



**LATVIJAS
UNIVERSITĀTE**

**Promocijas darba
kopsavilkums**

Toms Upmanis

**HIRĀLĀS ATPAZĪŠANAS
MEHĀNISMU PĒTĪJUMI
ĪSO PEPTĪDU
HROMATOGRĀFISKAJAI
SADALEI UZ KRAUNA ĒTERU
STACIONĀRAJĀM FĀZĒM**

Rīga 2024



LATVIJAS UNIVERSITĀTE

MEDICĪNAS UN DZĪVĪBAS ZINĀTŅU FAKULTĀTE

Toms Upmanis

HIRĀLĀS ATPAZĪŠANAS MEHĀNISMU PĒTĪJUMI ĪSO PEPTĪDU HROMATOGRĀFISKAJAI SADALEI UZ KRAUNA ĒTERU STACIONĀRAJĀM FĀZĒM

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai

dabaszinātnēs (ķīmijas nozarē)

Apakšnozare: analītiskā ķīmija

Rīga 2024

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās Sintēzes institūtā (LOSI) laika posmā no 2019. līdz 2024. gadam.



**LATVIJAS
UNIVERSITĀTE**



**Latvijas Organiskās
sintēzes institūts**

Darbs sastāv no kopsavilkuma latviešu un angļu valodās un piecām zinātniskajām publikācijām.

Darba forma: publikāciju kopa ķīmijas nozarē, analītiskās ķīmijas apakšnozarē.

Darba zinātniskā vadītāja: *Dr. chem.*, vadošā pētniece Helēna Kažoka (LOSI).

Darba recenzenti:

- 1) *Prof., Dr. chem.* Vadims Bartkevičs (Latvijas Universitāte);
- 2) *Asoc. Prof., Dr. nat. techn.* Kristaps Kļaviņš, (Rīgas Tehniskā universitāte);
- 3) *Prof.* Bezhan Chankvetadze, PhD (Ivanes Džavahišvili Tbilisi Valsts universitāte)

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2024. gada 14. novembrī plkst. 13.00, Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē, Latvijas Universitātes Dabaszinātņu akadēmiskajā centrā (Rīgā, Jelgavas ielā 1). Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā (Rīgā, Raiņa bulv. 19).

LU Ķīmijas zinātņu nozares promocijas padomes

priekšsēdētājs _____ /*Prof., Dr. chem. Edgars Sūna*/

sekretāre _____ /*Asoc. Prof., Dr. chem. Vita Rudoviča*/

ISBN 978-9934-36-289-7

ISBN 978-9934-36-290-3 (PDF)

© Latvijas Universitāte, 2024

© Toms Upmanis, 2024

ANOTĀCIJA

Hirālās atpazīšanas mehānismu pētījumi īso peptīdu hromatogrāfiskajai sadalei uz krauna ēteru stacionārajām fāzēm. Upmanis, T., zinātniskā vadītāja Dr. chem. Kažoka, H. Zinātnisko publikāciju kopas kopsavilkums analītiskās ķīmijas apakšnozarē, 76 lapaspuses, 20 attēli, 2 tabulas, 79 literatūras avoti. Latviešu un angļu valodās.

Neskatoties uz veiksmīgu krauna ēteru stacionāro fāžu izmantošanu dažādu hirālu pirmējo aminogrupu saturošu savienojumu enantiosadalē, trūkst pētījumu, kas apskata sarežģītākus analītus, kā piemēram, īsos peptīdus. Precīzs mehānisms, kas regulē krauna ētera saistīšanos ar pētāmā analīta stereoizomēriem, joprojām nav skaidrs. Izvēloties zināmu μ -opioīdu receptoru agonistu tetrapeptīdu Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ kā modeļvielu, novērots, ka hirālās stacionārās fāzes, kam pamatā izmantoti (*R*) un (*S*)-(3,3'-difenil-1,1'-binaftil)-20-krauna-6 selektori nodrošina optimālus apstākļus šī tetrapeptīda hirālajai hromatogrāfiskajai sadalei. Noskaidrots, ka uz šīm stacionārajām fāzēm iespējams izšķirt arī vairāku strukturāli līdzīgu tetrapeptīdu enantiomērus. Lai skaidrotu eksperimentāli novēroto hromatogrāfisko sadali, hirālās atpazīšanas mehānisms tika pētīts ar augstefektīvās šķidrums hromatogrāfijas, maspektrometrijas un kodolu magnētiskās rezonanses spektrometrijas metodēm.

KRAUNA ĒTERU HIRĀLĀS STACIONĀRĀS FĀZES; TETRAPEPTĪDI;
HIRĀLĀ ATPAZĪŠANA; AMINOSKĀBES; ENANTIOSELEKTIVITĀTE

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

<i>a</i>	selektivitāte
ACN	acetonitrils
Arg	arginīns
COSY	korelācijas spektroskopija
CSP	hirālās stacionārās fāze
Cys	cistīns
ESI	elektroizsmidzināšanas jonizācija
Glu	glutamīnskābe
HILIC	hidrofilo mijiedarbību šķidrums hromatogrāfija
His	histidīns
HMBC	heteronukleārās daudzkārsu saišu korelācijas
HPLC	augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija
HSQC	heteronukleārās viena kvanta korelācijas
HRMS	augstas izšķirtspējas masspektrometrija
<i>k</i>	aiztures faktors
Leu	leicīns
Lys	lizīns
MP	mobīlā fāze
MS	masspektrometrija
NMR	kodolu magnētiskā rezonanse
Phe	fenilalanīns
RP	apgrieztā fāze
TOCSY	totālās korelācijas spektroskopija
TOF	nolidojuma laika analizators
<i>t_R</i>	aiztures laiks
Trp	triptofāns
Tyr	tirozīns

IEVADS

Īsie peptīdi ($n < 6$) ir iesaistīti dažādos bioloģiskos procesos un atbild par daudzām cilvēka veselībai svarīgām funkcijām. Savas augstās efektivitātes un selektīvās darbības dēļ, to izmantošana arvien vairāk piesaista zinātnieku interesi gan jaunu zāļvielu kandidātu izstrādei, gan kā jaunu transporta formu jau zināmu zāļvielu ievadīšanai. Peptīdi sastāv no noteiktā secībā virknē sakārtotām aminoskābēm, kuras visas, izņemot glicīnu, ir hirālas. Gan ražošanas, gan dažādu ārēju apstākļu ietekmē nereti iespējams veidoties vairākiem peptīda stereozomēriem ar potenciāli atšķirīgu vai pat nevēlamu bioloģisko aktivitāti, tādēļ nepieciešamība pēc sarežģītu diastereomēru un enantiomēru maisījumu sadales metodēm ir būtiska gan bioloģijas, gan medicīnas zinātnes nozarēs, t.sk. farmācijā.

Mūsdienās, hirālu savienojumu enantiosadalei lieto dažādas analītiskās metodes, no kurām izplatītākā ir augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija (HPLC), izmantojot hirālas stacionārās fāzes (CSP). Ir zināms, ka CSP, kuru pamatā ir krauna ēteri, veiksmīgi izmantoti dažādu hirālu savienojumu enantiomēru atdalīšanai, kas satur pirmējās aminogrupas, tostarp dažādus neaizsargātus di- un tripeptīdus. Diemžēl trūkst pētījumu, kas apskata sarežģītākus analītus, piemēram tetrapeptīdus. Dalāmo savienojumu sarežģītās stereokīmiskās struktūras dēļ ir praktiski neiespējami prognozēt kā pētāmā analīta stereozomēri uzvedīsies hromatogrāfiskajā sistēmā. Tādēļ visbiežāk analītiskās sadales metodes tiek izstrādātas pēc mēģinājumu un kļūdu metodes (*trial and error*).

Kaut arī vispārīgi zināmi, precīzi peptīdu hirālās atpazīšanas mehānismi uz krauna ētera CSP nav pilnībā izpētīti. No mehānistiskā viedokļa nav zināms, tieši kāds ir katras peptīda funkcionālās grupas ieguldījums mijiedarbības ar hirālo selektoru. Lai labāk izprastu jau esošās pieejas kā arī radītu perspektīvas stratēģijas, izstrādājot analītiskās metodes hirālu īso peptīdu enantiosadalei, nepieciešams izveidot pamatu padziļinātai izpratnei par hirālās sadales mehānismiem uz krauna ētera fāzēm.

Promocijas darba mērķis ir izpētīt īso peptīdu hirālās atpazīšanas mehānismu uz krauna ētera stacionārajām fāzēm, apvienojot HPLC, augstas izšķirtspējas masas spektrometriju (HRMS) un kodolu magnētiskās rezonanses spektroskopijas (NMR) metodes, izmantojot zināmu μ -opioīdu agonistu Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ kā tetrapeptīda modeļvielu.

Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši **uzdevumi**:

1. Veikt visu sešpadsmit Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ stereozomēru sintēzi un izpētīt komerciāli pieejamu krauna ētera hirālo stacionāro fāžu pielietojamību Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ stereozomēru hromatogrāfiskajai sadalei.
2. Ievadot dažādas aminoskābes pie tetrapeptīda N-gala un Phe pozīcijā, sintezēt Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ struktūras analogus un izvērtēt struktūrā ievadīto aminoskābju atlikumu ietekmi uz tetrapeptīdu aizturi un enantiosadali uz CROWNPAK **CR-I** fāzēm.

3. Sintezēt visus iespējamus Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ struktūras analogus, kuros ar krauna ētera hirālajiem selektoriem saistīties spējīgās aminogrupas ir selektīvi aizstātas ar inertām hidroksilgrupām un noskaidrot, kura aminogrupa ir iesaistīta hirālajā atpazīšanā uz CROWNPAC **CR-I** fāzēm.
4. Sintezēt CROWNPAC **CR-I** stacionāro fāžu hirālos selektorus un izpētīt saistīšanos starp Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ LLLL un DDDD-enantiomēriem un sintezētajiem selektoriem ar HRMS un NMR metodēm.

Promocijas darba zinātniskā novitāte:

1. Pirmo reizi ziņots par tetrapeptīda (Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂) hirālo sadali uz krauna ēteru hirālajām stacionārajām fāzēm.
2. Konstatēts, ka stacionārās fāzes, kas veidotas uz (*R*) un (*S*)-(3,3'-difenil-1,1-binaftil)-20-krauna-16 hirālo selektoru bāzes ir perspektīvākās Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ un desmit tā struktūras analogu enantiosadalei.
3. Darbā pirmo reizi parādīts, ka, analizējot vienu analītu uz divām pretējas hiralitātes CROWNPAC **CR-I (+)** un **CR-I (-)** stacionārajām fāzēm, iespējams gan palielināt sadalīto tetrapeptīda stereoizomēru skaitu, gan izvērtēt CSP enantiosadales spēju attiecībā uz noteiktu enantiomēru pāri arī tad, ja pieejams tikai viens no enantiomēriem.
4. Apvienojot HPLC, HRMS un KMR metodes, izpētīts viena Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ enantiomēru pāra hirālās atpazīšanas mehānisms uz (3,3'-difenil-1,1-binaftil)-20-kraunu-16 fāzēm.
5. Noskaidrots, ka vairāk kā viena aminogrupa Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ struktūrā var vienlaikus saistīties ar vairākām selektora molekulām uz sorbenta virsmas. Šāda saistīšanās stehiometrija iepriekš literatūrā nav aprakstīta.

Pētījuma praktiskais pielietojums:

Darbā aprakstītā tetrapeptīdu hromatogrāfiskā uzvedība uz (3,3'-difenil-1,1-binaftil)-20-kraunu-16 stacionārajām fāzēm var būtiski palīdzēt turpmāk jaunu, nezināmu īso peptīdu enantiosadalē. Iegūtie dati ir viegli pielietojami praksē peptīda tipa zālvielu kandidātu hirālās tīrības noteikšanas metožu izstrādē uz krauna ētera stacionārajām fāzēm. Ir pamats prognozēt, ka izstrādāto metožu izmantošana var tikt pielietota dažādu peptīdu attīrīšanā, kas ir svarīgi zinātniskajos pētījumos un farmācijas nozarē.

Promocijas darbā, izmantotā netradicionālā pieeja (divas hirālās kolonnas, ar pretējas hiralitātes selektoriem viena parauga analīzei), var kalpot sarežģītu stereoizomēru maisījumu sastāva noteikšanai. Turklāt, gadījumos, kad ir pieejams tikai viens savienojuma enantiomērs, šī pieeja ļauj salīdzinoši ātri un lēti novērtēt vai stacionārās fāzes hirālais selektors ir enantioselektīviivs attiecībā pret noteiktas konfigurācijas enantiomēru pāri.

Darbā aprakstīto HPLC, HRMS un NMR metožu izmantošanu saistīšanās pētījumos var izmantot kā piemēru turpmākai sistemātiskai hirālās atpazīšanas mehānisma noskaidrošanai dažādām hirālo selektoru un analītu klasēm. Izpētīto

starpmolekulāro mijiedarbību profils var kalpot par pamatu jaunu hirālo stacionāro fāžu izstrādei.

Publicētie zinātniskie raksti.

1. **Upmanis, T.**; Kažoka, H.; Arsenyan, P. A study of tetrapeptide enantiomeric separation on crown ether based chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1622*, 461152. *Q1*, *IF*₂₀₂₃ = 3.8
T. Upmanis izstrādāja 90% no eksperimentālā darba apjoma, izstrādāja plānu un uzrakstīja publikāciju, noformēja pētījuma rezultātus atbilstoši žurnāla prasībām, kā arī sagatavoja atbildes uz recenzentu jautājumiem un aizrādījumiem.
2. **Upmanis, T.**; Kažoka, H. Application of Commercially Available Crown Ether Chiral Stationary Phases for Separation of Tetrapeptide Stereoisomers, *Acta Pharm. Hung.* **2021**, *91*, 324–325.
T. Upmanis izstrādāja 90% no eksperimentālā darba apjoma, izstrādāja plānu un uzrakstīja publikāciju, noformēja pētījuma rezultātus atbilstoši žurnāla prasībām, kā arī sagatavoja atbildes uz recenzentu jautājumiem un aizrādījumiem.
3. **Upmanis, T.**; Kažoka, H. Influence of amino acid residue on chromatographic behaviour of μ -opioid receptor agonist tetrapeptide analogue on crown ether based chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* **2022**, *1673*, 463059. *Q1*, *IF*₂₀₂₃ = 3.8
T. Upmanis izstrādāja 90% no eksperimentālā darba apjoma, izstrādāja plānu un uzrakstīja publikāciju, noformēja pētījuma rezultātus atbilstoši žurnāla prasībām, kā arī sagatavoja atbildes uz recenzentu jautājumiem un aizrādījumiem.
4. **Upmanis, T.**; Kažoka, H. Mechanistic insights in chiral recognition of μ -opioid receptor agonist tetrapeptide on crown ether chiral stationary phase. *J. Chromatogr. Open* **2021**, *1*, 100016.
T. Upmanis izstrādāja 90% no eksperimentālā darba apjoma, izstrādāja plānu un uzrakstīja publikāciju, noformēja pētījuma rezultātus atbilstoši žurnāla prasībām, kā arī sagatavoja atbildes uz recenzentu jautājumiem un aizrādījumiem.
5. **Upmanis, T.**; Sevostjanovs, E.; Kažoka, H. Chiral recognition mechanism studies of Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ tetrapeptide on crown ether based chiral stationary phase. *Chirality* **2024**, *36(1)*, e23619. *Q3*, *IF*₂₀₂₃ = 2.8
T. Upmanis izstrādāja 80% no eksperimentālā darba apjoma, izstrādāja plānu un uzrakstīja publikāciju, noformēja pētījuma rezultātus atbilstoši žurnāla prasībām, kā arī sagatavoja atbildes uz recenzentu jautājumiem un aizrādījumiem.

Zinātniskās konferences.

1. **Upmanis T.**; Kažoka H.; Arsenyan P. Chiral resolution of Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ tetrapeptide stereoisomers on crown ether chiral stationary phases. *12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*, **2019**, Šiofoka, Ungārija (stenda referāts/ tēzes).
2. **Upmanis T.**; Kažoka H.; Arsenyan P. HPLC study of tetrapeptide enantiomeric separation on crown ether based chiral stationary phase. *Latvijas Universitātes 78. starptautiskā zinātniskā konference*, **2020**, Rīga, Latvija (mutisks ziņojums/ tēzes).
3. **Upmanis T.**; Kažoka H. Application of commercially available crown ether chiral stationary phases for separation of tetrapeptide stereoisomers. *International Conference on Advances in Pharmaceutical Drug Development, Quality Control and Regulatory Sciences (DDRS 2021)*, **2021**, Budapešta, Ungārija (stenda referāts/ tēzes).
4. **Upmanis T.**; Kažoka H. Approach of using the opposite chirality of crown ether stationary phases in chiral recognition of tetrapeptide enantiomers. *Latvijas Universitātes 80. starptautiskā zinātniskā konference*, **2022**, Rīga, Latvija (mutisks ziņojums/ tēzes).
5. **Upmanis T.**; Kažoka H. Chiral Recognition Mechanism Studies of Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ tetrapeptide on crown ether based chiral stationary phases. *33rd International Symposium on Chromatography (ISC 2022)*, **2022**, Budapešta, Ungārija (stenda referāts/ tēzes).
6. **Upmanis T.** Chiral recognition mechanism studies of short peptide chromatographic separation on crown ether stationary phase. *LOSI 3. konference*, **2023**, Rīga, Latvija (mutisks ziņojums).

1. PROMOCIJAS DARBA TEORĒTISKIE PAMATI UN PĒTĪTĀS SISTĒMAS

1.1. Peptīdu zāļvielas

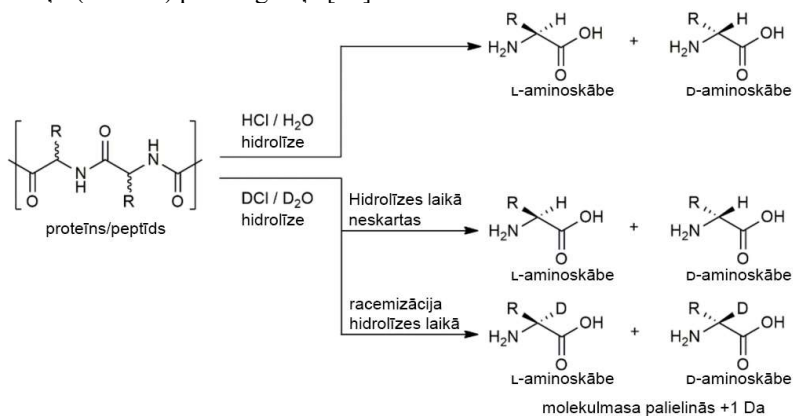
Zāļvielu atklāšanas nozarē pēdējo desmitgadu laikā ir novērojama arvien pieaugoša farmācijas industrijas interese peptīdu izmantošanai, šai savienojumu klasei ielaužoties tirgū visdažādāko slimību, kā piemēram, diabēta, vēža, osteoporozes, multiplās sklerozes, HIV, kā arī hronisku sāpju, ārstēšanai [1]. Strauji attīstoties bioloģijas un medicīnas zinātnēm, pētījumu skaits, saistībā ar dažādu peptīdu zāļvielu pielietojumu, arvien pieaug [2], veidojot nozīmīgu farmācijas tirgus daļu, 2019. gadā pārdošanas apjomam visā pasaulē pārsniedzot 70 miljardus ASV dolāru [1]. Uz šo brīdi, vairāki simti peptīdu zāļvielu kandidāti atrodas klīnisko pētījumu fāzē un vairāk kā 80 jau ir apstiprinātas klīniskai lietošanai visā pasaulē [3].

Īsie peptīdi pārstāv unikālu farmaceitisko preparātu klasi, kas sastāv no noteiktā secībā sakārtotu aminoskābju virknes un molekulārā izmēra ziņā tie atrodas starp mazmolekulāriem savienojumiem un olbaltumvielām [4], tomēr gan ķīmisko īpašību, gan darbības mehānismu ziņā peptīdi atšķiras no abiem iepriekš minētajiem [5]. Kā daudzu fizioloģisko funkciju regulējošu receptoru signālmolekulas, peptīdi (to dabiskajā formā vai modificēti) paver iespējas terapijām, izmantojot dabiskos regulācijas ceļus [6]. Citi nozīmīgi faktori, kas ir veicinājuši šo tendenci, ir augsta specifiskuma pakāpe un zems toksicitātes profils (ko nosaka to ārkārtīgi ciešā saistīšanās ar mērķiem), kas ļauj šai savienojumu klasei būt lieliskam papildinājumam vai pat vēlamajai alternatīvai mazmolekulāro savienojumu zāļvielām [7].

Peptīdu bioloģiskās funkcijas un to fizikālās īpašības ir atkarīgas no to stereoķīmiskās struktūras, ko pēc būtības nosaka virknē sakārtotu aminoskābju konfigurācija [8,9]. Visas dabas aminoskābes, izņemot glicīnu ir hirālas un pastāv D vai L formā, tādejādi iespējams veidoties vairākiem peptīda stereoizomēriem ar potenciāli atšķirīgu bioloģisko aktivitāti, [10,11]. Nereti peptīdu dabas savienojumos ir novērojama racemizācija (vai epimerizācija, atkarībā no iesaistīto stereocentru pozīcijas), kas var notikt gan sintēzes laikā, gan uzglabāšanas apstākļu ietekmē, kā arī metabolisku procesu rezultātā [12,13], veidojot sarežģītus enantiomēru / epimēru maisījumus, tādēļ precīzu un ātru hirālās tīrības kontroles metožu izstrāde peptīdiem ir ārkārtīgi būtiska gan farmācijas rūpniecībai, gan pētījumiem ķīmijas un bioloģijas zinātnes nozarēs.

1.2. HPLC pielietojums hirālu peptīdu analītu sadalei

Izplatītāka stratēģija dažādu peptīdu analītu optiskās tīrības noteikšanai ietver peptīda hidrolīzi par atsevišķām aminoskābēm [14]. Lai izvairītos no jebkādam ārēju faktoru izraisītām enantiomēru attiecības izmaiņām sākotnējā paraugā, peptīda hidrolīze tiek veikta deiterētos šķīdinātājos. Šādā gadījumā, jebkādu racemizāciju, kas notiek parauga sagatavošanas posmā, pavada deitērija apmaiņa (1.1. att.) pie α -oglekļa [15].



1.1. att. DCI / D₂O peptīdu hidrolīzes shematisks attēlojums [16].

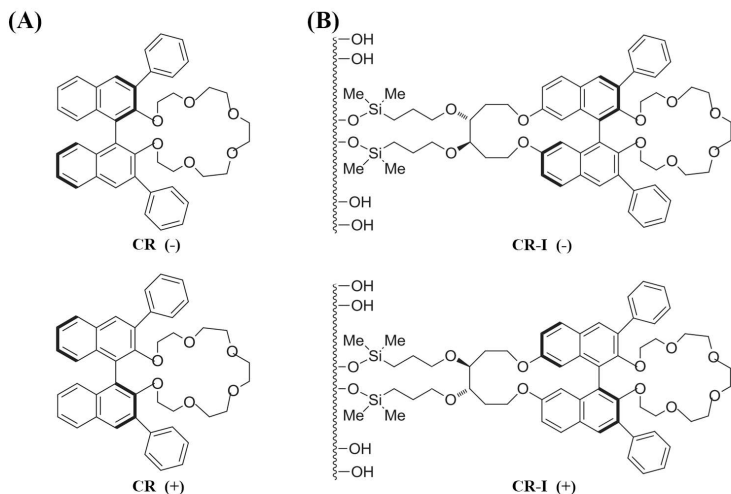
Tālāk, hidrolīzes ceļā iegūtās aminoskābes tiek pakļautas hirālai derivatizācijai (piem., izmantojot *Mārfeja* reaģentu [17]) un ar šķidrums hromatogrāfijas-masspektrometrijas metodēm netieši (enantiomērus pārvēršot par diastereomēriem) analizētas ahirālos apstākļos, kur aminoskābju molekulas, kas racemizējušās hidrolīzes laikā un ir iezīmētas ar deitēriju (radot +1 masas atšķirību) secīgi var tikt atdalītas masspektrometriski [17]. Aprakstītās stratēģijas trūkumi ietver sevī nepieciešamību pēc dārgiem deitēriem šķīdinātājiem un masspektrometrijas aprīkojuma, piedevām, derivatizācijas solis inens papildus sarežģītību paraugu sagatavošanas gaitā, paildzina analīzes laiku un samazina metodes robustumu, ievēdot jaunus potenciālu kļūdu avotus [18].

Ideālā gadījumā, iepriekš aprakstītos metodes trūkumus varētu novērst, analizējot hirālus peptīdus tieši - tos iepriekš nemodificējot. Aminoskābju enantiomēru tiešās hromatogrāfiskās sadales metodēm izstrādāts plašs hirālo stacionāro fāžu klāsts, kas veidotas uz dažādu tipu hirālajiem selektoriem. Diemžēl, dalāmo analītu stereoķīmiskās sarežģītības dēļ (ar katru nākamo struktūrā ievadīto aminoskābi (n) peptīda stereozomēru skaits palielinās eksponenciāli 2^n), panākumi dažādu tiešo sadales metožu izmantošanā, nemodificētu īso peptīdu hirālajā hromatogrāfiskajā sadalē, bijuši samērā ierobežoti, kas labi atspoguļojas relatīvi zemajā atrodamo publikāciju skaitā. Starp tām, piemēram, glicil-dipeptīdu enantiosadale panākta ar ligandu apmaiņas

hromatogrāfiju [19]. Atsevišķas neaizsargātas neproteinogēnās aminoskābes un peptīdu dabas analītu enantiosadale veikta uz polisaharīdu atvasinājumu fāzēm [20,21]. Savukārt, dažādu neaizsargātu dipeptīdu un tripeptīdu hirālajā izšķiršanā, iepriekš ziņots par CSP, kas veidotas uz makrociklisko glikopeptīdu [22–24] un ciklodekstrīnu [25,26] bāzes, izmantošanu. Divu veidu hirālās stacionārās fāzes (uz hinīna alkaloidu [27–29] un hirālu krauna ēteru bāzes [30]) ir radītas tieši aminoskābju un dažādu pirmējo aminogrupu saturošu savienojumu, kuriem pieskaitāmi arī peptīdi, sadalei.

1.3. Uz krauna ēteru bāzes veidotās hirālās stacionārās fāzes

Vienu no zināmākajiem hirālu krauna ēteru veidiem izstrādājis Donalda Dž. Krama grupa (par to saņemot Nobela prēmiju ķīmijā 1987. gadā), eksperimentējot ar optiski aktīvu 1,1'-bi-2-naftil funkciju iekļaušanu krauna ētera struktūrā [31]. Grupas veiktajos pētījumos īpaši izcelta (*R*)- un (*S*)-(3,3'-difetil-1,1-binaftil)-20-krauna-16 (1.2. att., **A**) unikālā hirālās atpazīšanas spēja attiecībā uz dažādu α -aminoskābju un to metilesteru enantiomēriem [32]. Šīs īpašības atrada pielietojumu hirālajā hromatogrāfijā un, gandrīz 10 gadus vēlāk, dinamiski uzklājot hirālo selektoru uz silikagela, tika izveidotas pirmās komerciālās krauna ēteru CSP (no *Daicel Chemical Industries*) CROWNPAK CR (+) un (-) [33].



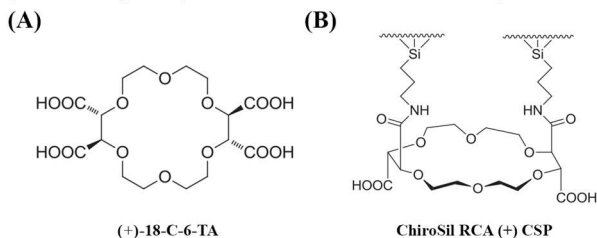
1.2. att. **Ķīmiskās struktūras:** (*R*)- un (*S*)-(3,3'-difetil-1,1-binaftil)-20-krauna-16 hirālie selektori CROWNPAK CR (-) un (+) CSP- (**A**); imobilizēta hirālā selektora versija CROWNPAK CR-I (-) un (+) CSP – (**B**).

Šīs hirālās stacionārās fāzes izrādījās ļoti efektīvas dažādu pirmējo α -aminoskābju [33,34], aril- α -aminoketonu [35], β -aminoskābju [36–38], γ -

aminoskābju [39], kā arī dažādu citu hirālu savienojumu, kas satur pirmējo aminogrupu [40,41] tajā skaitā arī dipeptīdu [42,43] enantiosadalei. Diemžēl, CSP pagatavošanas specifikas dēļ bija jārēķinās ar būtiskiem trūkumiem kā rezultātā bija jāievēro stingri noteikumi attiecībā uz mobilās fāzes šķīdinātāju izvēli. Hirālā selektora dinamiskās uzklāšanas dēļ uz sorbenta virsmas, pat 15% MeOH satura pārsniegšana mobilajā fāzē varēja neatgriezeniski bojāt CSP veikspēju, hirālo selektoru no kolonnas vienkārši “izmazgājot”.

Šos trūkumus vēlāk izdevās novērst, hirālo selektoru kovalenti saistot ar brīvajām silanola grupām uz silikagela virsmas, kā rezultātā izstrādātas imobilizētās CROWNPAK **CR-I (+)** vai **(-)** CSP (1.2. att., **B**) [44]. Tika konstatēts, ka šāda stacionārās fāzes pagatavošanas metode ievērojami palielina tās stabilitāti, ļaujot izmantot plašāku šķīdinātāju klāstu (ACN, MeOH, EtOH, 2-PrOH, THF) mobilajā fāzē kā arī neierobežojot organiskā modifikatora koncentrāciju tajā, tādā veidā paplašinot iespējas variēt ar hromatogrāfisko apstākļu piemeklēšanu nepieciešamajai sadalei. Izmantojot **CR-I (+)** un **(-)** CSP izdevies sadalīt visu proteīnogēno aminoskābju enantiomērus (izņemot prolīnu) [45], tās ir veiksmīgi pielietotas plaša klāsta α - [46,47], β - [38] un γ -aminosavienojumu [39] hirālajā izšķiršanā un vispārīgi nodrošina labāku sadales veikspēju attiecībā pret tās priekštečiem – **CR (+)** un **(-)** CSP [39].

Otru zināmāko krauna ēteru CSP, kas veidots uz (+) vai (-)-(18-krauna-6)-2,3,11,12-tetrakarbonskābes pamata (**18-C-6-TA**; 1.3. att., **A**) izstrādājusi Žana-Marī Lēna grupa (par to arī saņēmot Nobela prēmiju ķīmijā 1987. gadā), krauna ētera ciklā iekļaujot divus vīnskābes fragmentus [48]. Šis krauna ēteris plaši izmantots arī kā hirālās izšķiršanas reaģents kodolmagnētiskās rezonanses spektroskopijā [49], kapilārajā elektroforēzē [50] un masspektrometrijā [51].



1.3. att. **Ķīmiskās struktūras:** (+)-(18-krauna-6)-2,3,11,12-tetrakarbonskābe – **(A)**; imobilizēts (+)-**18-C-6-TA** hirālais selektors ChiroSil **RCA (+)** stacionārajā fāzē – **(B)**.

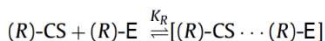
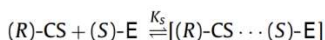
Tā kā **18-C-6-TA** labi šķīst ūdenī, tikai tā imobilizētā versija, komerciāli pazīstama kā ChiroSil **RCA (+)** (1.3. att., **B**; vai **SCA (-)**, atkarībā no hirālā selektora konfigurācijas; izstrādājusi *RStech Corporation*) tiek izmantota hromatogrāfijā. CSP, kas veidotas uz **18-C-6-TA** bāzes veiksmīgi pielietotas dažādu dabas un sintētisko α - un β -aminoskābju [52–55], otrējo amīnu [56] kā arī īso peptīdu [57] enantiosadalēs.

No apskatītās literatūras secināts, ka CSP, kas veidotas uz hirālu krauna ēteru bāzes ir vienas no daudzsološākajiem kandidātiem tiešajai īso peptīdu

hirālajai sadalei. Tomēr, lai labāk izprastu to pielietojumu tik sarežģītu analītu izšķiršanai, vispirms nepieciešams apskatīt, kas ir zināms par šo abu CSP veidu hirālās atpazīšanas mehānismiem.

1.4. Hirālā atpazīšana

Parasti CSP tiek izstrādātas tā, lai tās veidotu tādu stēriski traucētu vidi, kurā viens no izomēriem spēj ar CSP saistīties spēcīgāk nekā otrs. Atkarībā no hirālā selektora struktūras, zināms, ka dažādas vispārzināmās starpmolekulārās mijiedarbības (piemēram, jonu, ūdeņraža saites, stēriski traucējumi, π - π , dipola-dipola, jonu-dipola, van der Vālsa) caur to pievilkšanās/atgrūšanās īpašībām vistiešākajā veidā ietekmē saistīšanās spēku starp hirālo analītu un selektoru. Līdzsvara reakcijas, kas uz stacionārās fāzes virsmas atgriezeniski veido diastereomēru pārus, ir parādītas 1.4. attēlā.

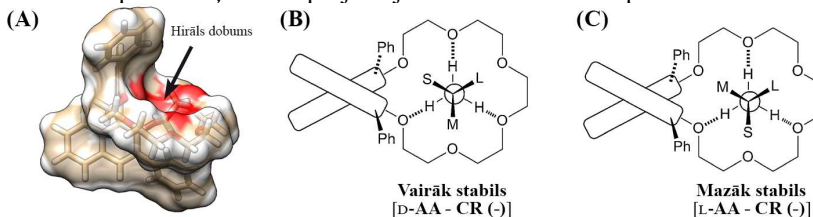


1.4. att. Shematisks diastereomēru veidošanās attēlojums [58].

Dotajā piemērā hirālais selektors (CS) ar fiksētu konfigurāciju (R), mijiedarbojoties ar analīta S -enantiomēru (S)-E, veido diastereomēru kompleksu $[(R)\text{-CS} \cdots (S)\text{-E}]$, kura stabilitāti raksturo līdzsvara konstante K_S (1.4. att. – *augšā*). Tajā pat laikā notiek arī saistīšanās starp hirālo selektoru un analīta R -enantiomēru, veidojot $[(R)\text{-CS} \cdots (R)\text{-E}]$ kompleksu, kura stabilitāti raksturo līdzsvara konstante K_R (1.4. att. – *apakšā*). Atšķirības abu kompleksu līdzsvara konstantēs atspoguļojas izomēru aizturē un kalpo par pamatu stereoselektīvai sadalei jebkurā hromatogrāfiskajā sistēmā. Izomērs, kas ar hirālo selektoru saistās vājāk, no kolonnas izdalās ātrāk, kamēr izomērs, kas ar hirālo selektoru veido stabilāku kompleksu, kolonnā aizturas ilgāk, tādā veidā, ļaujot maisījumu hromatogrāfiski sadalīt. Būtiska loma hirālajā atpazīšanā ir arī videi, kurā šīs mijiedarbības notiek, kas šķidrums hromatogrāfijā ir mobilā fāze (MP). Atkarībā no izmantoto šķīdinātāju dabas, mobilās fāzes molekulas ne tikai sacenšas ar analīta molekulām par piesaistes vietām uz hirālās stacionārās fāzes, bet arī var ietekmēt hirālā selektora stēriku, mainot hirālās atpazīšanas mehānismu.

1.4.1. Hirālā atpazīšana uz (3,3'-difenil-1,1-binaftil)-20-krauna-16 CSP

Apgrieztās fāzes (RP) apstākļos (ūdeni saturoša mobilā fāze), hirālā sadale tiek panākta, aizturot analītu kolonnā, tam selektīvi iekļaujoties selektora hirālajā dobumā (1.5. att., **A**). Saistīšanās pamatā ir trīs $^+N-H\cdots O$ ūdeņraža saišu veidošanās starp protonēto analīta amonija grupu un krauna ētera skābekļa atomiem, kam seko enantioselektīvas hidrofoobās atgrūšanās mijiedarbības starp analītu un stacionārās fāzes selektora divām 3-fenilnaftil grupām. Saistīšanās shematiski parādīta *Ņūmena* projekcijās 1.5. attēla **B** un **C** piemēros.



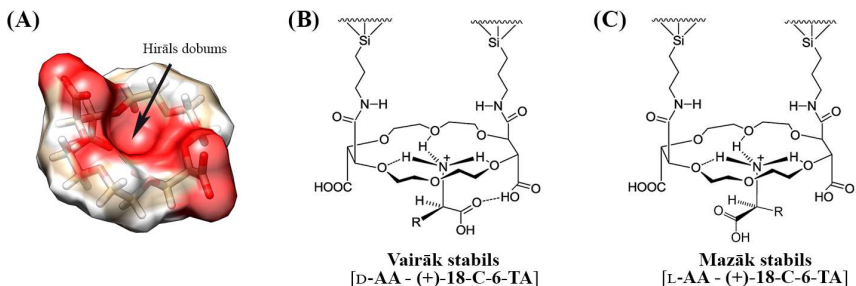
1.5. att. Piedāvātais hirālās atpazīšanas mehānisms CR (-) selektoram: CR (-) selektora elektrostatiskā potenciāla virsma, kas iegūta no kristāla struktūras [59], vizualizācija veidota ar *Chimera 1.16* programmatūru – (A); Saistīšanās rezultātā starp analīta pirmējo amonija jonu ($R-NH_3^+$) un CR (-) selektoru izveidojušies vairāk stabilie – (B); un mazāk stabilie kompleksi – (C) [32]. Aizvietotāji pie analīta hirālā oglekļa apzīmēti pēc to izmēra – liels (L), vidējs (M) un mazs (S).

Šajā gadījumā, lielākā funkcionālā grupa (L) pie analizējamā savienojuma hirālā centra aizņem telpu, kas atrodas vistālāk no selektora stēriski apjomīgās augšupvērstās 3-fenilnaftil grupas, kamēr atlikušie divi aizvietotāji, atkarībā no aminoskābes konfigurācijas, attiecīgi telpā novietojas automātiski. Stēriskie traucējumi, kas rodas starp hirālā selektora augšupvērsto 3-fenilnaftil fragmentu un L-aminoskābes vidējo funkcionālo grupu (M) ievērojami vairāk ierobežo tā piekļuvi selektora hirālajam dobumam (1.5. att., A), atšķirībā no tā attiecīgā D-enantiomēra, kur šo telpu aizņem mazākais (visbiežāk ūdeņradis) aizvietotājs (S). Rezultātā, ūdeņraža saites veidošanās starp L-enantiomēru un CR (-) selektoru ir stēriski traucēta, veidojot mazāk stabilu kompleksu (1.5. att., C), kas no kolonnas izdalās attiecīgi pirms D-enantiomēra [30]. Šādā veidā tiek skaidrota arī specifiskā enantiomēru izdalīšanās secība ($L < D$), kas uz CR (-) CSP ir spēkā visām hirālām aminoskābēm un kuru iespējams mainīt uz pretējo, izmantojot CR (+) CSP, kas satur pretējas konfigurācijas hirālo selektoru.

Atšķirīga enantioselektivitāte mobilajās fāzēs ar augstu organiskā modifikatora saturu ir atklāta tikai salīdzinoši nesn [45], jo vecākā tipa pārklātās CSP nepieļāva izmantot šādus hromatogrāfiskos apstākļus. Atšķirībā no RP apstākļiem, papildus stērisko faktoru virzītai iekļaušanas kompleksācijai caur ūdeņraža saišu veidošanos, iespējamas vēl papildus enantioselektīvas hidrofilās mijiedarbības (HILIC), tomēr precīzs šo mijiedarbību profila raksturs joprojām nav pilnībā izpētīts.

1.4.2. Hirālā atpazīšana uz (18-krauna-6)-2,3,11,12-tetrakarbonskābes CSP

Atkarībā no mobilās fāzes sastāva, arī (+) un (-)-**18-C-6-TA** CSP tiek apskatīti divi iespējamie mehānismi, lai izskaidrotu hirālo sadali [52,60]. RP apstākļos, papildus ūdeņraža saišu virzītai pirmējā amonija jona iekļaušanās kompleksācijai 18-krauna-6 cikla hirālajā dobumā (1.6. att., A), stēriski traucējumi starp **18-C-6-TA** divām karbonskābes grupām un stēriski apjomīgākajiem α -aminosavienojuma aizvietotājiem ierobežo analīta piekļuvi saistīšanās vietai. Rezultātā viens no enantiomēriem spēj saistīties ciešāk un veido stabilāku diastereomēru kompleksu kā otrs, ļaujot tos hromatogrāfiski sadalīt. Līdzīgi kā CR (+) un (-) hirālajiem selektoriem, arī uz **18-C-6-TA** CSP ir raksturīga noteikta enantiomēru izdalīšanās secība. Aminorskābju D-enantiomēri veido stabilākus kompleksus ar (+)-**18-C-6-TA** hirālo selektoru, kamēr L-enantiomēri ar (-)-**18-C-6-TA**.



1.6. att. **Piedāvātais hirālās atpazīšanas mehānisms (+)-18-C-6-TA selektoram: (+)-18-C-6-TA selektora elektrostatiskā potenciāla virsma, kas iegūta no kristāla struktūras [61], vizualizācija veidota ar *Chimera 1.16* programmatūru – (A); Iespējamie stabilākie (B) un mazāk stabilie (C) kompleksi kas izveidojušies, saistoties α -aminorskābēm ar CSP, kas veidotas uz (+)-**18-C-6-TA** selektora bāzes [62].**

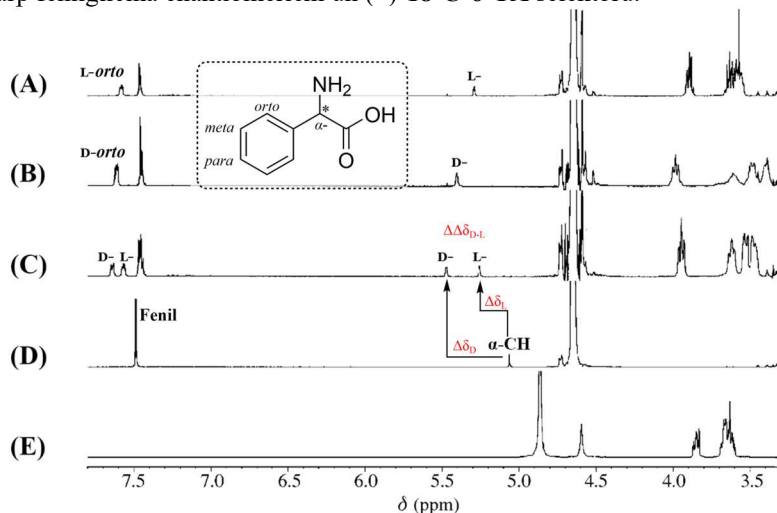
Ar organisko modifikatoru bagātās mobilajās fāzēs hirālā selektora divas sānu karbonskābes grupas var darboties kā papildu ūdeņraža saites donoru vai akceptoru grupas. Kā parādīts 1.6. attēla B un C piemēros, saistoties ar (+)-**18-C-6-TA**, α -aminorskābes D-enantiomēra karboksilgrupa veido papildu H-saiti ar vienu no selektora karboksilgrupām, radot stabilāku diastereomēru kompleksu (1.6. att., B). Savukārt, karboksilgrupa L-enantiomēra struktūrā ir telpā novirzīta prom no hirālā selektora karboksilgrupām un nevar piedalīties H-saites veidošanā, tādējādi veidojas mazāk stabils komplekss (1.6. att., C).

Diemžēl, literatūra aprakstītie pētījumi ir lielākoties teorētiski, tiem nav pietiekamas eksperimentālās bāzes un tie pārsvarā apskata vienkāršotus hirālās atpazīšanas modeļus, izmantojot aminorskābes. Jāņem vērā, ka peptīdu dabas analītu gadījumā ir jāreķinās ar vairāku hirālo centru klātbūtni, bez tam, peptīds var saturēt citus mijiedarbībās saistīties spējīgus fragmentus, tādēļ no mehānistiskā viedokļa nav zināms, tieši kāds ir katras peptīda funkcionālās

grupas ieguldījums mijiedarbībās ar hirālo selektoru. Sīkāk par populārākajiem paņēmieniem hirālās atpazīšanas pētīšanai aprakstīts nākamajā nodaļā.

1.5. Dažādas pieejas hirālās atpazīšanas pētīšanai

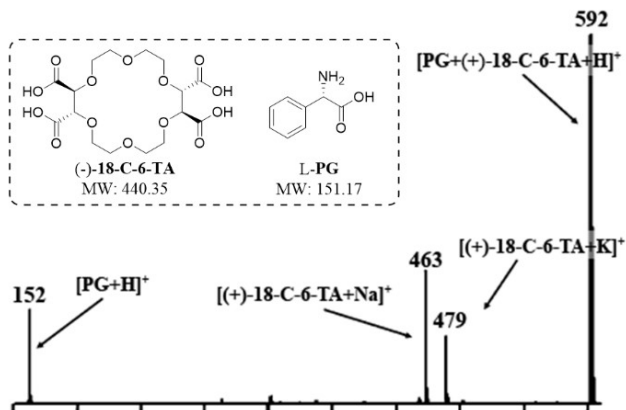
Hirālās atpazīšanas pētījumiem lietotas dažādas zināmas organisko savienojumu pētīšanas metodes. Starp spektroskopiskajām metodēm [63–65], viena no plašāk pielietotajām ir kodolu magnētiskā rezonanse, ar kuras palīdzību hirālā atpazīšana skaidrota dažādiem šķīduma hromatogrāfijā [66–68] un kapilārajā elektroforēzē [69,70] izmantotajiem hirālajiem selektoriem. Kā parādīts 1.7. attēla piemērā, $^1\text{H-NMR}$ lietota hirālās kompleksēšanās pētījumiem starp fenilglicīna enantiomēriem un (+)-**18-C-6-TA** selektoru.



1.7. att. $^1\text{H-NMR}$ fenilglicīna un ekvimolāru fenilglicīna/(+)-**18-C-6-TA** kompleksu (2 mM šķīdumi $\text{MeOH-}d_4$) spektri: L-fenilglicīns ar (+)-**18-C-6-TA** - (A); D-fenilglicīns ar (+)-**18-C-6-TA** - (B); fenilglicīna racemāts ar (+)-**18-C-6-TA** - (C), fenilglicīna racemāts - (D), brīvs (+)-**18-C-6-TA** - (E) [68].

Saistoties divām molekulām, elektrisko un magnētisko lauku pārklāšanās ietekmē iesaistīto atomu kodolu rezonansi, ko novēro kā ķīmisko nobīžu (δ) izmaiņas ($\Delta\delta$) NMR spektrā. Dotajā piemērā (1.7. att., C), redzams, ka, pievienojot ekvimolāru daudzumu (+)-**18-C-6-TA** selektora fenilglicīna racemātam, fenilglicīna α -protona un *ortho*-fenilprotonu signāli sašķeļas divās signālu kopās, norādot uz atšķirīgām diastereomēru kompleksu ķīmiskajām struktūrām, kas veidojušās saistoties L-fenilglicīnam ar (+)-**18-C-6-TA** un D-fenilglicīnam ar (+)-**18-C-6-TA**. Turklāt, pēc ķīmisko nobīžu izmaiņu ($\Delta\delta$) lieluma NMR spektrā var secināt, kuri atomi ir tieši iesaistīti starpmolekulārās mijiedarbībās.

Kā cita parocīga metode, lai pētītu divu molekulu saistīšanos kompleksā [51,71], kā arī apstiprinātu kompleksēšanās stehiometriju [72], tiek izmantota arī masspektrometrija. Šādā veidā, mākslīgi sajaucot pētāmo analītu un hirālo selektoru šķīdumā un to tieši ievadot masspektrometrā, ar elektroizsmidzināšanas jonizācijas (ESI) nolidojuma laika (TOF) masspektrometrijas metodi pētīta kompleksēšanās starp L-fenilglicīnu un (-)-18-C-6-TA selektoru (1.8. att.).

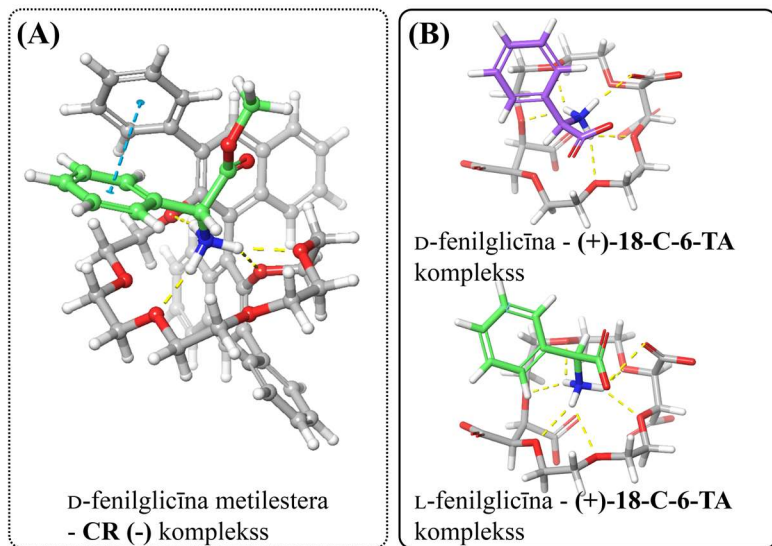


1.8. att. Daļējs ESI-TOF masspektrs ekvimolāram (10^{-5} M šķīdums MeOH) L-fenilglicīna (PG) un (-)-18-C-6-TA maisījumam [51].

Kā redzams attēlotajos masspektros, izveidojušais komplekss spēj izturēt pāreju no šķīduma fāzes sagatavotajā parauga šķīdumā uz gāzes fāzi masspektrometrā un tā molekulārais jons redzams pie m/z vērtības 592. Papildus, novēro arī (-)-18-C-6-TA nātrija (m/z 463) un kālija (m/z 479) aduktus, kā arī nesaistītu L-fenilglicīnu (m/z 152). Lai arī šādi MS eksperimenti apstiprina apskatīto divu molekulu saistīšanos kompleksā, vieni paši tie nesniedz padziļinātu informāciju par hirālo atpazīšanu un vairāk kalpo kā papildinājums citām organisko savienojumu pētīšanas metodēm.

Kā vēl vienu svarīgu struktūras analīzes metodi, ieskata gūšanai par dažādu molekulu savstarpēju saistīšanos, jāmin rentgenstaru difrakciju, kas sniedz visaptverošu informāciju par izveidotā kompleksa strukturālajām īpašībām cietā stāvoklī [73,74]. Rentgenstaru difrakcija izmantota arī lai skaidrotu krauna ēteru spēju hirāli atpazīt dažādu aminoskābju enantiomērus. Šādā veidā, kokristalizējot D-fenilglicīna metilestera perhlorātu ar CR (-) hirālo selektoru metanolā [59], skaidrots saistīšanās mehānisms starp abām molekulām. Šajā piemērā, kokristāla struktūras analīze (1.9. att., A) norāda uz trīskāršu $^+N-H \cdots O$ ūdeņraža saites veidošanos starp D-fenilglicīna metilestera amonija jonu un krauna ētera cikla skābekļiem, kā arī C-H $\cdots \pi$ mijiedarbības starp abu molekulu aromātiskajiem fragmentiem. Citā darbā [74], lai demonstrētu atšķirīgus saistīšanās mehānismus starp fenilglicīna enantiomēriem un (+)-18-C-6-TA

hirālo selektoru, iegūti attiecīgie kokristāli no 10 mM HClO₄ ūdens šķīduma (1.9. att., **B**). Diemžēl labas kvalitātes kristālu, it īpaši noteiktu molekulu kokristālu iegūšana, bieži ir problemātiska.

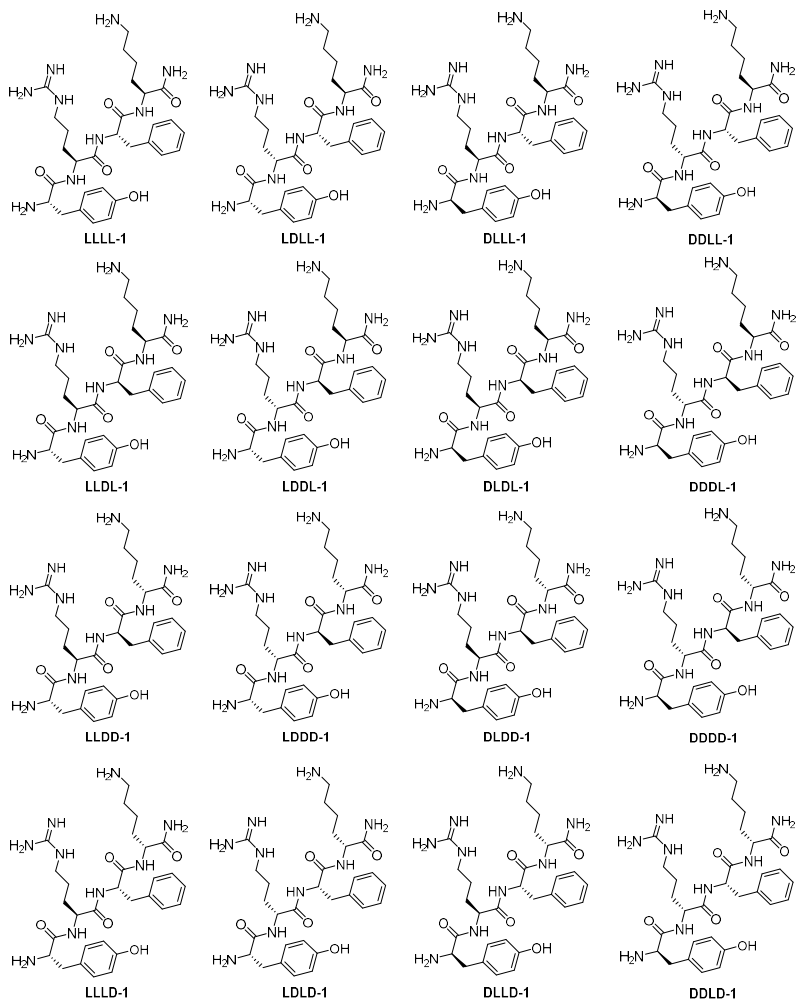


1.9. att. Starpmolekulāro mijiedarbību stereoskati kompleksos, kas iegūti ar rentgenstaru difrakcijas metodi: D-fenilglicīna metilestera koplekss ar CR (-) selektoru [59] – (A); fenilglicīna enantiomēru kompleksi ar (+)-18-C-6-TCA hirlo selektoru [74] – (B). Mijiedarbības vizualizētas ar *Maestro 13.4* programmatūru.

Pēdējos gados hromatogrāfijas zinātne tieši hirālās atpazīšanas pētījumu virzienā kļuvusi arvien pieņemošāka attiecībā pret dažādām skaitļošanas metodēm, kombinējot dažādas molekulārās modelēšanas metodes ar eksperimentālām tehnikām, lai raksturotu molekulu kompleksēšanos [75,76]. Tomēr svarīgi ir ņemt vērā, ka lielākā daļa skaitļošanas metožu ir izstrādātas proteīnu izpētei un šo metožu pielāgošana hromatogrāfijas problēmu pētīšanai var izrādīties problemātiska, kaut vai ticamu hirālo selektoru struktūru iegūšanai.

1.6. Pētāmie objekti

Lai pētītu krauna ēteru spēju hirāli atpazīt īso peptīdu izomērus, promocijas darbā kā modeļviela izvēlēts Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ tetrapeptīds (**1**; 1.10. att.), kura LDLL-stereoizomērs zināms kā selektīvs μ -opioidu receptoru agonists *DALDA* [77]. Tetrapeptīda **1** struktūra satur 4 hirālos centrus, kā rezultāta iespējami 16 stereoizomēri, kas, uzsākot darbu, tika sintezēti.



1.10. att. Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ stereozomēru struktūras.

Šis tetrapeptīds tika izvēlēts, jo tas sastāv no četrām atšķirīgām aminoskābēm, satur dažādus ūdeņraža saites donorus – brīvu α -aminogrupu pie N-gala tirozīna, ϵ -aminogrupu C-gala lizīna atlikumā, kā arī guanidīna fragmentu arginīnā, kuri teorētiski visi var piedalīties mijiedarbībās ar hirālo selektoru. Tādējādi no mehānisma skata punkta nav zināms katras šīs grupas ieguldījums kompleksa veidošanā. Papildus, šis tetrapeptīds arī satur atšķirīgus aromātiskos aizvietotājus, kas ne tikai nodrošina UV absorbciju, bet var arī iesaistīties papildus mijiedarbībās ar hirālo selektoru.

2. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

2.1. Krauna ēteru CSP pielietojums Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ enantiomēru un stereoizomēru hromatogrāfiskajai sadalei¹

Lai noskaidrotu uz krauna ēteru bāzes veidoto CSP perspektīvas īso peptīdu hirālajā sadalē, uz divām komerciāli pieejamām krauna ēteru CSP: CROWNPAC **CR-I (+)** (1.2. att., **B**) un ChiroSil **RCA (+)** (1.3. att., **B**), pētīta visu sešpadsmit Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ (**1**; 1.10. att.) stereoizomēru hromatogrāfiskā uzvedība. Detalizētāks eksperimentālā darba apraksts atrodams I Pielikuma 2.2. – 2.5. nodaļās.

Lai nodrošinātu pilnīgu tetrapeptīda **1** aminogrupu protonēšanos, tika secināts, ka tetrapeptīda **1** enantiomēru sadalei uz **CR-I (+)** un **RCA (+)** CSP optimālus apstākļus var sasniegt mobilajai fāzei pievienojot HClO₄ (visās pētāmajās MP ar nemainīgu koncentrāciju – 50 mM; ūdens šķīdumā atbilst pH 1.5).

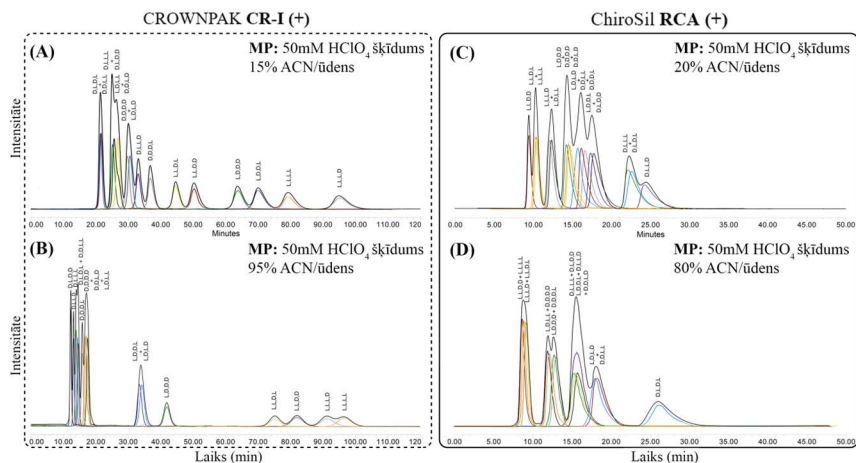
Sākot eksperimentālo darbu, par MP organisko modifikatoru izvēlēts acetonitrils (ACN). Vispirms, tika izpētīti Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ stereoizomēru aiztures profili uz abām krauna ēteru CSP izokrātiskā režīmā, mainot ACN daudzumu ACN/ūdens MP no 15 līdz 95% uz **CR-I (+)** un no 10 līdz 80% uz **RCA (+)** CSP. Grafiska aiztures laika (*t_R*) atkarība no ACN koncentrācijas mobilajā fāzē astoņiem pētītajiem tetrapeptīda **1** enantiomēru pāriem redzama 2.1. attēlā. Visiem tetrapeptīda **1** stereoizomēriem novērotas paraboliskas līknes ar minimumiem 50-75% ACN diapazonā uz **CR-I (+)** un 50% ACN uz **RCA (+)** CSP. Redzams, ka stereoizomēru aizture palielinās mobilajās fāzēs ar zemāku (<25% uz **CR-I (+)**; <35% uz **RCA (+)** CSP) un augstāku (>90% uz **CR-I (+)**; >75% uz **RCA (+)** CSP) acetonitrila saturu. Līdzīga paraboliska aiztures atkarība no mobilās fāzes organiskā modifikatora daudzuma iepriekš literatūrā aprakstīta metilaizvietotiem anilīniem [78] un dažādām proteīnogēnām aminoskābēm [45], un skaidrota ar atšķirīgiem saistīšanās mehānismiem uz krauna ēteru CSP: apgrieztās fāzes vai RP mehānismu (ūdens bagātās mobilajās fāzēs) un HILIC-veida mehānismu (augsta ACN satura MP).

Iepriekš nav veikti pētījumi, kas apraksta izdalīšanās secību savienojumiem, kas satur vairākas potenciāli saistīties spējīgas funkcionālās grupas kā tas ir īsajos peptīdos. Ir zināms (1.4. nodaļa), ka uz **CR-I (+)** CSP raksturīgā aminoskābju izdalīšanās secība ir D < L, savukārt uz **RCA (+)** CSP - L < D. Darbā noskaidrots, ka arī tetrapeptīda **1** LXXX-konfigurācijas (L-Tyr pie N-gala; 1.10. att.) stereoizomēri **CR-I (+)** kolonnā aizturas spēcīgāk kā to attiecīgie D-enantiomēri (DXXX; 2.1. att., **A**), savukārt uz **RCA (+)** - enantiomēru izdalīšanās secība ir pretēja (DXXX > LXXX; 2.1. att., **B**). Novērotās izdalīšanās secības norāda uz iespējamu N-gala α -aminoskābes – Tyr iesaisti kompleksu

¹ **Upmanis, T.**; Kažoka, H.; Arsenyan, P. A study of tetrapeptide enantiomeric separation on crown ether based chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1622*, 461152 (I Pielikums).

pāru sadali, norādot, ka pat vienas molekulas ietvaros, atkarībā no aizvietotāju stēriskā izvietojuma tetrapeptīda **1** struktūrā, hirālās atpazīšanas mehānismi atšķiras, tādēļ, strādājot ar nezināmu pētāmo objektu, svarīgi izpētīt abu eluēšanas režīmu pielietojumu.

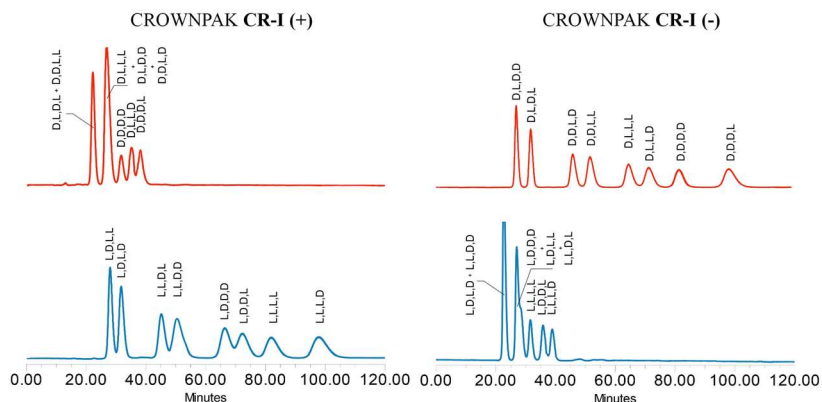
Tā, veicot vienlaicīgu sešpadsmit tetrapeptīda **1** stereoizomēru hromatogrāfisko analīzi (2.2. att. - *attēloti melnā krāsā*) uz **CR-I (+)** un **RCA (+)** CSP, tika konstatēts, ka perspektīvākā ir **CR-I (+)** CSP, uz kuras, lietojot MP ar zemu acetnitrila saturu (15% ACN), izdēvies izšķirt septiņus, galvenokārt, LXXX-konfigurācijas stereoizomērus (2.2. att., **A**). Izmantojot ar ACN bagātu mobilo fāzi (2.2. att., **B**) no maisījuma pilnībā atdalīts tikai LDDD-stereoizomērs. Savukārt, neatkarīgi no mobilās fāzes sastāva, krietni vājāka stereoselektivitāte attiecībā pret tetrapeptīda **1** izomēriem, novērota uz **RCA (+)** CSP (2.2. att., **C** un **D**), tādēļ turpmāk promocijas darbā pētītas tikai **CR-I** fāzes.



2.2. att. Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ stereoizomēru (*attēloti melnā krāsā*) un enantiomēru (*attēloti krāsaini*) sadale uz **CR-I (+)** CSP - (**A**) un (**B**); **RCA (+)** CSP – (**C**) un (**D**). Kolonnas: CROWNPAK CR-I (+) (3.0 ×150 mm, 5μm); ChiroSil RCA (+) (4.6 ×150 mm, 5μm); Plūsmas ātrums: F = 0.4 mL/min uz **CR-I (+)**; F = 1 mL/min uz **RCA (+)**; Injekcijas tilpums: 10 μL; UV detektēšana veikta pie λ = 220 nm.

2.2. Krauna ēteru stacionāro fāžu pretējās hiralitātes izmantošana Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ stereoizomēru sadalē²

Lai risinātu problēmu ar N-gala D-tirozīna saturošo Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ DXXX-konfigurācijas stereoizomēru vājo sadali (2.2. att., **A** un **B**) uz **CR-I (+)** CSP, tika izmēģināta uz *R*-(3,3'-difenil-1,1'-binaftil)-20-krauna-6 hirālā selektora veidotā **CR-I (-)** CSP (1.2. att., **B**). Zinot, ka enantiomēru izdalīšanās secību uz **CR-I** CSP iespējams mainīt uz pretējo, veicot hromatogrāfisko analīzi uz stacionārās fāzes, kas satur pretējās hiralitātes selektoru, šajā darbā piedāvāta netrādicionāla pieeja, lai palielinātu izšķirto tetrapeptīda **1** stereoizomēru skaitu. Kā redzams no 2.3. attēla, maisījumu, kas satur visus astoņus tetrapeptīda **1** DXXX-konfigurācijas stereoizomērus, iespējams sadalīt līdz bāzes līnijai uz **CR-I (-)** CSP, savukārt, identiskos apstākļos uz **CR-I (+)** fāzes, DXXX-stereoizomēru sadale ir vāja. Šādā veidā, veicot visu Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ stereoizomēru maisījuma analīzi uz abām **CR-I** kolonnām, teorētiski iespējams identificēt un izšķirt 12 no 16 tetrapeptīda **1** stereoizomēru.



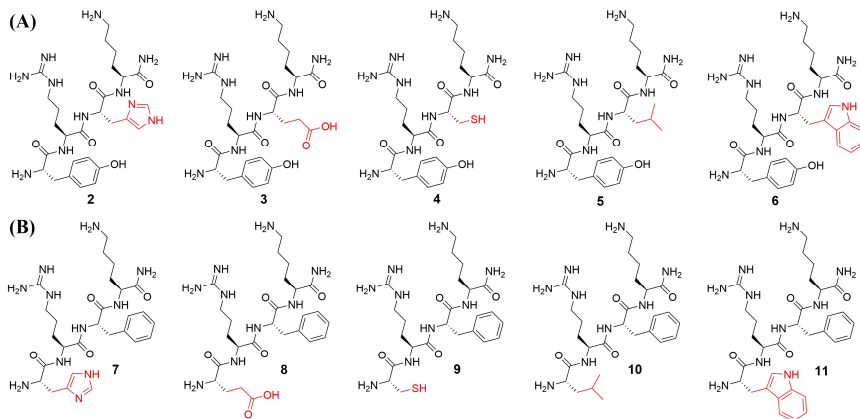
2.3. att. Tetrapeptīda **1** DXXX (*attēlots sarkanā krāsā*) un LXXX-stereoizomēru (*attēlots zilā krāsā*) sadale uz **CR-I (+)** un **CR-I (-)** CSP. Mobilā fāze: 50 mM HClO₄ šķīdums 15% ACN/ūdens.

Šāda pieeja aprakstīta pirmo reizi un būtu jāapsver reālu paraugu analīzē, kur pretējās hiralitātes selektoru **CR-I** CSP unikālā selektivitāte var sniegt plašāku ieskatu par hirālo piemaisījumu (stereoizomēru) sastāvu sarežģītos izomēru maisījumos, kā piemēram, peptīdos.

² **Upmanis, T.**; Kažoka, H. Application of Commercially Available Crown Ether Chiral Stationary Phases for Separation of Tetrapeptide Stereoisomers, *Acta Pharm Hung.* **2021**, *91*, 324–325 (II pielikums).

2.3. Ievadītās aminoskābes dabas ietekme uz tetrapeptīda 1 struktūras analoģu hromatogrāfisko uzvedību uz CR-I CSP³

Ir labi zināms, ka pat nelielas izmaiņas hirāla analīta struktūrā var pilnībā izmainīt tā hromatogrāfisko uzvedību. Tādēļ, lai paplašinātu zināšanas šajā jomā, tika sintezēti desmit tetrapeptīdi **2** – **11** (2.4. att.; LLLL-enantiomēri).



2.4. att. **Modificēto tetrapeptīda 1 analoģu struktūras:** tetrapeptīdi **2** – **6** modificēti Phe pozīcijā – (A); tetrapeptīdi **7** – **11** modificēti pie N-gala – (B).

Lai aptvertu iespējami atšķirīgāku aminoskābju klāstu, izvēlētas: histidīns (His; polāra, bāziska), glutamīnskābe (Glu; polāra, skāba); cistīns (Cys; polāra, neitrāla, sēru saturoša), leicīns (Leu; nepolāra, alifātiska) un triptofāns (Trp; nepolāra, aromātiska). Aminoskābes ievadītās tetrapeptīda **1** Phe pozīcijā (2.4. att., **A**) kā arī N-gala aminoskābes pozīcijā (2.4. att., **B**), ar mērķi izpētīt kā aminoskābes daba un pozīcija tetrapeptīdu **2** – **11** struktūrās ietekmē to hromatogrāfisko uzvedību uz **CR-I** (+) un (-) CSP (eksperimenti sīkāk aprakstīti III Pielikuma 2.2. – 2.4. nodaļās).

2.3.1. Ievadītās aminoskābes ietekme uz tetrapeptīda aizturi

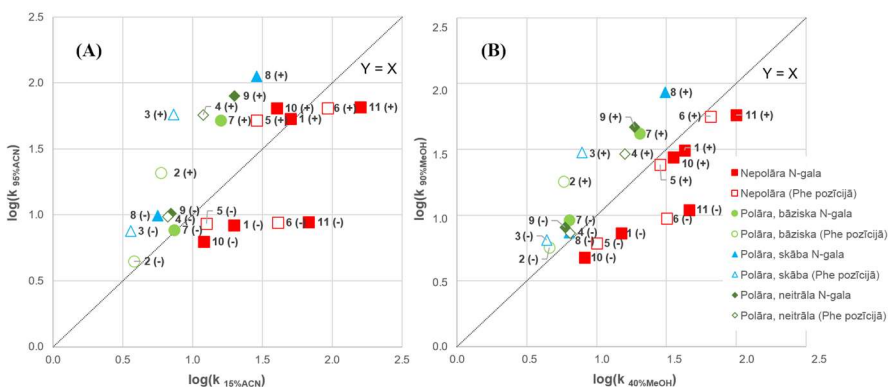
Vispirms, lai pārliecinātos, ka jaunsintezēto tetrapeptīdu **2** – **11** aizture seko uz tetrapeptīda **1** novērotajām tendencēm, tika izpētīta to hromatogrāfiskā uzvedība uz **CR-I** (+) un (-) CSP ar 50 mM HClO₄ ACN/ūdens mobilajām fāzēm. Pēc tam tika veikti pētījumi arī ar MeOH saturošām MP. Lai arī pastāv uzskats, ka MeOH kā protisks šķīdinātājs un H-saites donors var traucēt saistīšanos starp analītu un hirālo selektoru, tam atspoguļojoties kā aiztures

³ **Upmanis, T.;** Kažoka, H. Influence of amino acid residue on chromatographic behaviour of μ -opioid receptor agonist tetrapeptide analogue on crown ether based chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* **2022**, *1673*, 463059 (III Pielikums)

kritumam, pētāmo savienojumu hromatogrāfiskajā uzvedībā tika novērots pretējais.

Visiem desmit tetrapeptīdiem **2 – 11**, līdzīgi kā tetrapeptīdam **1** uz **CR-I (+)** un **(-)** CSP novērota paraboliska aiztures atkarība attiecībā pret MP izmantotā organiskā modifikatora daudzumu: ar minimumiem 50-75% ACN (60-80% MeOH) diapazonā un paaugstinātu savienojuma aizturi zema (<25% ACN vai <40% MeOH) un augsta (>90% ACN vai >80% MeOH) organiskā modifikatora satura MP, norādot uz atšķirīgiem saistīšanās mehānismiem.

Lai uzskatāmāk parādītu ievadīto aminoskābju dabas ietekmi uz tetrapeptīdu aizturi uz **CR-I** CSP, izveidots grafiskais attēlojums (2.5. att.), kur uz X ass atliktas eksperimentāli noteikto savienojumu aiztures faktoru (*k*) logaritmu vērtības pie zema organiskā modifikatora satura MP, bet uz Y ass atliktas vērtības augsta organiskā šķīdinātāja satura MP. Grafikā attēlotie punkti, kas atrodas zem Y=X taisnes norāda, ka, no mehānistiska skatupunkta, šo savienojumu aizturē dominē hidrofobās mijiedarbības, savukārt, savienojumus, kuru aizturē noteicošās ir hidrofilās (polāras) mijiedarbības, grafikā apzīmē punkti, kuri atrodas virs Y=X taisnes.



2.5. att. Struktūrā ievadītās aminoskābes ietekmes uz tetrapeptīdu 1 – 11 aizturi, atkarībā no mobilās fāzes sastāva: $\log(k_{15\%ACN})$ vs. $\log(k_{95\%ACN})$ – 50 mM HClO₄ ACN/ūdens MP – (A); $\log(k_{40\%MeOH})$ vs. $\log(k_{90\%MeOH})$ – 50 mM HClO₄ MeOH/ūdens MP – (B); Datu punkti, kas apzīmēti ar (+) iegūti uz **CR-I (+)** CSP; ar (-) apzīmētie punkti iegūti uz **CR-I (-)** CSP; savienojumi **1 – 11** sagrupēti pēc krāsām, atkarībā no ievadīto aizvietotāju ķīmiskās dabas (nepolārs/polārs - skābs, neitrāls, bāzisks).

Balstoties uz 2.5. attēla datiem var secināt, ka galvenokārt, tetrapeptīdi, kuros ievadītas nepolāras aminoskābes (grafikā attēloti kā sarkani punkti) RP apstākļos tiek spēcīgāk aizturēti, kamēr analīti, kuri modificēti ar polārām aminoskābēm (grafikā attēloti kā zilas un zaļas krāsas punkti) spēcīgāk aizturas ar organisko modifikatoru bagātās mobilajās fāzēs, pie tam, šāds dalījums ir vēl izteiktāk redzams ar MeOH saturošām mobilajām fāzēm.

2.3.2. Krauna ēteru stacionāro fāžu pretējās hirālītātes izmantošana enantiosadales izvērtēšanai

Selektivitāte vai sadales faktors (α) apraksta hromatogrāfiskās sistēmas spēju atdalīt vielas maisījumā un to aprēķina kā divu secīgu pīķu aiztures faktoru (k) attiecību (2.1. vienādojums).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}, \quad (2.1.)$$

Kur α – selektivitāte;

k_2 – aiztures faktors spēcīgāk aizturētajam enantiomēram;

k_1 – aiztures faktors vājāk aizturētajam enantiomēram.

Tā kā parasti savienojums racēmiskā formā ir vieglāk pieejams par tā enantiomēriski tīro formu, tad, lai noskaidrotu vai CSP ir enantioselektīva attiecībā uz noteiktu hirālo savienojumu, parasti izmanto šo savienojumu racēmisko formu un CSP – enantiomēriski tīrā formā. Tomēr, īpaši aminoskābēm un to atvasinājumiem (tostarp peptīdiem), enantiomēriski tīrās formas bieži vien ir vieglāk pieejamas kā to racemāti. Tādēļ šajā darbā izmēģināta literatūrā iepriekš neaprašīta pretēja koncepcija, sadali pētot ar enantiomēriski tīru savienojumu uz CSP “racēmiskā formā” kā tas ir **CR-I (+)** un **(-)** fāzēs (1.2. att., **B**) un α vietā kā enantioselektivitāti raksturojošu parametru šajā gadījumā var izmantot α^* (2.2. vienādojums).

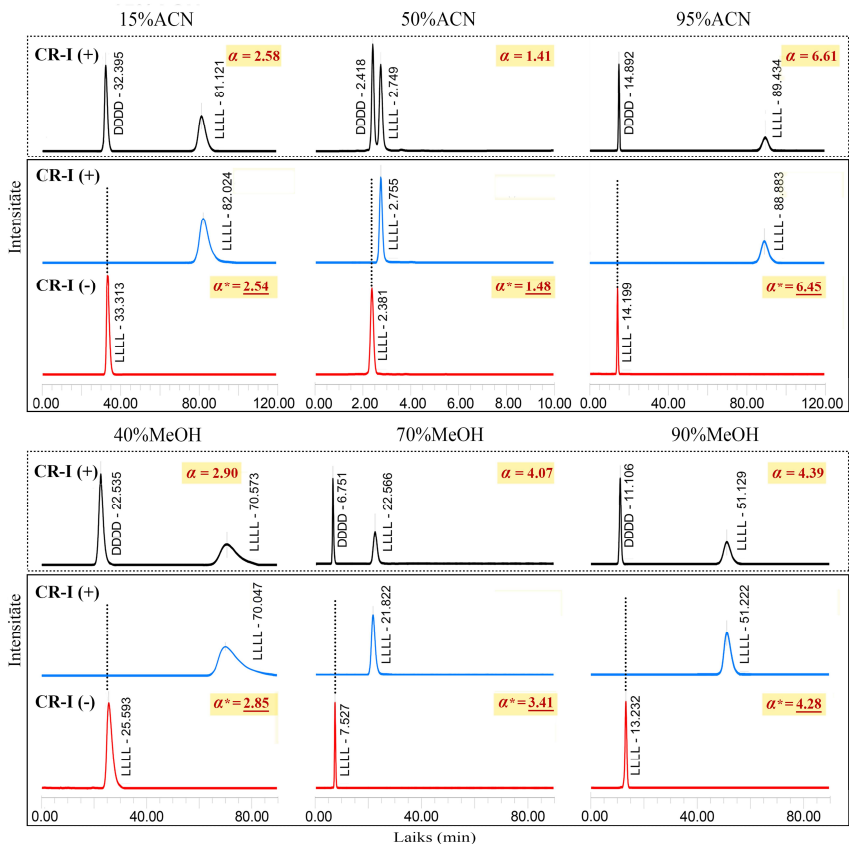
$$\alpha \sim \alpha^* = \frac{k_{(+)}}{k_{(-)}}, \quad (2.2.)$$

Kur α^* - enantioselektivitāti raksturojošs parametrs;

$k_{(+)}$ – aiztures faktors noteiktas konfigurācijas enantiomēram uz **CR-I (+)** CSP;

$k_{(-)}$ – aiztures faktors tam pašam enantiomēram uz pretējās hirālītātes **CR-I (-)** CSP.

Lai apstiprinātu šo koncepciju, tika veikta virkne eksperimentu ar tetrapeptīda **1** LLLL-enantiomēru. Kā redzams no 2.6. attēla, α vērtības, kas raksturo tetrapeptīda **1** LLLL/DDDD enantiomēru sadali uz **CR-I (+)** CSP (piem., 15% ACN - $\alpha = 2.58$; 95% ACN - $\alpha = 6.61$), būtiski neatšķiras no aprēķinātajām α^* vērtībām, (15% ACN - $\alpha^* = 2.54$; 95% ACN - $\alpha^* = 6.45$) kas iegūtas no LLLL-enantiomēra aiztures datiem uz **CR-I (+)** un **(-)** CSP.



2.6. att. Tetrapeptīda 1 LLLL un DDDD enantiomēru hromatogrāfisko uzvedību raksturojošās hromatogrammas uz CROWNPAK CR-I CSP: tetrapeptīda 1 LLLL/DDDD enantiomēru pāra sadale uz CR-I (+) (attēlota melnā krāsā); LLLL enantiomēra aizture uz CR-I (+) (zilā krāsā); LLLL enantiomēra aizture uz CR-I (-) (sarkanā krāsā). Mobilās fāzes: 50 mM HClO₄ ACN (MeOH)/ūdens.

Iegūtie rezultāti apstiprina, ka α^* parametru var droši izmantot, lai turpmāk raksturotu tetrapeptīdu 2 - 11 LLLL/DDDD enantiomēru pāru sadali, neatkarīgi no MP izmantotā organiskā modifikatora un sastāva.

2.3.3. Struktūrā ievadītās aminoskābes dabas ietekme uz tetrapeptīdu enantiosadali

Iepriekš aprakstītā koncepcija izmantota, lai noskaidrotu vai hirālie selektori **CR-I** CSP ir enantioselektīvi attiecībā arī uz modificētajiem tetrapeptīda **1** analogiem **2 – 11** (2.4. att.). Lai novērtētu mobilās fāzes organiskā modifikatora dabas un sastāva ietekmi uz pētāmo tetrapeptīdu LLLL/DDDD pāru enantiosadali, tika aprēķinātas α^* , jeb enantioselektivitāti raksturojošā parametra vērtības (2.2. vienādojums). Zinot, ka $\alpha > 1.2$ uzskatāma par pietiekamu divu enantiomēru hromatogrāfiskajai sadalei, šie paši kritēriji tika piemēroti attiecībā uz α^* vērtībām.

Ņemot vērā atšķirīgo enantiomēru aizturi, atkarībā no MP dabas (kā piemēram, 2.6. att.), eksperimenti veikti gan ar zema (15% ACN vai 40% MeOH), gan augsta (95% ACN vai 90% MeOH) organiskā modifikatora satura MP. Dati, kas raksturo tetrapeptīdu **1 – 11** enantioselektivitāti uz **CR-I** CSP apkopoti 2.1. tabulā.

2.1. Tabula

Eksperimentāli iegūto tetrapeptīdu 1 - 11 (LLLL-enantiomēru) aiztures faktoru k un aprēķinātās α^* vērtības uz CR-I (+) un (-) CSP

Savienojums (2.4. att.)	ACN (%) daudzums 50 mM HClO ₄				MeOH (%) daudzums 50 mM HClO ₄ MeOH/ūdens MP				
	CR-	15		95		40		90	
		<i>k</i>	α^*	<i>k</i>	α^*	<i>k</i>	α^*	<i>k</i>	α^*
1	(+)	50.27		53.74		42.78		31.01	
	(-)	19.82	2.54	8.33	6.45	15.00	2.85	7.27	4.27
2	(+)	5.95	1.94	20.88	4.68	5.80	1.26	17.95	3.16
	(-)	3.07		4.46		4.61		5.69	
3	(+)	7.31	2.53	57.55	7.62	7.87	1.79	29.99	4.64
	(-)	2.89		7.55		4.41		6.47	
4	(+)	11.91	2.19	57.16	5.91	15.93	2.46	29.08	3.98
	(-)	5.45		9.67		6.48		7.31	
5	(+)	28.71	2.75	52.14	6.10	28.38	2.84	24.08	3.96
	(-)	10.46		8.54		10.00		6.08	
6	(+)	93.09	2.70	64.33	7.34	65.30	2.05	56.25	6.97
	(-)	34.43		8.77		31.90		9.42	
7	(+)	15.95	2.62	52.27	6.82	20.38	3.19	41.63	4.53
	(-)	6.08		7.67		6.39		9.21	
8	(+)	28.74	6.22	111.61	11.30	28.14	4.43	85.39	22.63
	(-)	4.62		9.88		6.35		7.35	
9	(+)	20.00	3.46	79.70	7.81	18.77	3.15	46.72	5.78
	(-)	5.78		10.21		5.96		8.08	
10	(+)	40.01	4.00	64.55	10.26	35.60	4.36	27.51	5.75
	(-)	10.01		6.29		8.17		4.78	
11	(+)	159.21	2.78	65.30	7.43	100.00	2.18	57.60	5.25
	(-)	57.28		8.79		45.88		10.97	

Balstoties uz 2.1. tabulas datiem, redzams, ka, neatkarīgi no izmantotās mobilās fāzes, visiem apskatītajiem tetrapeptīdiem aprēķinātās enantiosadali

raksturojošā faktora α^* vērtības pārsniedz 1.2. Sevišķi augsta enantioselektivitāte novērota, strādājot ar augsta organiskā modifikatora satura MP.

Lai raksturotu dažādu ievadīto aminoskābju dabas (kā arī pozīcijas tetrapeptīda struktūrā) ietekmi uz enantiosadali, tika ieviests parametrs $\frac{\alpha^*(1)}{\alpha^*(2-11)}$, kurš salīdzina tetrapeptīda **1** enantiosadali raksturojošo parametru ($\alpha^*(1)$) ar α^* vērtību, kas vienādos hromatogrāfiskajos apstākļos iegūta katram struktūras analogam **2 – 11** un rezultāti apkopoti 2.2. tabulā. Aprēķinātās parametra vērtības, kas zemākas par 1 norāda uz enantioselektivitātes palielināšanos, kamēr vērtības, kas augstākas par 1 – uz samazinājumu, kas izraisīts tetrapeptīdu **2 – 11** struktūrā ievadīto aminoskābju dabas dēļ.

2.2. Tabula

Aprēķinātās parametra $\frac{\alpha^*(1)}{\alpha^*(2-11)}$ vērtības

Ievadītā aminoskābe (2.4. att.)	Ievadītās aminoskābes pozīcija (tetrapeptīda 1 struktūrā)	ACN (%) daudzums 50 mM		MeOH (%) daudzums 50 mM	
		HClO ₄ ACN/ūdens	MP	HClO ₄ MeOH/ūdens	MP
		15%	95%	40%	90%
<u>His (2)</u>	Phe	1.31	1.38	2.26	1.35
<u>Glu (3)</u>		1.00	0.85	1.59	0.92
<u>Cys (4)</u>		1.16	1.09	1.16	1.07
<u>Leu (5)</u>		0.92	1.06	1.00	1.08
<u>Trp (6)</u>		0.94	0.88	1.39	0.72
<u>His (7)</u>	N-gala	0.97	0.95	0.89	0.94
<u>Glu (8)</u>		0.41	0.57	0.64	0.37
<u>Cys (9)</u>		0.73	0.83	0.90	0.74
<u>Leu (10)</u>		0.64	0.63	0.65	0.74
<u>Trp (11)</u>		0.91	0.87	1.31	0.81

Balstoties uz 2.2. tabulas datiem, redzams, ka ietekme uz enantiosadali, ko izraisa atšķirīgu aminoskābju ievadīšana tetrapeptīda **1** Phe pozīcijā, ir mazāk nozīmīga kā modifikācija pie tetrapeptīda N-gala. Saskaņā ar pieņēmumu, ka tetrapeptīda N-gala aminoskābes aminogrupa varētu būt atbildīga par saistīšanos ar krauna ētera selektoru (2.1. nodaļa), stēriskie efekti, ko izraisa α -oglekļa sānu ķēdes izmērs varētu būt svarīgs faktors analizējamās vielas hirālajā atpazīšanā. Stēriski pieclocēkļu imidazola gredzens His (**7**) telpā aizņem līdzīgu daudzumu vietas kā sešlocēkļu cikls Tyr fenilgredzenā (**1**), tādēļ abu šo savienojumu enantiosadale sevišķi neatšķiras, savukārt, mazāki, fleksiblāki aizvietotāji tetrapeptīdos **8, 9 un 10**, šķietami uzlabo savienojumu enantiosdali.

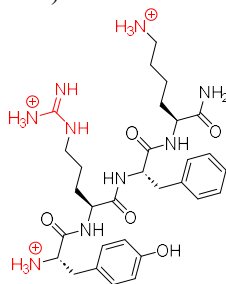
Iegūtie dati ļauj secināt, ka tetrapeptīdu **1 – 11** enantiosadali uz **CR-I (+)** un **(-)** CSP nosaka galvenokārt stēriski faktori, ko būtiski ietekmē aizvietotāja sānu ķēdes garums pie tetrapeptīda N-gala α -oglekļa, nevis pašas ievadītās aminoskābes polaritāte vai daba (lādēta/ nelādēta).

2.4. Tetrapeptīda **1** hirālās atpazīšanas pētījumi uz CR-I CSP^{4,5}

Tetrapeptīda **1** LLLL un DDDD enantiomēri tika izvēlēti kā modeļvielas turpmākajos hirālās atpazīšanas mehānisma pētījumos. Lai labāk saprastu starpmolekulāros procesus, kas ir pamatā tetrapeptīda **1** enantiomēru sadalei uz CR-I hirālajām stacionārajām fāzēm, ar HPLC, HRMS un NMR metodēm tika pētīta krauna ētera selektoru saistīšanās ar LLLL-**1** un DDDD-**1**. Līdzīgu apstākļu nodrošināšanai gan NMR ampulā, gan hromatogrāfiskajā sistēmā, visi eksperimenti veikti 50 mM HClO₄ metanolā šķīdumos.

2.4.1. Struktūras – hromatogrāfiskās uzvedības sakarības pētījumi saistīšanās vietas identifikācijai

Teorētiski tetrapeptīda **1** saistīšanās ar krauna ētera selektoru var piedalīties trīs funkcionālās grupas - α -aminogrupa Tyr; ϵ -aminogrupa Lys, kā arī guanidīna fragments Arg (2.7. att.).



2.7. att. Mijedarbības stāties spējīgās tetrapeptīda **1** funkcionālās grupas.

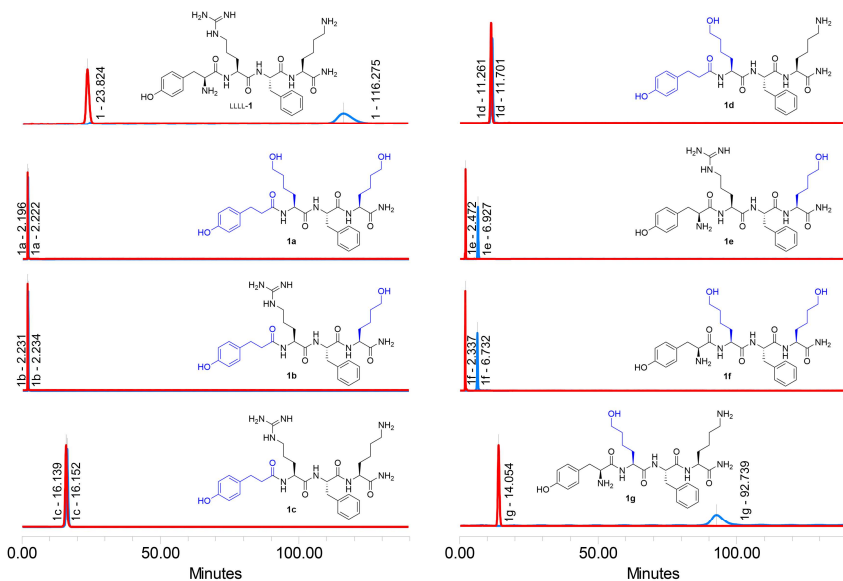
Potenciālie H-saišu donori apzīmēti sarkanā krāsā.

Savienojumi **1a** – **1g** sintezēti (2.8. att.) ar mērķi sistemātiski izslēgt konkrētas mijiedarbības spējīgās aminogrupas tetrapeptīda **1** sekvencē, aizvietojojot tās ar OH grupām, vai izslēdzot tās pavisam, tajā pat laikā, saglabājot jaunizveidoto molekulu stereokīmiski pēc iespējas līdzīgāku tetrapeptīda **1** struktūrai. Lai izslēgtu N-gala aminogrupu Tyr, tetrapeptīda **1** struktūrā Tyr pozīcijā ievadīta 3-(4-hidroksifenil)-propānskābe (savienojumos **1a** – **1d**). Lai izvairītos no iespējamās saistīšanās Lys (savienojumos **1a**; **1b**; **1e** un **1f**) un Arg (savienojumos **1a**; **1d**; **1f** un **1g**) atlikumos, šīs aminoskābes tika aizvietotas ar 6-hidroksinorleicīnu. Pieņemot, ka enantioselektīva saistīšanās ar krauna ētera selektoru vienādos hromatogrāfiskos apstākļos ir iespējama tikai gadījumos, kad

⁴ Upmanis, T.; Kažoka, H. Mechanistic insights in chiral recognition of μ -opioid receptor agonist tetrapeptide on crown ether chiral stationary phase. *J. Chromatogr. Open* **2021**, *1*, 100016. (IV Pielikums)

⁵ Upmanis, T.; Sevostjanovs, E.; Kažoka, H. Chiral recognition mechanism studies of Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ tetrapeptide on crown ether based chiral stationary phase. *Chirality* **2024**, *36*(1), e23619 (V Pielikums)

analīta viena un tā paša enantiomēra aizture uz **CR-I (+)** un **(-)** CSP atšķirsies (2.3.2. nodaļa), darbā salīdzināta tetrapeptīda **1** un tā struktūras analogu **1a – 1g** hromatogrāfiskā uzvedība.



2.8. att. LLLL-1 un struktūras analogu **1a – 1g** aizture uz **CR-I (+)** (attēlots zilā krāsā) un **CR-I (-)** CSP (sarkanā krāsā). Mobilā fāze: 50mM HClO₄ MeOH.

Balstoties uz 2.8. attēla datiem, redzams, ka izslēdzot visas trīs saistīties spējīgās aminogrupas tetrapeptīda **1** struktūrā, savienojumu **1a** nav iespējams aizturēt ($t_R \sim t_0$) uz **CR-I** CSP. Līdzīga hromatogrāfiskā uzvedība novērota arī savienojumam **1b**, no kā secināms, ka guanidīna fragments Arg nesaistās ar krauna ētera selektoriem. Atšķirībā no **1a** un **1b**, savienojumi **1c** un **1d** aizturas, pateicoties pirmējai ϵ -aminogrupai Lys atlikumā, kas spēj piedalīties $^+N-H \cdots O$ ūdeņraža saišu veidošanā ar krauna ētera selektoru. Tomēr, savienojumu līdzīgā aizture (piem., **1c**: $k_{(-)} \sim k_{(+)} = 8.9$), kas novērota uz **CR-I (+)** un **CR-I (-)** CSP, norāda uz to, ka šī saistīšanās nav enantioselektīva. Visticamāk, 4 C atomu attālums starp ϵ -aminogrupu lizīnā un hirālo centru ir pārāk liels, lai krauna ētera selektora stēriski apjomīgās bifēnil- un fēnilgrupas (1.5. att.), spētu izveidot stereoselektīvu vidi.

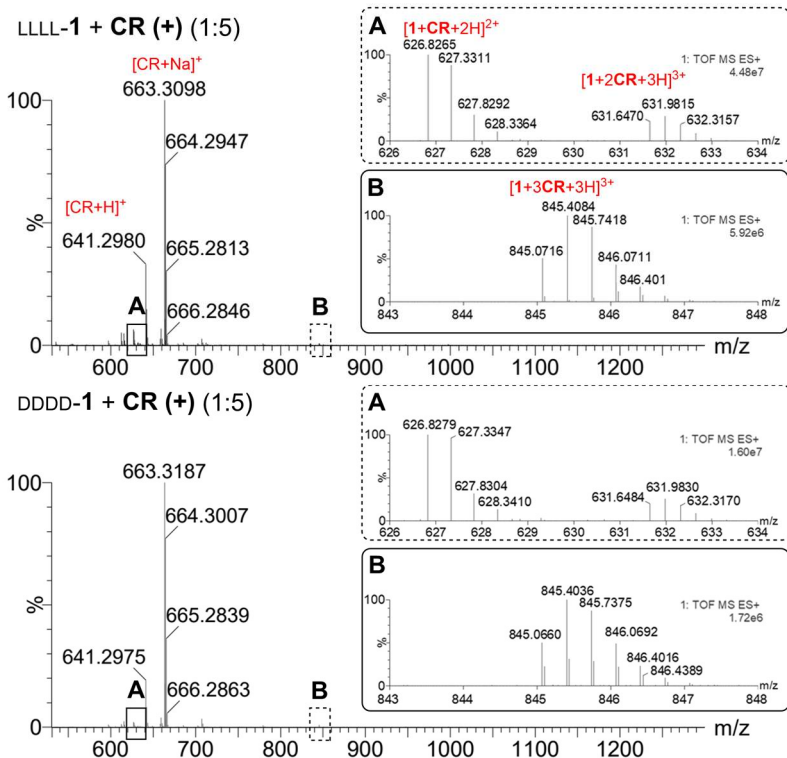
Iespējama enantioselektīva saistīšanās, norādot uz dažādu mijiedarbošanos starp analītu un krauna selektoriem, novērota struktūras analogiem **1e – 1g**, kuru aizture, līdzīgi kā LLLL-1, atšķiras uz **CR-I (+)** un **(-)** CSP. Salīdzinot **1e – 1g** struktūras (2.8. att.), redzams, ka šie savienojumi satur N-gala α -aminogrupu Tyr atlikumā, tādejādi norādot uz šīs aminogrupas nozīmīgumu hirālajā atpazīšanā.

Interesanti, ka struktūras analogu **1e** ($k_{(-)} = 0.53$; $k_{(+)} = 3.28$) un **1f** ($k_{(-)} = 0.44$; $k_{(+)} = 3.15$) aizture būtiski atšķiras no **1g** ($k_{(-)} = 7.67$; $k_{(+)} = 56.2$) un LLLL-**1** ($k_{(-)} = 13.71$; $k_{(+)} = 70.8$). Var pieņemt, ka tieši brīvās ε -aminogrupas klātbūtne savienojuma struktūrā, ievērojami palielina **1g** un LLLL-**1** aizturi. Šis novērojums var liecināt par to, ka tetrapeptīda **1** hirālajā atpazīšanās varētu piedalīties gan N-gala α -amino grupa Tyr, gan ε -amino grupa Lys. Lai šo pieņēmumu apstiprinātu, veikti tālākie HRMS un NMR eksperimenti.

2.4.2. Augstas izšķiršanas MS pielietojums tetrapeptīda **1** – krauna selektora kompleksu pierādīšanā

Lai pierādītu tetrapeptīda **1** spēju saistīties kompleksos ar **CR** selektoriem ārpus hromatogrāfiskās kolonnas, veikti augstas izšķiršanas masspektrometrijas (HRMS) pētījumi, izmantojot elektroizsmidzināšanas jonizāciju (ESI), kas iestatīta pozitīvā jonizācijas režīmā. Eksperimentālās daļas apraksts atrodams V Pielikuma 2.6. nodaļā.

Tika sintezēti optiski tīri (*S*)- and (*R*)-(3,3'-difenil-1,1'-binaftil)-20-krauna-6 enantiomēri (attiecīgi **CR** (+) un (-) selektori; 1.2. att.), kas tika sajaukti piecāršā pārkumā pret attiecīgo tetrapeptīda **1** LLLL vai DDDD-enantiomēru (5:1; 50 mM HClO₄ metanolā) un pagatavotie šķīdumi tieši ievadīti nolidojuma laika (TOF) masspektrometrā. Nesaistītais krauna ētera selektora atlikums masspektrā redzams (2.9. att.) kā intensīvs signāls ar masas lādiņa attiecību m/z 641 un 663 (atbilst Na⁺ aduktam). Tuvāka iegūtā masspektra apskate parāda vairākus zemākas intensitātes signālus, no kuriem svarīgākie atrodami pie m/z 626 un 631, un atbilst 1:1 un 1:2 stehiometrijas kompleksiem starp tetrapeptīda **1** enantiomēriem un krauna selektoru (2.9. att., **A**). Piedevām, novērots arī 1:3 kompleksēšanās stehiometriju raksturojošais signāls pie m/z 845 (2.9. att., **B**), norādot uz krauna ētera selektora spēju gāzes fāzē saistīties ar visām trīs pieejamajām tetrapeptīda **1** struktūras aminogrupām (2.7. att.). Līdzīgas intensitātes visu trīs iepriekšminēto kompleksu veidošanās vērojama arī DDDD-**1** enantiomēram, saistoties ar **CR** (+) selektoru. Tas varētu liecināt par citādāku (ne stereospecifisku) saistīšanās mehānismu gāzes fāzē, ierobežojot šīs metodes priekšrocības hirālās atpazīšanas mehānismu pētījumos. Neskatoties uz to, lietojot ESI-HRMS demonstrēta nekovalentu kompleksu veidošanās starp tetrapeptīda **1** enantiomēriem un krauna selektoriem un iegūts vērtīgs ieskats kompleksēšanās stehiometrijā.

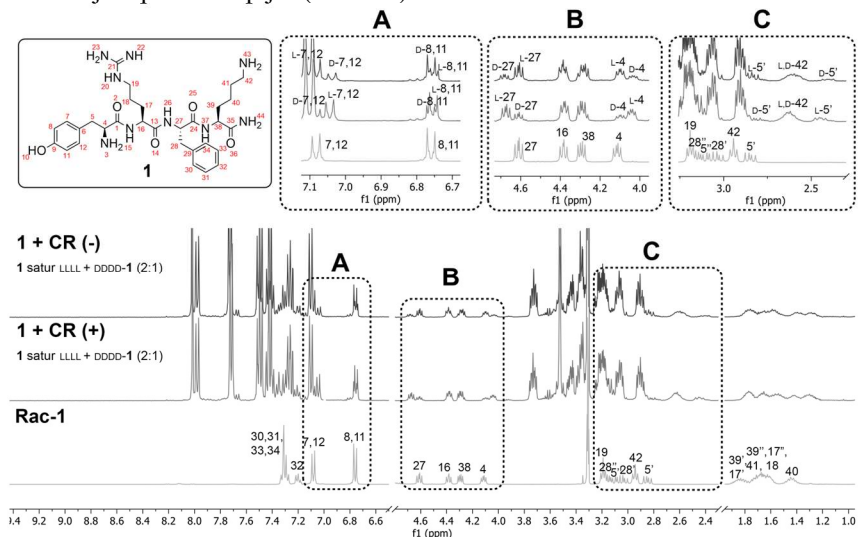


2.9. att. **Daljšs tetrapeptīda 1 kompleksēšanās ESI-TOF masspektrs:** LLLL-1 saistoties ar CR (+) hirālo selektoru (pieckāršā pārākumā; *attēlots augšā*); DDDD-1 saistoties ar CR (+) hirālo selektoru (pieckāršā pārākumā; *attēlots apakšā*). Signāli, kas atbilst 1:1 un 1:2 attiecības kompleksiem attēloti izgriezumos (A); Masas signāli kas atbilst 1:3 attiecības kompleksiem attēloti izgriezumos (B).

2.4.3. Kodolu magnētiskās rezonanses spektroskopijas pielietojums tetrapeptīda 1 – krauna selektora kompleksu pierādīšanā

Lai labāk saprastu krauna ēteru selektoru saistīšanos ar tetrapeptīda 1 LLLL un DDDD-enantiomēriem, veikti virkne pētījumu ar 1D un 2D NMR metodēm (eksperimentos izmantotie instrumenti un paraugu pagatavošana aprakstīta V Pielikumā 2.7. nodaļā). Lai nodrošinātu līdzīgu vidi kāda tā ir hromatogrāfiskajā kolonnā (2.4.1. nodaļa) ampulā tika sajaukts tetrapeptīda 1 pseidoracemāts tā brīvās bāzes formā (identifikācijas nolūkos LLLL:DDDD = 2:1) ar katru no krauna ētera selektoriem CR (+) un (-) divkāršā pārākumā MeOH-*d*₄, kas satur HClO₄ 50 mM daudzumā (2.10. att.). Eksperimentāli tika noskaidrots, ka krauna selektora pievienošana lielākā pārākuma, neatspoguļojās būtiskās novēroto ķīmisko nobīžu izmaiņās.

Tetrapeptīda **1** $^1\text{H-NMR}$ signāli (apzīmēti saskaņā ar 2.10. attēlā redzamo numerācijas shēmu) tika identificēti, kombinējot $^1\text{H-}^1\text{H}$ korelāciju spektroskopijas (COSY), $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ heteronukleārās viena kvanta korelācijas (HSQC) un heteronukleārās daudzkrāso saišu korelācijas (HMBC) metodes. Diastereomēru kompleksu veidošanās apstiprina tetrapeptīda **1** pseidoracemāta protonu signālu šķelšanās krauna ētera selektoru klātbūtnē, kas parādīta $^1\text{H-NMR}$ spektrā 2.10. att. Spektrā pārklājušies signāli tika identificēti, izmantojot totālās korelācijas spektroskopijas (TOCSY) metodi.



2.10. att. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) spektri: nesaisītam 5 mM tetrapeptīda **1** pseidoracemātam (Rac-**1**; LLLL:DDDD = 2:1; *attēlots apakšā*); 5 mM tetrapeptīda **1** pseidoracemātam 10 mM CR (+) (*pa vidu*) un 10mM CR (-) selektoru (*augšā*) klātbūtnē. Visi spektri uzņemti metānolā- d_4 , kas satur 50 mM HClO_4 . Signālu šķelšanās Tyr aromātiskajos protonos izcelta izgriezumā (A); Signālu šķelšanās Phe un Tyr atlikumu α -protonos izcelta izgriezumā (B); Signālu ķīmiskās nobīdes Tyr atlikuma β -protonos izcelta izgriezumā (C).

Novērots, ka saistoties ar CR (+) selektoru, LLLL-**1** protoni NMR spektrā nobīdās izteiktāk, attiecībā pret nesaisītu tetrapeptīdu **1**, salīdzinot ar tā DDDD-enantiomēru. Savukārt, pretēja uzvedība novērota pseidoracemātam, saistoties ar CR (-) selektoru, kur, attiecīgi spēcīgāk nobīdās DDDD-**1** signāli. Piedevām no abiem uzņemtajiem spektriem redzams (2.10. att.), ka tie savā starpā ir spoguļattēli, apstiprinot, ka LLLL-**1** saistoties ar CR (+), un DDDD-**1** ar CR (-) selektoru (attiecīgi arī LLLL-**1** saistoties ar CR (-) un DDDD-**1** ar CR (+) selektoru) pakļaujas identiskiem kompleksēšanās mehānismiem. Tādēļ tālākajā hirālās atpazīšanas mehānisma diskusijā apskatīta tikai CR (+) selektora kompleksēšanās ar tetrapeptīda **1** LLLL un DDDD-enantiomēriem.

Izteikta nobīdīšanās stiprākos laukos NMR spektros tika novērota tetrapeptīda **1** Lys atlikuma H42 protona signālam. Šāda veida uzvedība norāda

uz starpmolekulāru mijiedarbību, visticamāk H-saišu veidošanos starp tetrapeptīdu **1** un krauna ētera selektoru. Šo pieņēmumu apstiprina iepriekš veikti pētījumi [79], kur, saistoties aminoskābēm kompleksā ar **CR (+)** selektoru caur H-saitēm, novērots līdzīgs ekranēšanas efekts. Tomēr, ņemot vērā gandrīz identiskās ķīmisko nobīžu izmaiņu vērtības starp kompleksiem, ko ar **CR (+)** selektoru veido LLLL-**1** un DDDD-**1**, var pieņemt, ka abi enantiomēri ir pakļauti līdzīgam (ne-enantioselektīvam) kompleksēšanās mehānismam, Lys ε -NH₃⁺ grupai saistoties ar skābekļa atomiem krauna ētera ciklā.

Būtiskas atšķirības (2.10. att., C) protonu ķīmiskajās nobīdēs tika novērotas LLLL-**1** Tyr atlikuma β -protonos H5'' un H5', kuri, līdzīgi kā Lys atlikuma protoni, nobīdījās stiprākā laukā, kā arī Tyr α -protonam H4 (2.10. att., B) un aromātiskajiem protoniem H7 un H12 (2.10. att., A). Tajā pat laikā šie Tyr atlikuma protonu signāli praktiski nenobīdās, ar **CR (+)** selektoru saistoties DDDD-**1**. Balstoties uz šiem novērojumiem, var secināt, ka papildus ne-enantioselektīvai ūdeņraža saites veidošanai starp tetrapeptīda **1** Lys NH₃⁺ grupu un **CR (+)** selektoru, notiek arī sekundāra saistīšanās ar starp LLLL-**1** tirozīna atlikuma α -NH₃⁺ grupu un vēl vienu **CR (+)** selektora molekulu (attiecīgi DDDD-**1** ar vēl vienu **CR (-)** molekulu), kas varētu atbildēt par tetrapeptīda **1** hirālo atpazīšanu. Šāds pieņēmums būtu saskaņā gan ar tetrapeptīda **1** hirālās sadales (2.1. nodaļas) rezultātiem, gan struktūras analogu **1a – 1g** hromatogrāfiskās uzvedības analīzi 2.4.1. nodaļā.

Atšķirībā no iepriekš apskatītajām ūdeņraža saistīšanās izraisītajām protonu ķīmiskajām nobīdēm stiprākos laukos, **CR (+)** klātbūtnē tetrapeptīda **1** LLLL-enantiomēra Phe α -protonam H27 (2.10. att., B), β -protoniem H28'', H28' un aromātiskajiem protoniem H30, H31, H33, H34 novērota vāja dezekranizācija (signālu nobīdīšanās vājākos laukos). Balstoties uz ķīmisko nobīžu izmaiņu atšķirīgo raksturu, var pieņemt, ka šajā gadījumā tiek novērotas cita veida starpmolekulārās mijiedarbības, iespējams, starp Phe atlikuma π -sistēmu un **CR (+)** selektora aromātiskajiem aizvietotājiem.

Kopumā, tetrapeptīda **1** un tā struktūras analogu **1a – 1g** hromatogrāfiskās uzvedības analīze uz **CR-I (+)** un **(-)** CSP norāda uz to, ka LLLL/DDDD-**1** enantiosadale varētu būt iespējama, pateicoties ievērojamām atšķirībām enantiomēru saistīšanās mehānismos. No hromatogrāfijas skata punkta, spēcīgāk aizturētajam tetrapeptīda **1** enantiomēram [LLLL-**1** - **CR-I (+)**] un [DDDD-**1** - **CR-I (-)**], NH₃⁺ grupas Tyr un Lys atlikumos vienlaicīgi var saistīties ar divām krauna ētera selektora molekulām uz CSP virsmas, kamēr vājāk aizturētajam tetrapeptīda **1** enantiomēram [DDDD-**1** - **CR-I (+)**] un [LLLL-**1** - **CR-I (-)**], par saistīšanos ar krauna ētera selektoru (un līdz ar to arī aizturi) atbildīga ir tikai NH₃⁺ grupa Lys atlikumā.

SECINĀJUMI

1. Izpētīts komerciāli pieejamu krauna ēteru stacionāru fāžu pielietojums īso peptīdu enantiosadalē par modeļvielu izmantojot Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ (sintezēti visi 16 stereoisomēri). Labāka enantioselektivitāte ir novērota uz CROWNPAK CR-I (+) fāzes: visi astoņi tetrapeptīda enantiomēru pāri tika sadalīti ar ACN bagātu mobilo fāzi.
2. Desmit jaunsintezētiem Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ struktūras analogiem (pie N-gala vai Phe pozīcijā ievadītas dažādas aminoskābes) izpētīta hromatogrāfiskā uzvedība uz CR-I fāzēm. Noskaidrots, ka modificēšanai Phe pozīcijā ir mazāka ietekme uz enantioselektivitāti kā pie N-gala un enantiosadale lielā mērā ir atkarīga no stēriskiem efektiem, ko izraisa α -oglekļa sāņķēžu lielums pie N-gala, nevis ievadītās aminoskābes daba.
3. Sintezēti 7 savienojumi ar mērķi sistemātiski izslēgt ar hirālo sorbentu mijiedarboties spējīgās tetrapeptīda aminogrupas, tās aizvietojojot ar OH grupām (vai izslēdzot tās pavisam) un pētīta to hromatogrāfiskā uzvedība uz CR-I (+) un (-) fāzēm, kas satur pretējas hirālītātes selektoros. Secināts, ka:
 - a. Guanidīna fragments Arg nesaistās ar krauna ētera selektoriem;
 - b. Pirmējā ϵ -aminogrupai Lys atlikumā spēj piedalīties $^+N-H\cdots O$ ūdeņraža saišu veidošanā ar krauna ētera selektoru, bet šī saistīšanās nav enantioselektīva;
 - c. Iespējams, ka tieši α -aminogrupa Tyr fragmentā ir nozīmīga hirālajā atpazīšanā.
4. Ar HRMS metodi noskaidrots, ka Tyr-Arg-Phe-Lys-NH₂ LLLL un DDDD-enantiomēri ar krauna ētera selektoriem vienlaicīgi spēj saistīties gan 1:1, 1:2, gan 1:3 stehiometrijas kompleksos.
5. Ar NMR metodēm pētot LLLL un DDDD-enantiomēru kompleksēšanos ar krauna ēteru selektoriem secināts, ka vienā no tetrapeptīda enantiomēram, NH₃⁺ grupas Tyr un Lys atlikumos vienlaicīgi var saistīties ar divām krauna ētera selektora molekulām uz sorbenta virsmas, kamēr otram enantiomēram par saistīšanos ar krauna ētera selektoru atbildīga ir tikai NH₃⁺ grupa Lys atlikumā kas nav pretrunā ar HPLC datiem.

PATEICĪBAS

Vislielāko pateicību vēlētos izteikt savai darba vadītājai *Dr. chem. Helēnai Kažokai*, kas pēdējos gandrīz 10 gados mani ir ievedusi hromatogrāfijas zinātnē, motivējusi nepadoties un nekad nav atteikusi vērtīgus padomus. Paldies Latvijas Organiskās sintēzes institūtam, īpaši direktoram *Dr. chem. Osvaldam Pugovičam* par visa nepieciešamā nodrošināšanu kvalitatīva eksperimentālā darba veikšanai, kā arī par finansiālo atbalstu četru gadu garumā promocijas darba tapšanā (studentu iekšējie granti: IG-2019-04, IG-2020-04, IG-2021-05 un IG-2022-08).

Atsevišķi vēlētos pateikties *Dr. chem. Pāvelam Arsenjanam* par vērtīgiem padomiem peptīdu sintēzē, iemācot dažādas organiskās sintēzes un vielu attīrīšanas tehnikas, Hromatogrāfijas laboratorijas kolēģiem par atbalstu visnotaļ grūtajā promocijas darba izstrādes laikā, Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorijas un Struktūrbioloģijas un zāļvielu dizaina laboratorijas kolēģiem par palīdzību masspektrometrijas un kodolmagnētiskās rezonanses spektroskopijas jautājumos.

Visbeidzot vēlētos pateikties savai ģimenei un sievai Lienei par emocionālo atbalstu šajos gados.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Muttenthaler, M.; King, G. F.; Adams, D. J.; Alewood, P. F. Trends in Peptide Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2021**, *20*, 309–325.
2. Henninot, A.; Collins, J. C.; Nuss, J. M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1382–1414.
3. Wang, L.; Wang, N.; Zhang, W.; Cheng, X.; Yan, Z.; Shao, G.; Wang, X.; Wang, R.; Fu, C. Therapeutic Peptides: Current Applications and Future Directions. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 48.
4. Bojarska, J. Advances in Research of Short Peptides. *Molecules* **2022**, *27*, 2446.
5. Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 2700–2707.
6. Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug. Discov. Today* **2015**, *20*, 122–128.
7. Sharma, K.; Sharma, K. K.; Sharma, A.; Jain, R. Peptide-Based Drug Discovery: Current Status and Recent Advances. *Drug. Discov. Today* **2023**, *28*, 103464.
8. Evidente, A.; Cimmino, A.; Andolfi, A. The Effect of Stereochemistry on the Biological Activity of Natural Phytotoxins, Fungicides, Insecticides and Herbicides. *Chirality* **2013**, *25*, 59–78.
9. Grieco, P.; Carotenuto, A.; Auriemma, L.; Saviello, M. R.; Campiglia, P.; Gomez-Monterrey, I. M.; Marcellini, L.; Luca, V.; Barra, D.; Novellino, E.; Mangoni, M. L. The Effect of D-Amino Acid Substitution on the Selectivity of Temporin L towards Target Cells: Identification of a Potent Anti-Candida Peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2013**, *1828*, 652–660.
10. de la Fuente-Núñez, C.; Reffuveille, F.; Mansour, S. C.; Reckseidler-Zenteno, S. L.; Hernández, D.; Brackman, G.; Coenye, T.; Hancock, R. E. W. D-Enantiomeric Peptides That Eradicate Wild-Type and Multidrug-Resistant Biofilms and Protect against Lethal *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 196–205.
11. Lubell, W. D.; Beauregard, K. S.; Polyak, F. 1.6 Peptides and Chirality Effects on the Conformation and the Synthesis of Medicinally Relevant Peptides. In: *Comprehensive Chirality*; Elsevier: Amsterdam, 2012,; Vol. 1, pp. 86–104.
12. Kemp, D. S. Racemization in Peptide Synthesis. In: *Major Methods of Peptide Bond Formation*; Elsevier, Amsterdam, 1979,; pp. 315–383.
13. Bada, J. L. [9] In Vivo Racemization in Mammalian Proteins. In: *Methods in Enzymology*; Elsevier, Amsterdam, 1984,; Vol. 106, pp. 98–115.
14. Miyamoto, T.; Homma, H. Detection and Quantification of d-Amino Acid Residues in Peptides and Proteins Using Acid Hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2018**, *1866*, 775–782.

15. Danielsen, M.; Nebel, C.; Dalsgaard, T. K. Simultaneous Determination of L- and D-Amino Acids in Proteins: A Sensitive Method Using Hydrolysis in Deuterated Acid and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Foods* **2020**, *9*, 309.
16. Morvan, M.; Mikšik, I. Recent Advances in Chiral Analysis of Proteins and Peptides. *Separations* **2021**, *8*, 112.
17. Goodlett, D. R.; Abuaf, P. A.; Savage, P. A.; Kowalski, K. A.; Mukherjee, T. K.; Tolan, J. W.; Corkum, N.; Goldstein, G.; Crowther, J. B. Peptide Chiral Purity Determination: Hydrolysis in Deuterated Acid, Derivatization with Marfey's Reagent and Analysis Using High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1995**, *707*, 233–244.
18. Strege, M. A.; Oman, T. J.; Risley, D. S.; Muehlbauer, L. K.; Jalan, A.; Jerry Lian, Z. Enantiomeric Purity Analysis of Synthetic Peptide Therapeutics by Direct Chiral High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2023**, *1219*, 123638.
19. Gübitz, G.; Vollmann, B.; Cannazza, G.; Schmid, M. G. Chiral Resolution of Dipeptides by Ligand Exchange Chromatography on Chemically Bonded Chiral Phases. *J Liq Chromatogr. Relat. Technol.* **1996**, *19*, 2933–2942.
20. Winkler, M.; Klempier, N. Enantioseparation of Nonproteinogenic Amino Acids. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 1789–1796.
21. Kamalzadeh, Z.; Babanezhad, E.; Ghaffari, S.; Mohseni Ezhiyeh, A.; Mohammadnejad, M.; Naghibfar, M.; Bararjanian, M.; Attar, H. Determination of Bortezomib in API Samples Using HPLC: Assessment of Enantiomeric and Diastereomeric Impurities. *J. Chromatogr. Sci.* **2017**, *55*, 697–705.
22. Schmid, M. G.; Hölbling, M.; Schnedlitz, N.; Gübitz, G. Enantioseparation of Dipeptides and Tripeptides by Micro-HPLC Comparing Teicoplanin and Teicoplanin Aglycone as Chiral Selectors. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *61*, 1–10.
23. Ilisz, I.; Berkecz, R.; Péter, A. HPLC Separation of Amino Acid Enantiomers and Small Peptides on Macrocyclic Antibiotic-Based Chiral Stationary Phases: A Review. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1305–1321.
24. Berthod, A.; Liu, Y.; Bagwill, C.; Armstrong, D. W. Facile Liquid Chromatographic Enantioresolution of Native Amino Acids and Peptides Using a Teicoplanin Chiral Stationary Phase. *J. Chromatogr. A* **1996**, *731*, 123–137.
25. Kučerová, G.; Procházková, H.; Kalíková, K.; Tesařová, E. Sulfobutylether- β -Cyclodextrin as a Chiral Selector for Separation of Amino Acids and Dipeptides in Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1467*, 356–362.
26. Chang, C. A.; Ji, H.; Lin, G. Effects of Mobile Phase Composition on the Reversed-Phase Separation of Dipeptides and Tripeptides with

- Cyclodextrin-Bonded-Phase Columns. *J. Chromatogr. A* **1990**, *522*, 143–152.
27. Bajtai, A.; Ilisz, I.; Howan, D. H. O.; Tóth, G. K.; Scriba, G. K. E.; Lindner, W.; Péter, A. Enantioselective Resolution of Biologically Active Dipeptide Analogs by High-Performance Liquid Chromatography Applying Cinchona Alkaloid-Based Ion-Exchanger Chiral Stationary Phases. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1611*, 460574.
 28. Zhang, T.; Holder, E.; Franco, P.; Lindner, W. Zwitterionic Chiral Stationary Phases Based on Cinchona and Chiral Sulfonic Acids for the Direct Stereoselective Separation of Amino Acids and Other Amphoteric Compounds. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 1237–1247.
 29. Ianni, F.; Sardella, R.; Carotti, A.; Natalini, B.; Lindner, W.; Lämmerhofer, M. Quinine-Based Zwitterionic Chiral Stationary Phase as a Complementary Tool for Peptide Analysis: Mobile Phase Effects on Enantio- and Stereoselectivity of Underivatized Oligopeptides. *Chirality* **2016**, *28*, 5–16.
 30. Hyun, M. H. Liquid Chromatographic Enantioseparations on Crown Ether-Based Chiral Stationary Phases. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1467*, 19–32.
 31. Kyba, E. B.; Koga, Kenji.; Sousa, L. R.; Siegel, M. G.; Cram, D. J. Chiral Recognition in Molecular Complexing. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2692–2693.
 32. Lingenfelter, D. S.; Helgeson, R. C.; Cram, D. J. Host-Guest Complexation. 23. High Chiral Recognition of Amino Acid and Ester Guests by Hosts Containing One Chiral Element. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 393–406.
 33. Shinbo, T.; Yamaguchi, T.; Nishimura, K.; Sugiura, M. Chromatographic Separation of Racemic Amino Acids by Use of Chiral Crown Ether-Coated Reversed-Phase Packings. *J. Chromatogr. A* **1987**, *405*, 145–153.
 34. Shinbo, T.; Yamaguchi, T.; Yanagishita, H.; Kitamoto, D.; Sakaki, K.; Sugiura, M. Improved Crown Ether-Based Chiral Stationary Phase. *J. Chromatogr. A* **1992**, *625*, 101–108.
 35. Aboul-Enein, H. Y.; Serignese, V. Direct Chiral Resolution of Phenylalkylamines Using a Crown Ether Chiral Stationary Phase. *Biomedical Chromatography* **1997**, *11*, 7–10.
 36. Kersten, B. S. HPLC Chiral Optimization of a Unique β -Amino Acid and Its Ester. *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, *17*, 33–48.
 37. Péter, A.; Lázár, L.; Fülöp, F.; Armstrong, D. W. High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation of β -Amino Acids. *J. Chromatogr. A* **2001**, *926*, 229–238.
 38. Choi, H. J.; Ha, H. J.; Han, S. C.; Hyun, M. H. Liquid Chromatographic Resolution of β -Amino Acids on CSPs Based on Optically Active (3,3'-Diphenyl-1,1'-Binaphthyl)-20-Crown-6. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *619*, 122–128.
 39. Choi, H.-J.; Cho, H.-S.; Lee, S.-J.; Hyun, M.-H. Liquid Chromatographic Resolution of Vigabatrin and Its Analogue γ -Amino Acids on Chiral

- Stationary Phases Based on (3,3'-Diphenyl-1,1'-Binaphthyl)-20-Crown-6. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, 32, 3017–3021.
40. Nishi, H.; Nakamura, K.; Nakai, H.; Sato, T. Separation of Enantiomers and Isomers of Amino Compounds by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography Utilizing Crown Ethers. *J. Chromatogr. A* **1997**, 757, 225–235.
 41. Lee, W.; Yong Hong, C. Direct Liquid Chromatographic Enantiomer Separation of New Fluoroquinolones Including Gemifloxacin. *J. Chromatogr. A* **2000**, 879, 113–120.
 42. Hilton, M.; Armstrong, D. W. Evaluation of the Enantiomeric Separation of Dipeptides Using a Chiral Crown Ether Lc Column. *J. Liq. Chromatogr.* **1991**, 14, 3673–3683.
 43. Esquivel, B.; Nicholson, L.; Peerey, L.; Fazio, M. Enantiomeric Resolution of Underivatized Small Peptides by HPLC with a Chiral Crown Ether Stationary Phase. *J. High Resol. Chromatogr.* **1991**, 14, 816–823.
 44. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Lipshutz, B. H.; Shin, Y.-J.; Welch, C. J. New Chiral Crown Ether Stationary Phase for the Liquid Chromatographic Resolution of α -Amino Acid Enantiomers. *J. Chromatogr. A* **2001**, 910, 359–365.
 45. Konya, Y.; Taniguchi, M.; Furuno, M.; Nakano, Y.; Tanaka, N.; Fukusaki, E. Mechanistic Study on the High-Selectivity Enantioseparation of Amino Acids Using a Chiral Crown Ether-Bonded Stationary Phase and Acidic, Highly Organic Mobile Phase by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2018**, 1578, 35–44.
 46. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Choi, H. J.; Kang, B. S.; Ha, H. J. Effect of the Residual Silanol Group Protection on the Liquid Chromatographic Resolution of Racemic Primary Amino Compounds on a Chiral Stationary Phase Based on Optically Active (3,3'-Diphenyl-1,1'-Binaphthyl)-20-Crown-6. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1138, 169–174.
 47. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Lipshutz, B. H.; Shin, Y.-J.; Welch, C. J. Liquid Chromatographic Resolution of Racemic Amines, Amino Alcohols and Related Compounds on a Chiral Crown Ether Stationary Phase. *J. Chromatogr. A* **2002**, 959, 75–83.
 48. Behr, J.-P.; Girodeau, J.-M.; Hayward, R. C.; Lehn, J.-M.; Sauvage, J.-P. Molecular Receptors. Functionalized and Chiral Macrocyclic Polyethers Derived from Tartaric Acid. *Helv. Chim. Acta* **1980**, 63, 2096–2111.
 49. Lee, G.; Adhikari, S.; Lee, S.; Lee, J. Y.; Na, Y. C.; Lee, W.; Bang, E. Chiral Recognition and Discrimination Studies of Tyrosine Enantiomers on (–)-18-Crown-6-Tetracarboxylic Acid as a Chiral Selector by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Docking Simulations. *Chirality* **2024**, 36,.
 50. Lee, S.; Kim, S.-J.; Bang, E.; Na, Y.-C. Chiral Separation of Intact Amino Acids by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Employing a Partial Filling Technique with a Crown Ether Carboxylic Acid. *J. Chromatogr. A* **2019**, 1586, 128–138.

51. Gerbaux, P.; De Winter, J.; Cornil, D.; Ravicini, K.; Pesesse, G.; Cornil, J.; Flammang, R. Noncovalent Interactions between ([18]Crown-6)-Tetracarboxylic Acid and Amino Acids: Electrospray-Ionization Mass Spectrometry Investigation of the Chiral-Recognition Processes. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11039–11049.
52. Hyun, M. H. Development of HPLC Chiral Stationary Phases Based on (+)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-Tetracarboxylic Acid and Their Applications. *Chirality* **2015**, *27*, 576–588.
53. Yu Jin, J.; Lee, W.; Ho Hyun, M. Development of the Antipode of the Covalently Bonded Crown Ether Type Chiral Stationary Phase for the Advantage of the Reversal of Elution Order. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2006**, *29*, 841–848.
54. Hyun, M. H.; Jin, J. S.; Lee, W. Liquid Chromatographic Resolution of Racemic Amino Acids and Their Derivatives on a New Chiral Stationary Phase Based on Crown Ether. *J. Chromatogr. A* **1998**, *822*, 155–161.
55. Berkecz, R.; Sztojkov-Ivanov, A.; Ilisz, I.; Forró, E.; Fülöp, F.; Hyun, M. H.; Péter, A. High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation of β -Amino Acid Stereoisomers on a (+)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-Tetracarboxylic Acid-Based Chiral Stationary Phase. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1125*, 138–143.
56. Lee, A.; Choi, H. J.; Jin, K. B.; Hyun, M. H. Liquid Chromatographic Resolution of 1-Aryl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines on a Chiral Stationary Phase Based on (+)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-Tetracarboxylic Acid. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4071–4076.
57. Conrad, U.; Chankvetadze, B.; Scriba, G. K. E. High Performance Liquid Chromatographic Separation of Dipeptide and Tripeptide Enantiomers Using a Chiral Crown Ether Stationary Phase. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 2275–2281.
58. Berkecz, R.; Némethi, G.; Péter, A.; Ilisz, I. Liquid Chromatographic Enantioseparations Utilizing Chiral Stationary Phases Based on Crown Ethers and Cyclofructans. *Molecules* **2021**, *26*, 4648.
59. Cram, D. J.; de Graaff, R. A. G.; Knobler, C. B.; Lingenfelter, D. S.; Maverick, E. F.; Trueblood, K. N. Chiral Recognition between Host and Guest: A Binaphthyl-18-Crown-6 Host with D-Phenylglycinium Methyl Ester Perchlorate Guest. A Difficult Structure Solved with CRUNCH. *Acta Crystallogr. B* **1999**, *55*, 432–440.
60. Machida, Y.; Nishi, H.; Nakamura, K. Nuclear Magnetic Resonance Studies for the Chiral Recognition of the Novel Chiral Stationary Phase Derived from 18-Crown-6 Tetracarboxylic Acid. *J. Chromatogr. A* **1998**, *810*, 33–41.
61. Nagata, H.; Nishi, H.; Kamigauchi, M.; Ishida, T. Guest-Dependent Conformation of 18-Crown-6 Tetracarboxylic Acid: Relation to Chiral Separation of Racemic Amino Acids. *Chirality* **2008**, *20*, 820–827.

62. Paik, M.-J.; Kang, J. S.; Huang, B.-S.; Carey, J. R.; Lee, W. Development and Application of Chiral Crown Ethers as Selectors for Chiral Separation in High-Performance Liquid Chromatography and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1274*, 1–5.
63. Avilés-Moreno, J. R.; Quesada-Moreno, M. M.; López-González, J. J.; Martínez-Haya, B. Chiral Recognition of Amino Acid Enantiomers by a Crown Ether: Chiroptical IR-VCD Response and Computational Study. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 9362–9370.
64. He, J.; Zheng, Z.-P.; Zhu, Q.; Guo, F.; Chen, J. Encapsulation Mechanism of Oxyresveratrol by β -Cyclodextrin and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin and Computational Analysis. *Molecules* **2017**, *22*, 1801.
65. Ma, S.; Shen, S.; Lee, H.; Yee, N.; Senanayake, C.; Nafie, L. A.; Grinberg, N. Vibrational Circular Dichroism of Amylose Carbamate: Structure and Solvent-Induced Conformational Changes. *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19*, 2111–2114.
66. Yashima, E.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y. NMR Studies of Chiral Discrimination Relevant to the Liquid Chromatographic Enantioseparation by a Cellulose Phenylcarbamate Derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4036–4048.
67. Czerwenka, C.; Zhang, M. M.; Kählig, H.; Maier, N. M.; Lipkowitz, K. B.; Lindner, W. Chiral Recognition of Peptide Enantiomers by Cinchona Alkaloid Derived Chiral Selectors: Mechanistic Investigations by Liquid Chromatography, NMR Spectroscopy, and Molecular Modeling. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8315–8327.
68. Bang, E.; Jung, J.-W.; Lee, W.; Lee, D. W.; Lee, W. Chiral Recognition of (18-Crown-6)-Tetracarboxylic Acid as a Chiral Selector Determined by NMR Spectroscopy. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, *9*, 1685–1692.
69. Chankvetadze, B. Combined Approach Using Capillary Electrophoresis and NMR Spectroscopy for an Understanding of Enantioselective Recognition Mechanisms by Cyclodextrins. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 337–347.
70. Fejős, I.; Varga, E.; Benkovics, G.; Darcsi, A.; Malanga, M.; Fenyvesi, É.; Sohajda, T.; Szente, L.; Béni, S. Comparative Evaluation of the Chiral Recognition Potential of Single-Isomer Sulfated Beta-Cyclodextrin Synthesis Intermediates in Non-Aqueous Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1467*, 454–462.
71. Schug, K. A.; Maier, N. M.; Lindner, W. Deuterium Isotope Effects Observed during Competitive Binding Chiral Recognition Electrospray Ionization—Mass Spectrometry of Cinchona Alkaloid-Based Systems. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 157–161.
72. Julian, R. R.; Akin, M.; May, J. A.; Stoltz, B. M.; Beauchamp, J. L. Molecular Recognition of Arginine in Small Peptides by Supramolecular Complexation with Dibenzo-30-Crown-10 Ether. *Int. J. Mass. Spectrom.* **2002**, *220*, 87–96.

73. Czerwenka, C.; Lämmerhofer, M.; Maier, N. M.; Rissanen, K.; Lindner, W. Direct High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Peptide Enantiomers: Study on Chiral Recognition by Systematic Evaluation of the Influence of Structural Features of the Chiral Selectors on Enantioselectivity. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5658–5666.
74. Nagata, H.; Nishi, H.; Kamigauchi, M.; Ishida, T. Structural Scaffold of 18-Crown-6 Tetracarboxylic Acid for Optical Resolution of Chiral Amino Acid: X-Ray Crystal Analyses and Energy Calculations of Complexes of d- and l-Isomers of Tyrosine, Isoleucine, Methionine and Phenylglycine. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3470.
75. Peluso, P.; Chankvetadze, B. Recognition in the Domain of Molecular Chirality: From Noncovalent Interactions to Separation of Enantiomers. *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 13235–13400.
76. De Gauquier, P.; Vanommeslaeghe, K.; Heyden, Y. Vander; Mangelings, D. Modelling Approaches for Chiral Chromatography on Polysaccharide-Based and Macrocyclic Antibiotic Chiral Selectors: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1198*, 338861.
77. Meyer, M. DALDA (H-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂), a Potent μ -Opioid Peptide Agonist, Affects Various Patterns of Locomotor Activities. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1995**, *51*, 149–151.
78. Ohnishi, A.; Shibata, T.; Imase, T.; Shinkura, S.; Nagai, K. Achiral Molecular Recognition of Substituted Aniline Position Isomers by Crown Ether Type Chiral Stationary Phase. *Molecules* **2021**, *26*, 493.
79. Weinstein, S. E.; Vining, M. S.; Wenzel, T. J. Lanthanide-Crown Ether Mixtures as Chiral NMR Shift Reagents for Amino Acid Esters, Amines and Amino Alcohols. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, 273–280.