

Промежуточный отчёт по проекту «Люминесцентные свойства энантиомерно чистых, рацемических и нерацемических смесей природных α -аминокислот допированных ионами лантаноидов — новый подход к хиральному анализу»

Баронский Марк Германович, Костюков Антон Иванович, Тарасевич Аркадий Викторович

Введение

Получение хиральных веществ в энантиомерно чистом виде и исследование биологической активности всех оптических изомеров потенциальных лекарственных средств является одним из важнейших требований современной фармакологической промышленности, а также становится всё более весомым и для агрохимического сектора (Reddy&Mehvar, *Chirality in Drug Design and Development*, Marcel Dekker, Inc. **2004**). Для справки можно упомянуть, что на данный момент уже около 70-80% новых лекарственных составляют именно хиральные энантиомерно чистые субстанции (отчёт компании DIACEL за **2015** г.), а их годовой объём продаж в последние годы исчисляется сотнями миллиардов долларов (Józwiak et al., *Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*, 3rd ed. CRC Press **2006**; Shafaati Iran. *J. Pharm. Res.* **2007**, 6, 73). Среди подходов для получения энантиомерно чистых веществ ключевую роль играют каталитические асимметрические реакции с применением (i) комплексов металлов с хиральными лигандами и (ii) хиральных органокатализаторов (см. напр.: Ojima, *Catalytic Asymmetric Synthesis*, 3rd ed. Wiley-VCH **2010**; Gruttaduria & Giacalone, *Catalytic Methods in Asymmetric Synthesis. Advanced Materials, Techniques, and Applications*, Wiley-VCH **2011**; Berkessel & Gröger, *Asymmetric Organocatalysis – From Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*, Wiley-VCH **2005**). Одними из наиболее широко используемых органокатализаторов являются природные аминокислоты и их производные.

Так как энантиомеры, как правило, проявляют совершенно различную биологическую активность, хиральный анализ продуктов является принципиальной стадией как при разработке асимметрических методов синтеза, так и на производстве. Классические физико-химические методы хирального анализа энантиомеров включают в себя: (i) оптические и спектральные измерения с помощью поляризованного излучения; (ii) проведения анализа в асимметричной среде или (iii) применение внешних хиральных вспомогательных реагентов (Busch, *Chiral Analysis*, Elsevier **2006**). Так, в случае с оптическими и спектральными методами, анализируется изменение поляризации излучения в зависимости от энантиомерного избытка (вращение плоскости поляризации света, дисперсия оптического вращения, циркулярный дихроизм); а в хроматографии используются хиральные носители; в ЯМР — оптически активные растворители или хиральные сдвигающие реагенты. Перевод энантиомеров в диастереомерные пары позволяет анализировать их ахиральными физическими методами (хроматография, ЯМР и т.д.).

По различным оценкам, около 90-95% всех рацематов кристаллизуются в форме истинных рацемических соединений, которые обладают физическими свойствами отличающимися от чистых энантиомеров (Jacques et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, Krieger **1994**). Среди физических методов, которые позволяют проводить отличие между энантиомерами и истинными рацематами в твёрдой фазе, можно упомянуть порошковую дифракцию рентгеновских лучей, ЯМР, инфракрасную (Jacques et al. *ibid.*), Рамановскую (Lima et al. *J. Raman Spectr.* **2010**, 41, 808) и терагерцовую спектроскопию THz-TDS (Yamaguchi et al. *Appl. Phys. Lett.* **2005**, 86, 053903), дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC), термогравиметрию и др. В ряде случаев различие в гомо- и гетерохиральных взаимодействиях между энантиомерами настолько сильны, что это может быть обнаружено не только в твёрдой, но и в газовой фазе — масс-спектрометрически (Yang et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 17074), в растворах — методом ЯМР (Nieminen et al. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 537; Hui et al. *Pharm. Biochem. Behav.* **1991**, 40, 491) и ахиральной хроматографией, что даже было использовано в препаративных целях (Soloshonok et al. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 4180).

Отдельно разрабатываются чувствительные и сверхчувствительные методы анализа низкого энантиомерного избытка (меньше или значительно меньше 1% ee), такие как: двумерная газовая хроматография GCxGC-ToFMS (Meinert&Meierhenrich *Ang. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10460); индуцированный циркулярный дихроизм в спиральных полимерах (Nonokawa&Yashima *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1278); обнаружение «криптохиральности» может быть осуществлено с использованием реакции Соаи, являющейся примером феноменального асимметрического автокатализа (Sato et al. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 315; Kawasaki&Soai *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2011**, 84, 879). Среди недавних трендов в области физической сегрегации энантиомера от истинного рацемата интересно отметить применение

магнитной левитации (Yang et al. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 7548), сублимации (Soloshonok et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12112; Tarasevych et al. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2013**, 43, 129; Tarasevych et al. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 10530; Tarasevych et al. *Chem. Comm.* **2015**, 51, 7054), гравитационных полей (Mastai et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2426).

Таким образом, детальный анализ литературы показал, что способы хирального анализа, основанные на различных физических свойствах энантиомерночистых (гомохиральных) и рацемических (гетерохиральных) образований, до сегодняшнего дня отсутствуют.

Люминесцентная спектроскопия — один из самых чувствительных физических методов. Возможности использования её для хирального анализа до сих пор были ограничены либо использованием циркулярной-поляризованной люминесценции (CPL), либо флуоресцентно-детектируемым циркулярным дихроизмом (FD CD), как, например, это продемонстрировано в недавних отдельных работах, (Okutani et al. *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 5527; Iwamura et al. *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 4094; Muller et al. *Chem. Commun.* **2005**, 3615). Энантиомерный избыток (*ee*) в данном случае может быть напрямую связан эллиптичностью возбуждаемого или излучаемого света, что принципиально не отличает данный подход от циркулярного дихроизма.

Цель работы:

Разработка простого и эффективного метода хирального анализа, основанного на физических различиях истинного рацемического соединения и чистого энантиомера. Исследование энантиомерночистых, рацемических и нерацемических смесей модельных хиральных соединений — природных α -аминокислот, **методом люминесцентного зондирования ионами переходных металлов**, в частности лантаноидами.

Основные задачи:

Оптическая спектроскопия гомо- и гетерохиральных взаимодействий между энантиомерами индивидуальных α -аминокислот и смесей допированных ионами редкоземельных элементов. Изучение электронной структуры, локального строения и симметрии окружения лантаноидного зонда в нерацемических смесях индивидуальных хиральных соединений с помощью люминесцентных методов. Выявление зависимости характеристик спектров от энантиомерной чистоты образца. Определение порога чувствительности метода. Сравнение полученных результатов с классическими подходами хирального анализа (хиральная газовая хроматография). Оценка потенциального использования метода для рутинного хирального анализа и изучения механизмов каталитических асимметрических реакций.

Методы и подходы, использованный на данном этапе выполнения проекта:

Допирование различных гомо- и гетерохиральных смесей α -аминокислот ионами переходных металлов и последующее изучение их люминесцентных характеристик. Основное внимание уделяется допированию ионами лантаноидов. Предлагаемый метод основан на хорошо известной способности ионов лантаноидов координировать со многими функциональными группами органических соединений, являющихся основаниями Льюиса. Большинство ионов лантаноидов, в силу особенностей электронной структуры, обладают поразительными люминесцентными характеристиками, меняющимися в зависимости от окружения иона (кристаллическая решётка, координационное число, тип лигандов, симметрия), что используется в данной работе.

На данном этапе работы осуществлялся подбор пары « f -ион — аминокислота» с выявлением и расшифровкой электронной структуры комплекса за счет эффекта “тяжелого катиона”, определение места и симметрии локализации катиона по электронным переходам. Были проведены люминесцентные исследования различных хиральных форм аланина (L, DL, D, нерацемические смеси), допированных ионами переходных металлов (европия, тербия, гадолиния, лантана, уранила). Проведены предварительные эксперименты с фенилаланином — аминокислотой обладающей собственной люминесценцией. Осуществлены низкотемпературные спектральные исследования, позволяющие на порядок повысить чувствительность метода и визуализировать фосфоресценцию.

Для хирального анализа смесей энантиомеров классическим методом была использована газовая хроматография (GC-FID) на хиральном носителе (диметилполисилоксан-циклодекстрин).

Оборудование, использованное на данном этапе: стенд спектроскопических измерений на базе автоматизированного спектрально-вычислительного комплекса UV-vis открытой архитектуры; стандартные спектрофлуориметры Cary Eclipse (Agilent, США); стенд лазерно-индуцированной люминесцентной спектроскопии; газовый хроматограф Кристалл 5000.2 с масс-спектрометрическим (Thermo ISQ Single Quadrupole MS) и пламенно-ионизационными детектором; капиллярная колонка для хирального анализа (Agilent CP-Chirasil-Dex CB).

Полученные за отчётный период важнейшие научные результаты и их обсуждение:

За текущий период выполнения проекта нами проведены детальные люминесцентные исследования различных хиральных форм модельного соединения — аланина, допированного ионами гадолиния, лантана, уранила, европия и тербия. Проведены предварительные эксперименты по исследованию различных хиральных форм фенилаланина в свободном и допированном состоянии. На основании полученных данных был подготовлен **патент Российской Федерации** под названием «**Способ определения энантиомерного избытка хиральных соединений**». Объём патента: 48 страниц, 7 таблиц и 7 фигур.

В ходе экспериментов, нами были определены люминесцентные свойства твёрдых энантиомерночистых L и D, рацемического и нерацемических смесей аланина различного состава с избытком L энантиомера. Образцы были допированы следовыми количествами (0.1% молярн.) ионами лантаноидов и актиноида (Gd^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , La^{3+} , UO_2^{2+}). Смеси были приготовлены растворением аминокислот с нитратом соответствующего иона в деионизированной воде (сопротивление 18 $M\Omega \cdot cm$) с последующим упариванием раствора на масляной бане (50°C) при перемешивании в вакууме. Твёрдый остаток досушивали в течении 5 ч при 80°C в вакууме (12-15 мм рт. ст.).

Допирование аланина (0, 1, 5, 25, 50, 75, 90, 100% *ee* L; 100% *ee* D) ионами Gd^{3+} (Ala : Gd^{3+} 1000 : 1) осуществлялось по вышеописанной методике. Нерацемические смеси (1, 5, 25, 50, 75, 90% *ee* L) готовились из энантиомерночистого L и рацемического DL Ala; смесь содержащую 1% избытка L энантиомера готовили взвешиванием на аналитических весах, имеющих точность до 6 знака. Ключевая особенность, которая была нами обнаружена — поразительное отличие интенсивности в спектрах фотолюминесценции (ФЛ) смесей L и DL-Ala допированного ионами гадолиния (III): при возбуждении на длине волны 270 нм, обе формы, содержащие 0.1 % (в молярном соотношении) Gd^{3+} наблюдаются полосы ФЛ с максимумами при 306 и 312 нм, соответствующие переходам электронным переходам $Gd^{3+} {}^6P_{5/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$ и ${}^6P_{7/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$. В длинноволновой части спектра проявляются малоинтенсивные полосы с максимумами при 327 и 347 нм, очевидно соответствующие проявлению внутримолекулярных колебательных переходов. Частоты, которых свидетельствуют об образовании комплекса с конкретной (карбоксилатной) функциональной группой. При этом, интенсивность люминесценции DL-Ala оказалась выше в **16 раз**. Мы провели аналогичные измерения для нерацемических смесей содержащих 1, 5, 25, 50, 75 и 90% энантиомерного избытка. На **рис. 1** представлена зависимость интенсивности ФЛ образцов от энантиомерного избытка. Одна из наиболее интересных особенностей зависимости проявляется в наличии максимума интенсивности ФЛ при 20-30% *ee*. Общие черты графика напоминают фазовые диаграммы плавления или растворения энантиомеров, образующих истинные рацемические соединения. Также следует обратить внимание и на существенные отличия рацемической DL смеси с нерацемической, содержащей лишь 1% *ee* L-Ala (2013 и 2196 а.е. для DL и 1% *ee* L, соответственно), что подразумевает возможность осуществления хирального анализа с низкими значениями энантиомерного избытка. Существенные отличия между рацематом и энантиомерночистым Ala были найдены в спектрах возбуждения ФЛ Gd^{3+} : наблюдаются широкие полосы с максимумами при значениях 250 и 273 нм, соответствующие переходам ${}^6D_{9/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$ и ${}^6I_{7/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$ в Gd^{3+} . Различия в

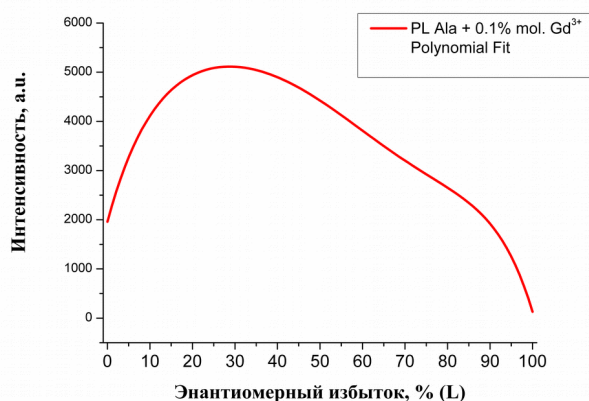


Рисунок 1. Зависимость интенсивности ФЛ ионов Gd^{3+} (переход ${}^6P_{7/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$) в зависимости от энантиомерного избытка аланина.

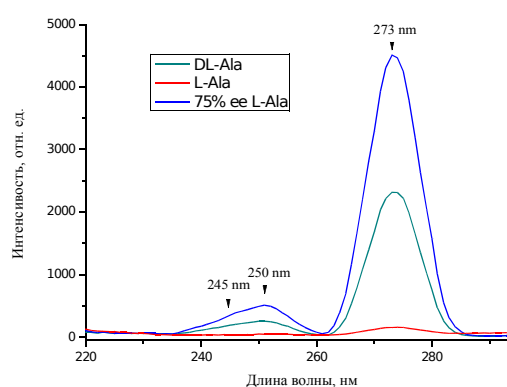
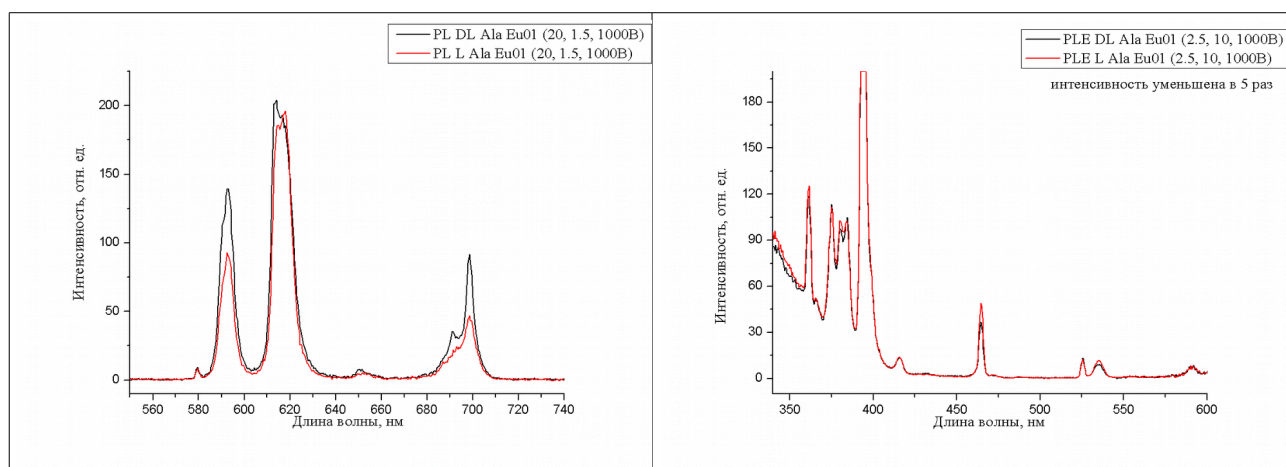


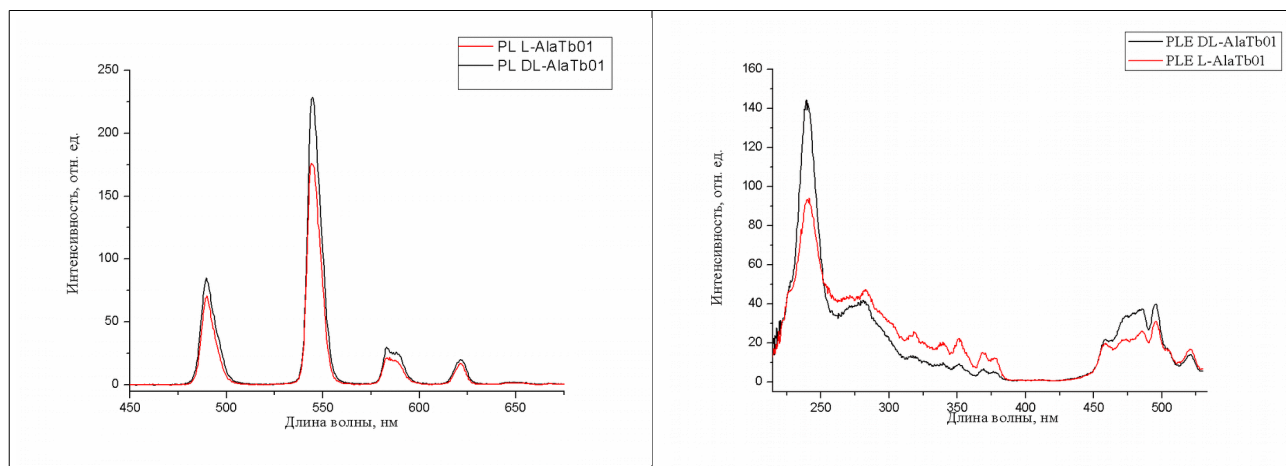
Рисунок 2. Спектры возбуждения ФЛ аланина с различным энантиомерным избытком, содержащих следовые количества ионов Gd^{3+} .

интенсивностях перехода ${}^6I_{7/2} \rightarrow {}^8S_{7/2}$ (273 нм) между допированными L, DL и 75% ee L образцами составило: 1 : 15 : 29.5 (**рис. 2**).

Допирование энантиомерно чистого L и рацемического DL Ala ионами Eu^{3+} (0.1 % мол.) осуществлялось по вышеописанной методике. В спектрах образцов L и DL Ala, допированных Eu^{3+} , наблюдается ФЛ в области 575-725 нм с близкими, но не совпадающими максимумами при 579.5, 592.6, 614, 650.5 и 698.4 нм для L и при 579.5, 592.3, 618.1, 650.5 и 698.4 нм для DL (**рис. 3а**). Полосы с указанными максимумами соответствуют переходам ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ ($J=0-4$) в ионах Eu^{3+} . Как видно из **рис. 3а**, наиболее сильные различия в спектрах проявляются в области перехода ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (610-625 нм). Кроме этого, наблюдаются значительные различия в интенсивности соответствующих переходов. Так для переходов ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ и ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ интенсивность ФЛ DL-Ala выше, чем у L в приблизительно 1,5 и 2 раза, соответственно (по высоте), **рис. 3а**. Полосы в спектрах возбуждения ФЛ, записанные для перехода ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ для L и DL-Ala также различаются по интегральной площади и высоте перехода (**рис. 3б**).



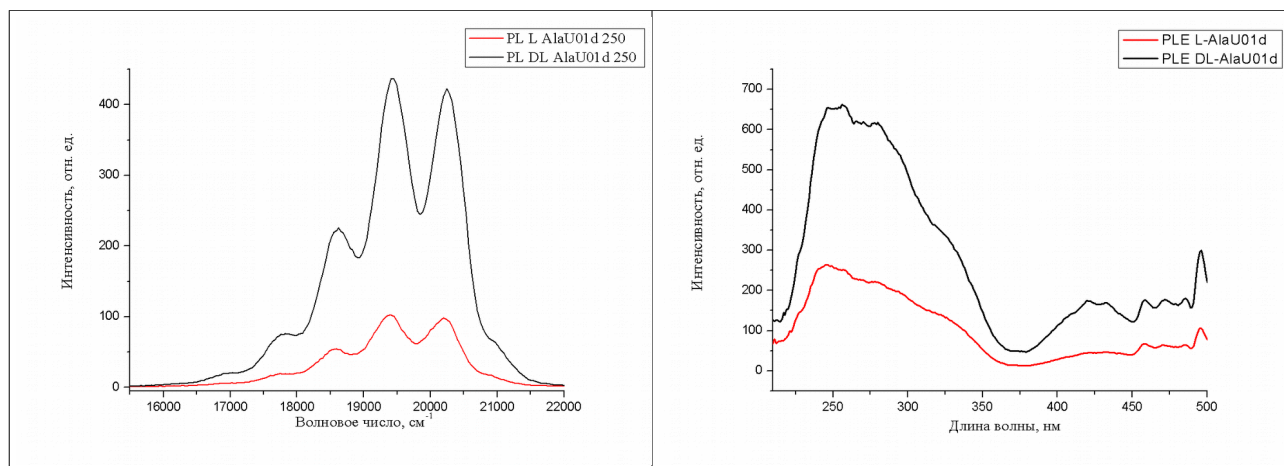
Рисунки 3а (слева) и 3б (справа). Спектры ФЛ и возбуждения ФЛ Eu^{3+} введённого в L и DL аланин.



Рисунки 4а (слева) и 4б (справа). Спектры ФЛ и возбуждения ФЛ Tb^{3+} введённого в L и DL аланин.

На **рис. 4** представлены спектры ФЛ (**а**) и возбуждения ФЛ (**б**) L и DL Ala, допированных ионами Tb^{3+} (0.1 % мол.). Существенные отличия между рацематом и энантиомерно чистым Ala были найдены как в спектрах ФЛ, так и в спектрах возбуждения ФЛ. Как видно из **рис. 4а**, спектры ФЛ обоих образцов лежат в области 475-700 нм. Полосы ФЛ с максимумами 489.5, 544.5, 583, 621.3, 647.9, 668.7 и 680 нм для обоих образцов нами приписаны к электронным переходам ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ ($J=6-0$) в ионах Tb^{3+} . В спектрах ФЛ L и DL (**рис. 4а**) значительные отличия в интенсивности наблюдаются для переходов ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_{6,5,4}$. Также отличия в интенсивности полос для L и DL форм наблюдаются и в спектрах возбуждения ФЛ (**рис. 4б**). Анализ спектров в области резонансного перехода выявляет характеристические частоты внутримолекулярных колебаний, позволяющий не прибегая к дополнительным методам исследования определить функциональную группу – комплексообразующую.

На **рис. 5** представлены спектры ФЛ (**а**) и возбуждения ФЛ (**б**) L и DL аланина, допированных ионами UO_2^{2+} (0.1 % мол.). В спектрах ФЛ наблюдаются характерные частоты колебания U-O в UO_2^{2+} . Соответствующая разница между ними составляет порядка 800 см^{-1} . Как и в случае, допирования другими ионами, наибольшие различия для образцов L и DL Ala наблюдаются как в интегральной интенсивности, так и в высоте линий. В случае DL Ala интенсивность ФЛ оказалась в 4 раза больше, чем для L. Частотный анализ выявляет принадлежность к определённой функциональной группе с проявляемыми несовпадениями частот колебаний.



Рисунки 4а (слева) и 4б (справа). Спектры ФЛ и возбуждения ФЛ UO_2^{2+} введённого в L и DL Ala.

Для серии люминесцентных измерений была осуществлена дополнительная очистка L, DL и D аланина методом сублимации в вакууме. Параллельно нами была отработана методика дериватизации свободных аминокислот в более летучие N-этоксикарбонил этиловые эфиры с применением этил хлорформиата в водно-спиртовых условиях в присутствии пиридина. Полученные производные могут быть проанализированы методом хиральной газовой хроматографии (**Рис. 5**). Для этого был подобран оптимальный температурный режим термостата хроматографа и режим потока газа-носителя позволяющий разделять и анализировать энантиомеры аланина.

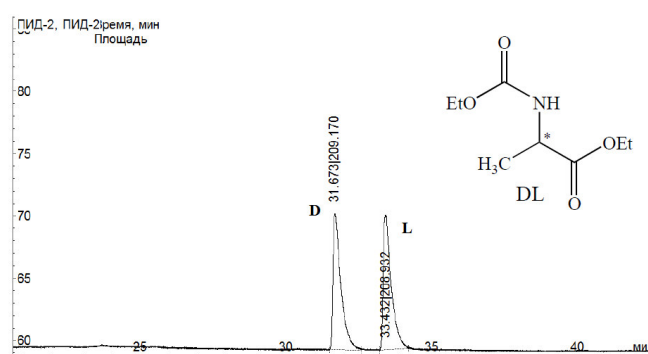


Рис. 5. Пример ГХ деривата DL-Ala.

Степень выполнения поставленных задач: на примере модельного хирального соединения — простейшей α -аминокислоты аланина (Ala), не обладающей собственной люминесценцией, показаны примеры возможностей визуализации *разительных* отличий люминесцентных характеристик зондов в зависимости от энантиомерного избытка образца аланина, вплоть до 1% *ee*. Обнаруженные отличия между чистым энантиомером и рацематом являются беспрецедентными (см. напр. Jacques et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, Krieger 1994). Полученные результаты указывают на принципиальную возможность определения *ee* хиральных соединений исходя из характеристик люминесцентных зондов. Дальнейшие исследования в данном направлении могут позволить разработать люминесцентный способ хирального анализа без использования каких-либо внешних асимметрических вспомогательных агентов, растворителей, хиральных носителей и без определения изменения поляризации излучения (сравнение напр. с ЯМР, хиральной ГХ и ВЭЖХ, поляризацией).

Программа исследований на следующие 3 месяца: аналогичные исследования для протеиновой хиральной α -аминокислоты фенилаланина (Phe), которая обладает собственной люминесценцией. Люминесцентные измерения как с допированием уже использованных ионов, так и для свободного Phe. Измерение кинетики затухания ФЛ и определению времён жизни ФЛ примесных ионов в Phe и в Ala, собственной ФЛ в случае Phe. Проведение экспериментов по изучению концентрационной зависимости ФЛ примесных ионов в Ala и Phe.

РЕЦЕНЗИЯ

на промежуточный отчёт по проекту М.Г. Баронского, А.И. Костюкова и А.В. Тарасевича
«Люминесцентные свойства энантиомерно чистых, рацемических и нерацемических
смесей природных α -аминокислот, допированных ионами лантаноидов –
новый подход к хиральному анализу».

Проект Баронского М.Г., Костюкова А.И. и Тарасевича А.В. посвящен разработке эффективного метода анализа энантиомерного состава смесей аминокислот, основанного на физических различиях рацемической и энантиомерно чистой формы соединения. Основой предлагаемого подхода является люминесцентный метод, а в качестве основного элемента исследования предложено использовать комплексы аминокислот и допирование последних ионами лантаноидами.

Авторами на предварительном этапе в качестве задела были *«проведены ... эксперименты по допированию различных форм аланина ионами Gd^{3+} , Eu^{3+} и Tb^{3+} ($Ala:Ln^{3+} = 1000:1$); ... обнаружены разительные отличия в спектральных характеристиках энантиомерно чистых (L и D -аланина) и рацемического DL -аланина»* (см. исходный проект-заявку участников Конкурса). Опираясь на этот задел, для достижения **целей работы** авторы сформулировали шесть **Основных задач**:

- 1) *Оптическая спектроскопия гомо- и гетерохиральных взаимодействий между энантиомерами индивидуальных α -аминокислот и смесей, допированных ионами редкоземельных элементов.*
- 2) *Изучение электронной структуры, локального строения и симметрии окружения лантаноидного зонда в нерацемических смесях индивидуальных хиральных соединений с помощью люминесцентных методов.*
- 3) *Выявление зависимости характеристик спектров от энантиомерной чистоты образца.*
- 4) *Определение порога чувствительности метода.*
- 5) *Сравнение полученных результатов с классическими подходами хирального анализа (хиральная газовая хроматография).*
- 6) *Оценка потенциального использования метода для рутинного хирального анализа и изучения механизмов каталитических асимметрических реакций.*

При ознакомлении с промежуточным отчетом авторов возникает очень много вопросов и неясностей, на что дополнительно влияет несколько сумбурная форма отчета. Нет ясности в части различий между тем, что было сделано и описано в качестве задела проекта, и тем, что реально было сделано в ходе выполнения проекта. В тексте нет чёткого разнесения результатов и их соответствия конкретным пунктам **Основных задач**.

Пункт 1 **Основных задач**, по моему мнению, является перефразированной формой названия всего проекта, и, следовательно, говорить про конкретные результаты по этому пункту следует в контексте сделанного по проекту в целом. Далее: фактически все результаты, изложенные в отчете, получены на примере только одной аминокислоты –

аланина, хотя кое-где в тексте упоминается и фенилаланин. Из изложенного не вырисовывается ясной картины различий между допированными образцами аланина и фенилаланина. Также остаётся туманным для стороннего наблюдателя преимущество (или недостаток) гадолиния перед другими лантаноидами. Означает ли содержимое рисунков **3а,б** и **4а,б**, что европий и тербий являются малоперспективными ионами? Здесь и в других местах текста отчета очень не хватает авторской трактовки полученных результатов, необходимых комментариев. Далее: когда авторы планировали «*определение порога чувствительности метода*» (см. пункт 4 **Основных задач**), шла ли речь об энантиомерном избытке *ee* или о весовых количествах допированной аминокислоты? Если всё же о «*ee*», то какова чувствительность метода по отношению к весовым количествам? В пункте 5 **Основных задач** планировалось соотнести авторский метод определения «*ee*» с традиционно используемым хроматографическим методом на хиральной колонке. Для отчётности авторы привели «картинку» хроматограммы без какого-либо комментария, который бы сравнивал эффективность обоих методов. К сожалению, этого не сделано, а, значит, и говорить о преимуществах предложенного метода перед традиционным оказывается бездоказательным. Пункт 6 **Основных задач**, по моему мнению, совсем никак не освещён в настоящем отчёте.

Суммируя вышесказанное, должен отметить, что в представленной форме отчёт авторов не позволяет сделать квалифицированное заключение о степени выполнения объявленных задач и новизне представленных материалов. Скорее даже создаётся впечатление, что у авторов отсутствуют значимые результаты, и это отсутствие они стараются спрятать за второстепенными, малозначимыми данными. Очень хочется ознакомиться с авторской интерпретацией полученных и представленных здесь данных, но без упоминания научно слабо-обоснованного заключения, что полученные результаты позволяют «*разработать люминесцентный способ хирального анализа без использования каких-либо внешних асимметрических вспомогательных агентов, растворителей, хиральных носителей и без определения изменения поляризации излучения*». Рекомендую Экспертной группе приостановить финансирование данного проекта до получения от авторов недостающей информации и необходимых комментариев.

Рецензия на промежуточный отчет по проекту «Люминесцентные свойства энантиомерно чистых, рацемических и нерацемических смесей природных α -аминокислот допированных ионами лантаноидов — новый подход к хиральному анализу»
Баронского Марка Германовича, Костюкова Антона Ивановича, Тарасевича Аркадия Викторовича

Разработка простого и эффективного метода хирального анализа, основанного на физических различиях истинного рацемического соединения и чистого энантиомера безусловно является очень нужным и полезным делом. Авторы описали достаточно подробно проблематику в области разработки чувствительных методов анализа энантиомерного избытка. Использование ионов РЗЭ в качестве флуоресцентных зондов для определения энантиомерной чистоты оптически активных соединений, действительно, является достаточно новым и интересным и нужным направлением. Однако, для рецензента осталось не понятным, то, как авторы обосновывают задачи, которые они ставят для достижения цели. Измерение энантиомерной чистоты в случае использования ФЛ-зондов основано на измерении круговой поляризации в циркулярно поляризованной флуоресценции получаемой от комплексов центрального ФЛ-иона и хиральных лигандов. По крайней мере, это сообщается свежих публикациях по данной тематике. В поставленных авторами задачах не значится измерения поляризации фотонов, испускаемых в процессе ФЛ возбужденного иона РЗЭ, находящегося в составе исследуемых сред – смесей аминокислот с различным соотношением L и D энантиомеров.

В первую очередь, авторы должны обосновать, какие физические процессы могут повлиять на механизм возбуждения ионов РЗЭ и соответствующие механизмы релаксации: ФЛ, безызлучательные переходы через возбуждение колебательных степеней свободы, и т.д. Данные процессы должны определяться (зависеть) соотношением L и D изомеров аминокислот, в среде которых находятся зонды – ионы РЗЭ. Без такого, хотя-бы научно-популярного объяснения, очень трудно оценивать «серьезность» экспериментальных подходов и идеи в целом.

Полученные экспериментальные результаты, во-первых, действительно, очень интересны. Однако, во-вторых, они вызывают ряд вопросов. В первую очередь, обращает на себя внимание рисунок 2 отчета, и пояснение к нему. Утверждается, что разница в интенсивности поглощения света с длиной волны 273 нм различается примерно в 30 [sic!] раз для ионов гадолиния, введенных в матрицу из чистого L-аланина, и смеси D-аланин + L-аланин, с энантиомерным избытком последнего 75%. При этом мольная доля ионов Gd^{3+} одинакова и составляет 0,1%. Если различную интенсивность ФЛ ионов Gd^{3+} в зависимости от энантиомерного избытка (рис.1), чисто теоретически (*придется, конечно, постараться, т.к. 16 кратное различие в интенсивности ФЛ для чистого L-ala и LD-ala является гигантским, т.к. в той же статье Okutani et al. Inorg. Chem. 2014, 53, 5527 наблюдали циркулярный дихроизм не более 0,074 для сложных комплексов европия, координированных с L и D аминокислотами*), но можно объяснить различными механизмами тушения ФЛ в зависимости от отношения энантиомеров, то настолько огромная разница в интенсивности спектров возбуждения ФЛ (рис.2) для рецензента осталась, по меньшей мере, интересным фактом.

Кроме того, осталось неясным, почему авторы используют достаточно сложную методику пробоподготовки, тогда, как в литературе исследования проводят на водных растворах соответствующих аминокислот и комплексов ионов РЗЭ. Данная методика пробоподготовки, теоретически, может содержать в себе «подводные камни». Не известно (возможно известно, но авторы эту информацию не приводят), как происходит кристаллизация аланина (и других аминокислот) в зависимости от соотношения энантиомеров. Кристаллизуются ли кристаллиты с одинаковым (как в исходном растворе) отношением L/D энантиомеров, или механизм кристаллизации является сложным и приводит к образованию кристаллитов с различным отношением L/D? Как происходит координация ионов РЗЭ (в каких позициях находятся ионы РЗЭ) в соответствующих кристаллах? Возможна ли селективная координация ионов РЗЭ локально с молекулами L или D-энантиомеров в кристалле, так, что локальное окружение иона РЗЭ будет отличаться в плане отношения L/D от его среднего содержания в кристалле? Если

ответ на последний вопрос утвердительный, то используемые авторами зонды «регистрируют», на самом деле не истинное исходное отношение L/D в растворе, а локальное в кристалле. Не уделено внимание вопросу однородного распределения ионов РЗЭ по кристалликам аминокислот. Я не берусь утверждать, что все эти вопросы обязательно являются критическими. Но, теоретически некоторые из предложенных эффектов могут объяснять наблюдаемую авторами разницу в спектрах ФЛ, и, особенно, возбуждения ФЛ (рис.2).

Таким образом, авторы, на взгляд рецензента, должны, если не исключить все данные нежелательные эффекты (или показать, что они не существенны), то, по крайней мере произвести эксперименты по воспроизводимости, которые покажут, что все эти побочные эффекты, если и имеются, то практически неизменны и могут быть учтены эмпирически. Точно ли совпадет зависимость интенсивности ФЛ гадолиния от энантиомерного избытка для новой серии образцов с зависимостью, приведенной на рис.1? К сожалению таких экспериментов по воспроизводимости авторами пока сделано не было (или они не приведены в отчете). Кроме того, хотелось бы увидеть не просто сопоставление спектров ФЛ для различных ионов РЗЭ в кристаллах аланина с различным соотношением L/D , а проверенные и воспроизводимые калибровочные графики, из которых по измеренным интенсивностям (наверное, надежнее, по соотношению интенсивности) полос можно было бы достоверно определить энантиомерный избыток. Это важно, потому что, все-таки, авторы заявляют ни много, ни мало – новую методику определения энантиомерного избытка. К тому же заявлено, что даже подготовлен патент.

Есть также замечания частного характера.

Нужно приводить спектры ФЛ и возбуждения ФЛ в одинаковых единицах. На рис. 4а, почему-то, спектр приведен в см⁻¹, тогда, как на остальных рисунках в нм.

К сожалению, самый важный график на рис. 1, приведен некорректно. На нем отсутствуют экспериментальные точки, а приведена лишь полиномиальная аппроксимация. Так приводить критически важные данные недопустимо, т.к. неизвестно, какой разброс между экспериментальными точками имелся исходно. Не ясно, какая вообще экспериментальная погрешность определения интенсивности, и как она соотносится с изменениями на графике. Соответственно, совершенно не понятно, какая будет точность определения энантиомерного избытка аланина, если воспользоваться таким графиком, как калибровочной зависимостью. Кроме того, характер функциональной зависимости на рис.1. не является биективным, т.е. одинаковые значения интенсивности ФЛ могут наблюдаться для двух различных значений энантиомерного избытка, например ~ 10 и ~ 55%. Как определить величину избытка в таких случаях?

Все данные вопросы возникают по причине неполноты предоставленного отчета и отсутствия рассуждений относительно упомянутых выше важных моментов. Это, конечно, серьезный минус отчета. Однако, я надеюсь, что это относится именно к отчету, а не к работе в целом, и необходимые (возможно не все из упомянутых) эффекты исследованы/исключены/учтены авторами. Настоятельно рекомендую авторам привести обоснование использования именно выбранной пробоподготовки, их предложения, идеи относительно физических эффектов, лежащих в основе наблюдаемых авторами изменений, эксперименты по воспроизводимости и, как основной результат, которого пока нет, полученные калибровочные зависимости.

Резюме: отчет предоставлен в недостаточно подробном виде. Отсутствует обсуждение ряда критически важных, на взгляд рецензента, вопросов. Тем не менее, считаю, что авторы учтут пожелания рецензента и надеюсь на получение хороших результатов и создание, в перспективе, новой методики. Это, действительно нужное дело.