделать вывод, что предложенные антибиотиковые хиральные неподвижные фазы “Chirobiotic T”, “Chirobiotic Tag” и “Chirobiotic V” энантиоселективны по отношению к производным аминокислотам. Примеры хроматограмм приведены на рис. 5.

Показано, что наиболее успешными хиральными селекторами для разделения производных аминокислот являются “Chirobiotic T” и аминированный  $\beta$ -циклодекстрин, по количеству разделений, но эффективность разделения на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине меньше и в ряде случаев не достаточна, чтобы разделение изомеров было полным.



**Рис. 5.** Хроматограмма энантиоразделения **А** - КБЗ-DL-триптофана, колонка "Chirobiotic T" (250x4.6 мм), подвижная фаза: метанол - ТЕАА 1% (рН 4.1) (20/80); **В** - бензоил-DL-аланина, колонка "Chirobiotic Tag" (250x4.6 мм), подвижная фаза метанол/ТЕАА 1% (рН 4.1) (20/80); **С** - КБЗ-DL-аланина, колонка "Chirobiotic V" (250x4.6 мм), подвижная фаза ацетонитрил/ТЕАА 1% (рН 4.1) (5/95). Скорость потока 1 мл/мин,  $\lambda=254$  нм.

### Разделение оптических изомеров аминокислот

Проведенные исследования на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине показали, что коэффициенты емкости аминокислот практически равны нулю и говорить о хиральной селективности данной неподвижной фазы затруднительно.

На немодифицированном  $\beta$ -циклодекстрине ("Cyclobond 2000") было изучено удерживание и энантиоразделение двенадцати аминокислот. Из исследованных аминокислот удалось разделить оптические изомеры лишь четырех: треонина, серина, аспарагиновой и лугаминовой кислот. Примеры хроматограмм показаны на рис. 6.

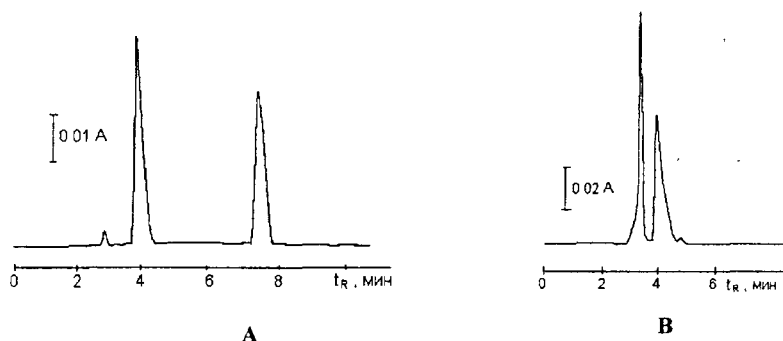


рис. 6. Хроматограмма энантиоразделения **А** - глютаминовой кислоты, **В** - треонина. Колонка "Cyclobond 2000" (250x4.6 мм). Подвижная фаза: ацетонитрил/ТЕАА 0.1% (рН 4.5) 10:90). Скорость потока 1 мл/мин,  $\lambda=230$  нм.

Одним из неоспоримых достоинств макроциклических антибиотиков является возможность разделения аминокислот без предварительной дериватизации. В связи со сложной структурой поверхности можно предположить, что различия в энергиях взаимодействия между D- и L-формами аминокислот и хиральной поверхностью неподвижной фазы настолько велики, что изменение ионной силы, рН и концентрации органического растворителя в подвижной фазе слабо влияют на хиральную селективность сорбента.

В работе было изучено удерживание и разделение оптических изомеров аминокислот на хиральных неподвижных фазах с антибиотиком тикоплалин ("Chirobiotic T", "Chirobiotic ag") и антибиотиком ванкомицин ("Chirobiotic V") при использовании в качестве подвижных фаз смесей ацетонитрила, метанола, этанола, изопропанола и буферного раствора ацетата триэтиламина или воды.

Оказалось, что колонка "Chirobiotic V" не селективна к D-, L-изомерам аминокислот. Сравнение экспериментальных хроматографических данных, полученных на "Chirobiotic T"

при использовании подвижных фаз с различным содержанием ацетонитрила показывает, что уменьшение содержания органического компонента в интервале от 2 до 20 % приводит к небольшому увеличению времен удерживания и практически не влияет на селективность разделения и эффективность колонки. Хроматограммы на рис. 7 демонстрируют данную зависимость. Подвижная фаза с содержанием ацетонитрила 5% является оптимальной. Хроматографические параметры разделения энантимеров представлены в табл. 4.

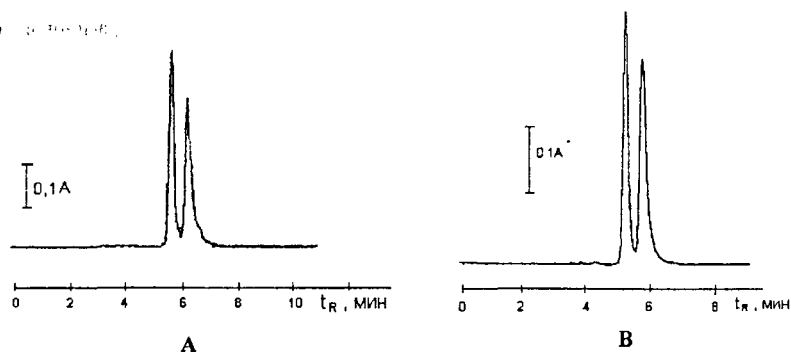


Рис. 7. Хроматограмма энантиоразделения триптофана. Колонка "Chirobiotic T" (250x4.6 мм). Подвижная фаза: ацетонитрил/ТЕАА 0.1% (рН 4.5) А - (10:90) В - (5:95). Скорость потока 1 мл/мин,  $\lambda=230$  нм.

Разница в структурах макроциклических антибиотиков "Chirobiotic T" и "Chirobiotic Tag" может значительно сказываться на хиральной способности колонок. С точки зрения хирального распознавания, остатки сахаров молекулы тикопланина могут влиять на процесс хирального распознавания по меньшей мере тремя путями: (1) создавая стерические помехи, в этом случае остатки сахаров занимают центры хирального распознавания, что лимитирует доступ других молекул; (2) блокируя возможные центры взаимодействия агликона, т.к. два остатка сахара связаны посредством фенольных гидроксильных групп и третий через остаток спирта; (3) являясь альтернативными центрами взаимодействия, в связи с тем, что три остатка сахара сами являются хиральными и имеют собственные гидроксильные, эфирные и амидо функциональные группы. Это можно продемонстрировать на примере разделения ДОФА на "Chirobiotic T" и "Chirobiotic Tag" (рис. 8). Было достоверно определено, что гидроксильные группы ароматического кольца ДОФА взаимодействуют с гидроксильной группой агликона тикопланина, которая прежде была занята остатком сахара в молекуле тикопланина. Это взаимодействие улучшает энантиораспознавание ДОФА.

Таблица 4. Хроматографические параметры разделения изомеров аминокислот на макроциклическом антибиотике "Chirobiotic T". Подвижная фаза: ацетонитрил/ТЕАА\* (5/95)

Вещество	Коэффициент емкости <sup>1</sup>	Коэффициент селективности	Разрешение	Эффективность <sup>2</sup>
Денилаланин	0.78	1.09	0.69	26300
Валин	0.42	1.10	0.40	20050
ДОФА	0.57	1.29	1.57	22300
Триптофан	1.26	1.17	1.47	24210
Исрвалин	0.44	1.34	1.40	13350
Аргинин	0.35	1.11	0.45	18300
Изолейцин	0.51	1.20	1.16	22860
Изосерин	0.34	1.19	0.63	11560
Фейцин	0.52	1.29	1.45	22620
Метионин	0.54	1.28	1.80	29130
Аланин	0.35	1.16	0.93	32300
Пролин	0.61	1.10	0.54	15300
Аспарагин	0.35	1.11	0.52	16480
Аспарагиновая кислота	0.40	4.85	8.70	12850
Илизин	0.44	3.10	5.83	8760
Лутаминовая кислота	0.36	3.04	7.30	18500

- 0.1% ацетат триэтиламина, pH 4.5;
- коэффициент емкости для первого элюируемого энантиомера;
- число теоретических тарелок на метр.

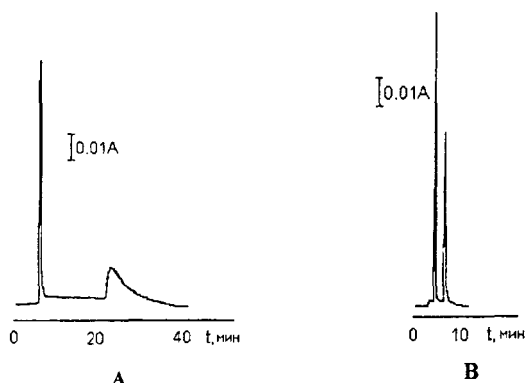


рис. 8. Хроматограмма энантиоразделения ДОФА. А – колонка "Chirobiotic Tag" (250x4.6 мм), подвижная фаза: метанол/ТЕАА 0.1% (pH 4.5) (20/80); В - колонка Chirobiotic T" (250x4.6 мм), подвижная фаза: этанол/вода (50/50). Скорость потока 1 л/мин,  $\lambda=230\text{nm}$ .

### Разделение изомеров *N*-гидроксипропиламинов

В работе было изучено удерживание и разделение  $\beta$ -блокаторов на колонках с антибиотиковыми хиральными неподвижными фазами "Chirobiotic T", "Chirobiotic Tag" и "Chirobiotic V": пропранолола, метопролола, атенолола, алпренолола, окспренолола, ацебутолола, пиндолола, лобеталола, надолола при использовании подвижных фаз метанола с добавкой уксусной кислоты/триэтиламина и ацетонитрила с добавкой изопропанола и уксусной кислоты/триэтиламина. Наиболее селективными по отношению к  $\beta$ -блокаторам оказались колонки "Chirobiotic T" и "Chirobiotic V". Примеры хроматограмм разделения  $\beta$ -блокаторов показаны на рис. 9.

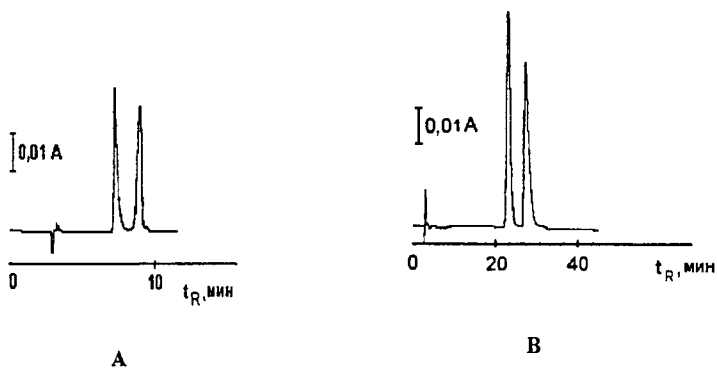


Рис. 9. Хроматограмма энантиоразделения А – метопролола, колонка "Chirobiotic T" (250x4.6 мм), подвижная фаза метанол/уксусная кислота/триэтиламин (100/0.3/0.2); В – пропранолола, колонка "Chirobiotic V" (250x4.6 мм), подвижная фаза метанол/уксусная кислота/триэтиламин (100/0.1/0.1). Скорость подвижной фазы 1.0 мл/мин,  $\lambda=254$  нм.

### Разделение биогенных аминов и аминоспиртов

Биогенные амины и аминоспирты играют большую роль в метаболических процессах в организме, имеют широкое применение в медицине и фармакологии и являются одним из важнейших классов хиральных соединений.

В работе было изучено энантиоразделение биогенных аминов и аминоспиртов: адреналина, норадреналина, эфедрина, амфетамина, серотопина, креатинина, гистамина,  $\alpha$ -фенилэтиламина на колонках "Chirobiotic V" и "Chirobiotic T". Колонки "Chirobiotic V" и

“Chirobiotic T” проявляют энантиоселективность к различным соединениям. Для разделения адреналина и эфедрина эффективнее использовать колонку “Chirobiotic T”, а для разделения амфетамина и  $\alpha$ -фенилэтиламина – “Chirobiotic V”. Примеры хроматограмм разделения представлены на рис.10.

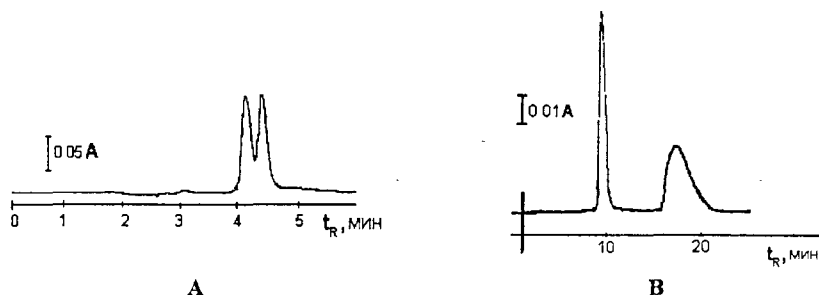


Рис. 10. Хроматограмма рацемической смеси **A** – эфедрина, колонка “Chirobiotic T” (250x4.6 мм), подвижная фаза: ацетонитрил/ТЕАА 0.1% (рН 4.1) (95:5), **B** – адреналина, колонка «Chirobiotic T» (250x4.6 мм), подвижная фаза: этанол/вода (50/50). Скорость потока 1мл/мин,  $\lambda=254$  нм.

### Определение оптической чистоты соединений

Были исследованы коммерчески доступные препараты D- и L-метионина, D-триптофана, рацемической смеси тирозина и D-тирозина. Хроматограммы D-триптофана и D-метионина показаны на рис. 11. По хроматограммам рассчитано относительное процентное содержание изомеров. Полученные данные приведены в табл. 5.

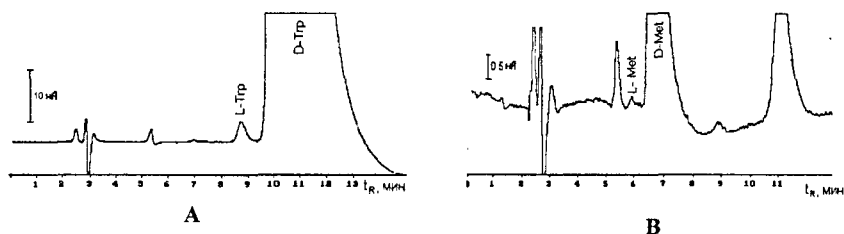


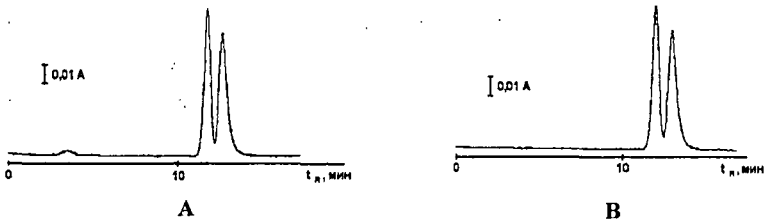
Рис. 11. Хроматограмма **A** - D-триптофана, **B** - D-метионина. Колонка “Chirobiotic T” 250x4.6 мм). Подвижная фаза: ацетонитрил/ТЕАА 0.1% (рН 4.1) (10: 90). Скорость потока 1 мл/мин, детектор – амперометрический, потенциал рабочего электрода 1300 мВ.

**Таблица 5.** Определение содержание примеси оптических изомеров в коммерческих препаратах некоторых аминокислот. (n=3, P=0.95)

Анализируемая аминокислота	Время удерживания, $t_R$ , мин	Содержание примеси, %
D-триптофан	10.8	$0.45 \pm 0.05$
D-метионин	6.9	< 0.05
L-метионин	5.8	$0.15 \pm 0.04$
D-тирозин	10.5	$7.77 \pm 0.08$

Было проведено хроматографическое разделение оптических изомеров атенолола фирм «Скопинфарм» (Россия) и «Нортон» (Великобритания), которое составило  $(81 \pm 3) \%$  и  $(65 \pm 3) \%$ , соответственно. Было определено содержание атенолола в препаратах. Хроматограммы представлены на рис. 12. Содержание S-изомера в препарате фирмы «Скопинфарм» (Россия) составляет  $(48 \pm 2) \%$ , R-изомера  $(52 \pm 2) \%$ ; фирмы «Нортон» (Великобритания): S-изомер -  $(48 \pm 2) \%$ ; R-изомер -  $(52.3 \pm 0.3) \%$ .

Как видно из полученных данных, соотношение цена/качество двух протестированных препаратов оказалось в пользу российской фирмы «Скопинфарм».



**Рис. 12.** Хроматограмма разделения атенолола препарата А - фирмы «Скопинфарм», В - фирмы «Нортон». Колонка «Chirobiotic T» (250x4.6 мм). Подвижная фаза: метанол/уксусная кислота/триэтиламин (100/0.2/0.3). Скорость потока 0.5 мл/мин,  $\lambda=270$  нм.

## ВЫВОДЫ

1. Показана возможность хирального распознавания энантиомеров 39 производных аминокислот на новом хиральном селекторе - аминированном  $\beta$ -циклодекстрине.
2. Построены зависимости коэффициента распределения производных аминокислот в системе октанол-вода от pH. Показано, что удерживание и энантиоселективность



производных аминокислот на циклодекстриновых неподвижных фазах зависит от параметра гидрофобности изученных соединений и природы остатка аминокислоты.

1. Сопоставлены энантиоселективность и эффективность хроматографического разделения производных аминокислот в обращенно-фазовом и полярно-органическом режимах жидкостной хроматографии на циклодекстриновых неподвижных фазах. Показано, что эффективность разделения выше в полярно-органическом режиме.
2. Показана возможность энантиоразделения треонина, серина, аспарагиновой и глутаминовой кислот на колонке с немодифицированным циклодекстрином "Cyclobond 2000". Установлено, что разделение происходит благодаря наличию полярных групп в структуре аминокислот, которые обладают способностью к образованию водородных связей с гидроксильными группами поверхности  $\beta$ -циклодекстрина.
3. Исследовано хроматографическое поведение оптических изомеров производных аминокислот и недериватизированных аминокислот на макроциклических антибиотиках. Установлено, что удерживание и энантиоселективность определяется гидрофобными,  $\pi$ - $\pi$  взаимодействиями и образованием водородных связей. Показано, что колонка на основе тикопланина наиболее селективна по отношению к производным аминокислотам, а колонка на основе тикопланина агликона - к недериватизированным аминокислотам.
4. Выбраны условия разделения N-гидроксипропиламинов на циклодекстриновых и антибиотиковых неподвижных фазах в полярно-органическом режиме: пропранолола, метопролола, атенолола, алпренолола, окспренолола, ацебутолола, линдолола, лабеталола, надолола.
5. Определены условия разделения смесей биогенных аминов и аминоспиртов на колонках с различными неподвижными фазами и некоторых их энантиомеров на колонках с макроциклическими антибиотиками.
6. Проведена апробация методики определения оптической чистоты и энантиомерного состава коммерчески доступных лекарственных форм и химических препаратов аминокислот.

*Автор выражает искреннюю благодарность д.х.н., проф. В.А. Даванкову за научные консультации, к.х.н. Е.Н. Мышак за помощь в проведении экспериментальных расчетов параметра гидрофобности, сотрудникам Центра «Биоинженерия» РАН д.х.н., проф. В.П.*

*Варламову и к.х.н. С.А. Лопатину за предоставленный сорбент – аминированный  $\beta$ -циклодекстрин.*

**Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:**

1. Ананьева И.А., Шаповалова Е.Н., Иванов А.А., Шпигун О.А., Армстронг Д.В. VII Использование хроматографических методов для определения и разделения биогенных аминов. / Материалы Международной научно-технической конференции «Высокие технологии в промышленности России». Москва. 2001. С. 158-162.
2. Ананьева И.А., Шаповалова Е.Н., Лопатин С.А., Шпигун О.А., Варламов В.П., Даванков В.А. Разделение производных энантимеров аминокислот на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Вестник МГУ. Сер. 2. Химия. 2001. Т. 42. №4. С. 273-277.
3. Ананьева И.А., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А., Армстронг Д.В. Разделение оптически активных аминокислот и изомеров их производных на макроциклическом антибиотике «Тикопланин». // Вестник МГУ. Сер. 2. Химия. 2001. Т. 42. №4. С. 278-280.
4. Лопатин С.А., Папков В.А., Ананьева И.А., Шаповалова Е.Н., Варламов В.П., Шпигун О.А., Даванков В.А. Перацетиламино- и пераминоциклодекстрины как циклические аналоги хитина и хитозана. / Материалы VI Международной конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана». Москва – Щелково. 2001. 22-24 октября. С. 300-303.
5. В.А.Ананьева И.А., Пешкова Е.А., Шаповалова Е.Н., Лопатин С.А., Шпигун О.А., Варламов В.П., Даванков В.А. Изучение адсорбции хитозана на поверхности силикагеля и сверхсшитого полистирола. / Всероссийский симпозиум по химии поверхности, адсорбции и хроматографии. Москва. 1999. Апрель. С. 72.
6. Ананьева И.А., Буданова Н.Ю., Шаповалова Е.Н., Лопатин С.А., Шпигун О.А., Варламов В.П., Даванков В.А. Оценка хроматографических свойств силикагеля, модифицированного хитозаном и его производными. / Всероссийская конференция «Химический анализ веществ и материалов». Москва. 2000. Апрель. С. 378-379.
7. Shapovalova E.N., Ananieva I.A., Chernobrovkin M.G., Budanova N.Yu., Shpigun O.A. Chitosan-coated silica as a support for the separation of amines and aminoacids. / 10<sup>th</sup> Russian-Japan Joint Symposium on Analytical Chemistry». Moscow – St.Petersburg. 2000. August. P. 132.
8. Ананьева И.А., Шаповалова Е.Н., Лопатин С.А., Шпигун О.А., Варламов В.П., Даванков В.А. Разделение энантимеров производных аминокислот на аминированном  $\beta$ -циклодекстрине. / IX Международная конференция по теоретическим вопросам адсорбции и адсорбционной хроматографии «Современное состояние и перспективы развития теории адсорбции». Москва. 2001. 24-28 апреля. С. 180.

1. Ананьева И.А., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А., Армстронг Д.В. Изучение разделения оптически активных веществ на  $\beta$ -циклодекстрине. / IX Международная конференция по теоретическим вопросам адсорбции и адсорбционной хроматографии «Современное состояние и перспективы развития теории адсорбции». Москва. 2001. 24-28 апреля. С. 181.
0. Ananieva I.A., Davankov V.A., Armstrong D.W. Study of the enantioresolution of native amino acids and derivatized amino acids on macrocyclic antibiotics. / 13<sup>th</sup> International Symposium "Chirality 2001". Orlando. Florida. USA. 2001. July 15-18. P. 72.
1. Shpigun O.A., Spivakov B.Ya., Davankov V.A., Shapovalova E.N., Ananieva I.A., Budanova N.Yu., Armstrong D.W. Separation of some biologically active amines and acids by HPLC and CE. / International Congress on Analytical Sciences. 2001. August 6-10. P. 198.
2. Ananieva I.A., Shapovalova E.N., Lopatin S.A., Shpigun O.A., Varlamov V.P., Davankov V.A., Armstrong D.W. Study of the separation of amino acid derivative enantiomers on amino- $\beta$ -cyclodextrin. / International Congress on Analytical Sciences. 2001. August 6-10. P. 308.
3. Ananieva I.A., Shapovalova E.N., Shpigun O.A., Davankov V.A., Armstrong D.W. Determination of biogenic amines by high-performance liquid chromatography/ / 11<sup>th</sup> International Symposium "Advanced and Application of Chromatography in Industry" . Bratislava. Slovak Republic. 2001. August 27-31. B02.
4. Ananieva I.A., Shapovalova E.N., Shpigun O.A., Davankov V.A., Armstrong D.W. Study of enantiomers resolution on macrocyclic antibiotics. / 2<sup>nd</sup> International Symposium "Separation in BioSciences". Prague. Czech Republic. 2001. September 17-20. P. 48.
5. Ананьева И.А., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А., Даванков В.А., Армстронг Д.В. Изучение разделения энантиомеров аминокислот и их производных на макроциклических антибиотиках. / VIII Всероссийский симпозиум по молекулярной хроматографии и капиллярному электрофорезу. Москва. 2001. 15-19 октября. С. 13.
6. Ананьева И.А., Савченкова Л.В., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А. Разделение биогенных аминов на макроциклических антибиотиках. / VIII Всероссийский симпозиум по молекулярной хроматографии и капиллярному электрофорезу. Москва. 2001. 15-19 октября. С. 62.