

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Medicinální chemie



**Lidziya Semeniuk**

Separace chirálních kapalných krystalů

Separation of chiral liquid crystals

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Anna Kubičková, Ph.D.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne *23.08.2021*

Podpis

## Abstrakt

Středem zájmu této bakalářské práce jsou enantioseparace vybraných termotropních chirálních tyčinkovitých kapalných krystalů za použití techniky ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie na chirální stacionární fázi v reverzním modu. Studované chirální kapalně krystalové mezogeny tvořící smectickou mezofázi, mezi sebou se liší chemickou strukturou (délkami alkylových řetězců, substituenty) a mají chirální centrum odvozené od dvou látek – 2-oktanolu a kyseliny mléčné. Bakalářská práce se zabývá testováním enantioselektivního potenciálu nové UHPLC kolony Chiralpak IB-U s tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem) celulózy jako chirálním selektorem. Provádí se optimalizace chromatografických podmínek, tj. teploty a rychlosti průtoku mobilní fáze. Jako mobilní fáze se používají acetonitril, methanol, ethanol a deionizovaná voda v různých poměrech. Posuzuje se vliv struktury kapalných krystalů (přítomnost a pozice atomů fluoru na benzenovém jádře, délka alkyloxylového řetězce, povaha chirálního centra) na průběh separací, tedy na retenci, enantioselektivitu a rozlišení. Výsledky se porovnávají s publikovanými daty podobných studií, a tak se diskutuje vliv stacionární fáze na uvažované enantioseparace.

**Klíčová slova:** ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, chirální kapalně krystalové, separace enantiomerů, chirální stacionární fáze, chromatografie s reverzními fázemi

## Abstract

This bachelor thesis focuses on the enantioseparation of selected thermotropic chiral rod-shaped liquid crystals using ultra-high-performance liquid chromatography on a chiral stationary phase working in a reverse mode. The studied chiral liquid crystals are mesogens that form a smectic mesophase. They differ in chemical structure (lengths of alkyl chains, substituents) and have a chiral center derived from two substances - 2-octanol and lactic acid. The current study consists of testing the enantioselective potential of a new UHPLC column Chiralpak IB-U with tris (3,5-dimethyl phenyl carbamate) cellulose as a chiral selector. The optimization of the chromatographic conditions, i.e., temperature and mobile phase flow rate, is performed. Acetonitrile, methanol, ethanol, and deionized water in various ratios are used as mobile phases. The influence of the structure of liquid crystals (namely the presence and the position of fluorine atoms on the benzene nucleus, length of the alkyl chain, nature of the chiral center) on the course of separations, i.e., on retention, enantioselectivity, and resolution, is assessed. The results are compared with published data from similar studies. The influence of the stationary phase on the enantioseparations of interest is discussed.

**Keywords:** ultra-high performance liquid chromatography, chiral liquid crystals, separation of enantiomers, chiral stationary phases, reversed-phase chromatography

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí RNDr. Anně Kubičkové, PhD., za vstřícnost, odborné vedení mé práce a za pomoc s organizací laboratorních experimentů. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Petře Vaňátové za zaškolení ve funkcích UHPLC přístroje a vysvětlení v daném tématu. Velké poděkování patří také mé partnerce Bc. Anastasii Zakharanka za veškerou srdeční podporu během mého studia.

# Obsah

<b>Seznam zkratek a symbolů.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Úvod .....</b>	<b>8</b>
1.1 Chiralita.....	9
1.2 Kapalné krystaly .....	9
1.2.1 Chirální kapalné krystaly.....	11
1.2.2 Studované chirální kapalné krystaly .....	12
1.3 Chromatografie.....	14
1.3.1 HPLC.....	15
1.3.2 UHPLC .....	16
1.3.3 Separační módy.....	16
1.3.4 Účinnost separace. Van Deemterova rovnice.....	18
1.3.5 Chirální separace.....	21
<b>2. Experimentální část.....</b>	<b>26</b>
2.1 Chemikálie.....	26
2.2 Instrumentace .....	26
2.3 Metodika práce .....	26
<b>3. Výsledky a diskuze.....</b>	<b>28</b>
3.1 Optimalizace podmínek pro enantioseparaci .....	28
3.1.1 Optimalizace průtoku .....	28
3.1.2 Optimalizace teploty .....	29
3.2 Vliv složení mobilní fáze na enantioseparaci.....	30
3.3 Vliv stacionární fáze na enantioseparaci.....	34
3.4 Vliv struktury kapalných krystalů s centrem chiralit na bázi 2-oktanolu na enantioseparaci .....	37
3.4.1 Vliv přítomnosti fluoru na benzenovém jádře na enantioseparaci.....	37
3.4.2 Vliv délky alkyloxylového řetězce na enantioseparaci .....	38
3.5 Vliv struktury kapalných krystalů s centrem chiralit na bázi kyseliny mléčné na enantioseparaci .....	40
<b>4. Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>44</b>
<b>Příloha 1.....</b>	<b>47</b>

## Seznam zkratek a symbolů

CE – kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)

CSF – chirální stacionární fáze (chiral stationary phase)

CDA – chirální derivatizační činidla (chiral derivating agents)

HETP – výškový ekvivalent teoretického patra (height equivalent to a theoretical plate)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

LCs – kapalné krystaly (liquid crystals)

LCD – displej z kapalných krystalů (liquid crystal display)

LLC – rozdělovací kapalná chromatografie (liquid liquid chromatography)

MF – mobilní fáze

NPLC – chromatografie s normálními fázemi (normal phase liquid chromatography)

SF – stacionární fáze

SFC – superkritická fluidní chromatografie (supercritical fluid chromatography)

TLC – chromatografie na tenké vrstvě (thin-layer chromatography)

RP-HPLC – chromatografie s reverzními fázemi (reversed phase high-performance liquid chromatography)

PDA – fotodiodová řada (photodiode-array)

UHPLC – ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography)

$\alpha$  – enantiosektivita

$k_1$  – retenční faktor prvního píku

$k_2$  – retenční faktor druhého píku

$L$  – délka kolony

$N$  – počet teoretických pater

$R$  – rozlišení

$t_R$  – retenční čas

$t_{R,1}$  – retenční čas prvního píku

$t_{R,2}$  – retenční čas druhého píku

$u$  – průtoková rychlost

$w_1$  – šířka prvního píku při základně

$w_2$  – šířka druhého píku při základně

$w_{1/2}$  – šířka píku v polovině jeho výšky

# 1. Úvod

Chirální separace, jež znamená rozdělení enantiomerů, se široce uplatňuje v různých odvětvích chemie, od farmaceutického průmyslu po materiálové vědy<sup>1</sup>. Proces chirální separace má v základu pojem chiralita, tj. vlastnost látek nebýt totožné se svým zrcadlovým obrazem. Chiralita je běžná u molekul organických látek; základní stavební látky organismů (sacharidy, bílkoviny) jsou chirální a jejich biologická účinnost je na chiralitě závislá. Tato vlastnost je důležitá při syntéze nových léčiv tj. ve farmaceutickém průmyslu, neboť i malá přítomnost neaktivního enantiomeru může být pro organismus toxická<sup>2</sup>. Další skupinou látek, u kterých je běžná chiralita a kterými se bude tato práce zabývat, je skupina chirálních kapalných krystalů. Kapalně krystalové stavy představují stav hmoty, jehož vlastnosti jsou přechodem mezi kapalným a pevným skupenstvím, a jsou významné pro technologie uplatněné v elektronice, například ve výrobě moderních LCD displejů, projektorů a mikročipů<sup>3</sup>. Ve všech aplikacích má zásadní vliv optická čistota, tj. relativní obsah požadovaného enantiomeru vzhledem k celkovému obsahu obou enantiomerů jedné látky. Proto je potřeba vyvíjet nové účinné metody chirálních separací pro charakterizaci nově připravených materiálů. Poslední studia zabývající se chirálními separacemi kapalných krystalů<sup>4,5</sup> ukázaly, že velký potenciál pro enantioseparace má vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Byly publikovány úspěšné výsledky separací pomocí HPLC s kolonami na bázi derivatizované amylozy. Amylóza se skládá z  $\alpha$ -D glukózy a její monosacharidové jednotky jsou spojené pomocí  $\alpha$ -1,4 glykosidové vazby. Středem zájmu této práce je otestování enantioselektivního potenciálu nové kolony na bázi jiného polymeru glukózy – celulózy, ve které jsou monosacharidové jednotky spojené pomocí  $\beta$ -1,4 glykosidové vazby.

Cílem práce je

- 1) otestovat účinnost kolony Chiralpak IB-U na bázi celulózy (tris(3,5-dimethylphenylkarbamát) celulózy) pro enantioseparaci kapalných krystalů za různých podmínek teploty, rychlosti průtoku a složení mobilní fáze
- 2) porovnat výsledky enantioseparace s kolonou na bázi amylozy, Chiralpakem IA-U (tris(3,5-dimethylphenylkarbamát) amylozy).

## 1.1 Chiralita

Chiralita je vlastnost molekuly. Molekula je chirální, pokud není ztotožnitelná se svým zrcadlovým obrazem. Lze to připodobnit ke vztahu mezi levou a pravou rukou. Chirální molekula obsahuje jeden anebo více středů chiralit (prvků chiralit), což je příčinou vzniku chiralit; tyto prvky jsou definovány tak, že rozložení atomů kolem středu chiralit je ve všech třech rozměrech různé. Přítomnost středu chiralit je nutnou podmínkou chiralit, nikoliv však postačující. Aby byla molekula chirální, nesmí mít rovinu symetrie ani střed symetrie. Chiralita se dělí do skupin podle prvku chiralit: centrální chiralita (chirální centrum), axiální chiralita (chirální osa), planární chiralita (chirální rovina).

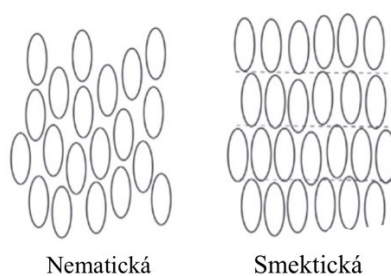
Chirální molekuly, které jsou zrcadlovým obrazem jedna druhé nazýváme enantiomery. Nutná podmínka pro existenci enantiomerů je nemožnost převést model molekuly v identický útvar zrcadlením v rovině. Enantiomery se strukturně vzájemně liší absolutní konfigurací. Pokud o nějaké látce říkáme, že víme její absolutní konfiguraci, rozumíme tím, že víme, která ze dvou v úvahu přicházejících struktur danému enantiomeru přísluší. Pro označení konfigurace na chirálním atomu (chirální centrum) se používají symboly *R* a *S* neboli Cahn-Ingold-Prelogův systém (pravidlo pro určení priority substituentů na chirálním atomu). Enantiomery mají stejné fyzikální vlastnosti (bod tání, bod varu, hustota, viskozita) a chovají se stejně při chemických reakcích, pokud jsou v achirálním prostředí. Enantiomery se liší svou optickou aktivitou, tj. schopností stáčet rovinu polarizovaného světla. Směr optické rotace určuje, který symbol (+/-) se používá v názvosloví pro odlišení enantiomerů: (+) pro pravotočivé látky, (-) pro levotočivé látky. Toto označení se vztahuje výhradně ke směru otáčení roviny polarizovaného světla, nevypovídá o skutečném prostorovém uspořádání na chirálním atomu (konfigurací). Směs obsahující ekvimolární množství obou enantiomerů se nazývá racemát neboli racemická směs a vykazuje nulovou optickou aktivitu.

## 1.2 Kapalné krystaly

Kapalné krystaly neboli mezogeny jsou skupinou látek, které jsou schopné tvořit mezofázi – stav hmoty, kdy má látka vlastnosti na pomezí mezi pevným a kapalným skupenstvím. Je to stav, ve kterém látky mohou téct jako kapalina, avšak mají pravidelné vnitřní uspořádání molekul jako pevné krystaly a vykazují anizotropní vlastnosti (optické a elektromagnetické). Škála praktického využití kapalných krystalů je velmi široká. Dlouhodobě se uplatňují při výrobě displejů pro elektrotechniku (notebooky, mobilní telefony, digitální kamery, lékařské

přístroje atd.)<sup>6</sup>. Májí významnou roli v materiálové vědě, jsou často pokládány za modelové materiály ke studiu obecných vlastností kondenzovaných systémů, protože jsou vhodným materiálem pro zkoumání vztahů mezi strukturou molekul a fyzikálními vlastnostmi látek. Taky přispívají k pochopení fázových přechodu látek, vlastností biologických membrán a chování samoorganizujících systémů<sup>7</sup>. V moderních nanotechnologiích jsou kapalné krystaly využívány jako pomocné látky pro transport léčiv<sup>8</sup>.

Podle příčiny vzniku mezofáze lze kapalné krystaly rozdělit do dvou hlavních skupin, a to lyotropní a termotropní kapalné krystaly. Termotropní mezogeny tvoří mezofázi v určitém teplotním rozsahu, pod dolní teplotní hranicí jsou v pevném stavu, nad horní hranicí představují izotropní kapalinu. Termotropní kapalné krystaly, jejichž separace jsou předmětem této práce, se dělí do čtyř dalších skupin, a to podle tvaru molekul: tyčinkovité (angl. calamitic neboli rod-like), diskotické (angl. disk-like), konické a banánového tvaru. Pro vznik termotropních mezogenů není vyžadované určité rozpouštědlo. Naopak u lyotropních mezogenů má typ a koncentrace rozpouštědla vliv na agregaci mezofáze a její chování. Tyčinkovité kapalné krystaly se liší uspořádáním a mírou organizace mezofáze, nejčastějšími typy jsou smektická a nematická fáze (Obr. 1). U jedné látky lze pozorovat obě tyto fáze, či pouze jednu. Molekuly nacházející se ve smektické fázi jsou uspořádány do paralelních na sobě nezávislých vrstev, ve kterých jsou molekuly orientovány stejným směrem. Nematická fáze není uspořádána do vrstev, ale osy jednotlivých molekul směřují zhruba stejným směrem<sup>9</sup>. Při zahřívání může smektická fáze přecházet do méně organizované nematické fáze.

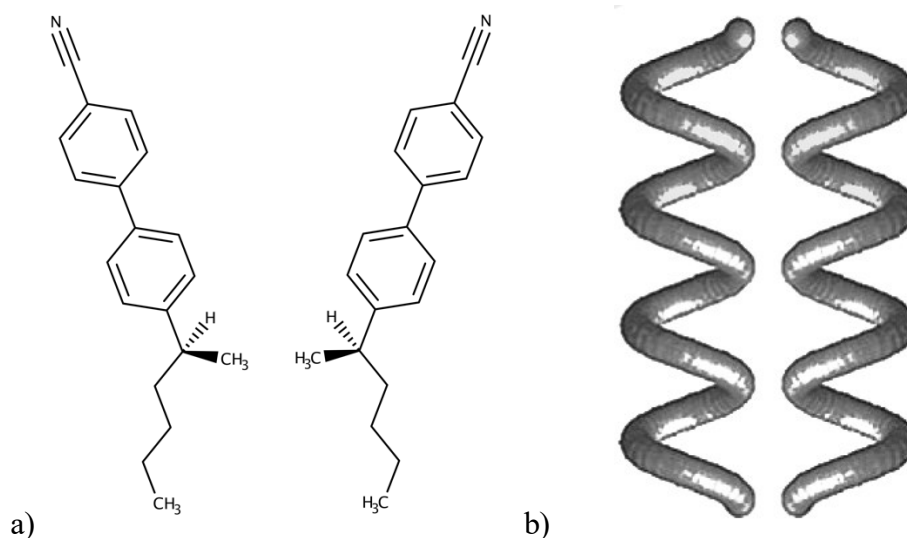


Obrázek 1. Schematické znázornění uspořádání v kapalně krystalických mezofázích (popis v textu).

Orientované uspořádání kapalných krystalů způsobuje zajímavé optické a elektrooptické jevy. V závislosti na uspořádání mezofáze může kapalný krystal měnit polarizaci světla, které jim prochází. V elektrickém poli se kapalný krystal chová tak, že se molekuly snaží otočit v jeho směru (nematické fáze)<sup>10</sup>. Specifické vlastnosti kapalných krystalů jsou určeny tvarem molekul a interakcemi mezi nimi.

## 1.2.1 Chirální kapalné krystaly

Přítomnost chirálního centra ovlivňuje interakce mezi molekulami mezogenu, takže chirální kapalné krystaly mají nové vlastnosti oproti achirálním<sup>11</sup>. Na rozdíl od achirálních kapalných krystalů, chirální mají dodatečnou supramolekulární strukturu – helix neboli šroubovici<sup>10</sup> (Obr. 2).



Obrázek 2. a) Chirální mezogen, (R) 2-[(4-kyano)-4-difenylnyl]-hexan spolu se svým S enantiomerem, (S) 2-[(4-kyano)-4-difenylnyl]-hexan. b) Levo- a pravotočivá šroubovice, která schematicky představuje uspořádání chirálních nematik.

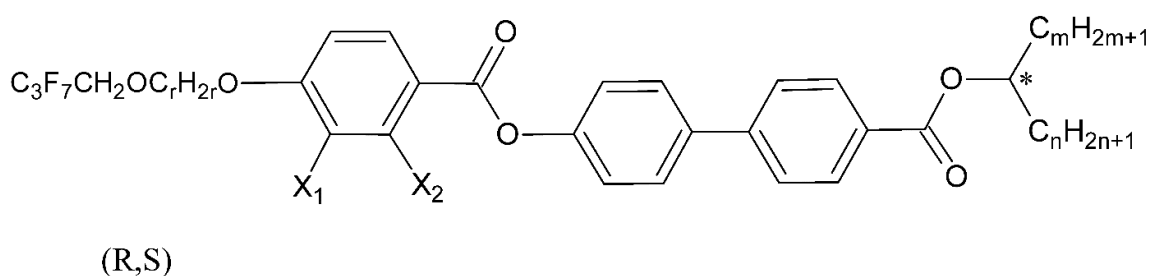
Struktura šroubovice se charakterizuje krokem šroubovice (angl. helical pitch), tj. vzdáleností dvou bodů ve vertikální rovině po dokončení otáčky a určuje vlnovou délku světla, která je při ozáření odražena. Pro řadu chirálních nematik je tento krok srovnatelný s vlnovou délkou viditelného světla. Spolu s periodickou supramolekulární strukturou fáze to vede k tomu, že odražené světlo je ve viditelné části spektra, a tedy fáze bude vypadat barevně. Struktura šroubovice chirálních nematik je velmi citlivá na teplotu<sup>10</sup>: barva fáze se s teplotou mění. Tato vlastnost je úspěšně využívána v medicíně (LCD termometry).

## 1.2.2 Studované chirální kapalné krystaly

Předmětem zájmu této práce bylo otestování enantioselektivního potenciálu kolony Chiralpak IB-U pro chirální separace vybraných termotropních chirálních tyčinkovitých kapalných krystalů, které byly syntetizované v rámci rozsáhlé studie o vlivu struktury mezogenů na jejich mezomorfni vlastnosti<sup>12</sup>. Tyto kapalně krystalové tvoří smektickou mezofázi. Sloučeniny skupiny tyčinkovitých mezogenů obsahují podlouhlé rigidní jádro, tvořené několika benzenovými kruhy, a flexibilní alkanové řetězce na jeho koncích. Studované kapalně krystalové se dají dále rozlišit do dvou níže definovaných skupin podle látky ze které je odvozeno chirální centrum. Jednotlivé struktury studovaných kapalných krystalů a jejich zkratky jsou uvedené v Příloze 1.

### Skupina 1 - Chirální centrum odvozené od 2-oktanolu

Chirální centrum mezogenů první skupiny je odvozeno od 2-oktanolu. Obecná struktura látek je znázorněna na Obr. 3

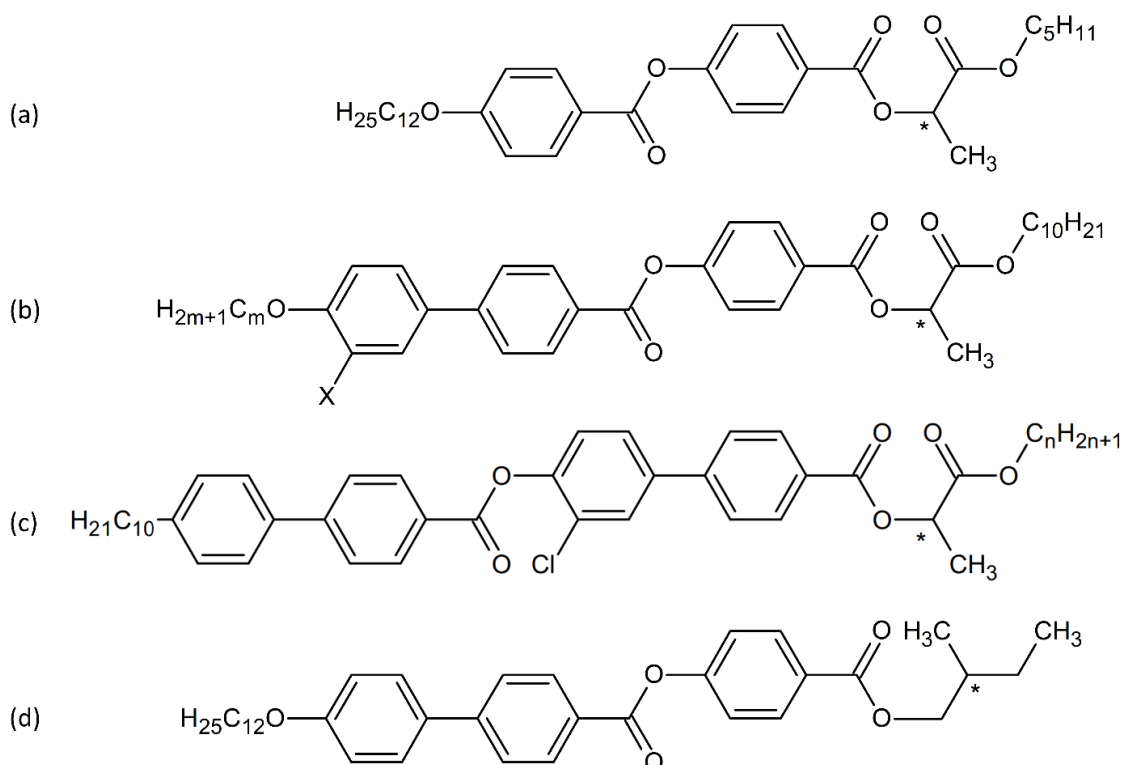


Obrázek 3. Obecné schéma kapalných krystalů s centrem chiralit na bázi 2-oktanolu. Látky se liší délkou alkyloxylového řetězce, přítomností, případně pozicí fluoru na benzenovém kruhu.  $rX_1X_2$  představuje zkratku použitou pro názvy všech vzorků této skupiny, kde  $r$  je délka postranního uhlíkového řetězce,  $X_1$  a  $X_2$  jsou pozice pro případnou substituci fluorem. Například vzorek 5HF má pět atomů uhlíku v postranním alkyloxylovém řetězci, vodík na pozici  $X_1$  a fluor na pozici  $X_2$ . Znak \* značí asymetrický uhlík.

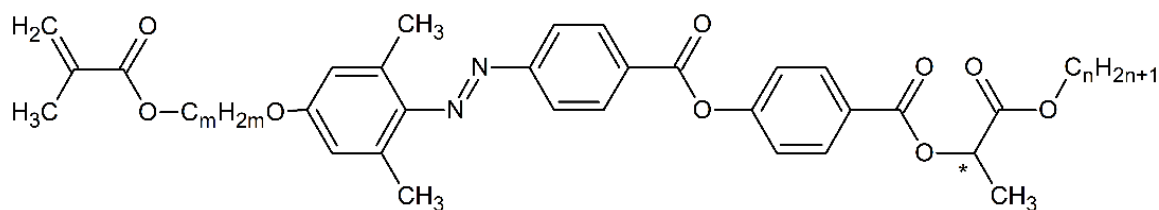
Je vidět, že achirální část molekuly je mnohem větší než část chirální, a toto způsobuje poměrně obtížnou separaci enantiomerů takových látek. Enantioseparace látek s chirálním centrem odvozeným od 2-oktanolu byla již dříve provedená za využití superkritické fluidní chromatografie (SFC)<sup>13</sup>.

## Skupina 2 – Chirální centrum odvozené od kyseliny mléčné

Kapalné krystaly, které jsou součástí této skupiny mají chirální centrum odvozeno od kyseliny mléčné (Obr.4,5), což je přírodní látka, která je levná a dobře dostupná pro účely syntézy ve velkých množstvích. Do skupiny 2 byla navíc přiřazena látka Z 12/\*, která se od látky ZL 12/10 liší podobou chirálního centra a není tudíž odvozena od laktátu, viz Obr. 4d. Tato látka byla přidána mezi testované látky, aby bylo možno diskutovat vliv nejbližšího okolí asymetrického uhlíku na enantioseparace.



Obrázek 4. Obecné schéma kapalných krystalů s centrem chirality na bázi kyseliny mléčné, a) 12PHB<sup>2</sup> AL, b) BCL 6/10 (m=6, X =Cl) a ZL 12/10 (m=12, X = H), c) 10ZBBL (n=4) a 10ZBDL (n=10) a d) látky Z 12/\*. Znak \* značí asymetrický uhlík.



Obrázek 5. Obecné schéma kapalných krystalů s centrem chiralitity na bázi kyseliny mléčné, obsahujících azobenzen. Látky se značí zkratkou MDA m/n, kde m označuje délku spaceru a n délku koncového alkyly, např. látka MDA 6/10 (m = 6, n =10).

Výše zobrazené obecné struktury kapalných krystalů jsou velké hydrofobní molekuly. Kvůli jejich vlastnostem je možné tyto látky separovat pomocí chromatografií s normálními fázemi (NPLC), což bylo v minulosti studováno<sup>5</sup>. V této práci se provádí separace pomocí chromatografie s reverzními fázemi (RP-LC).

### 1.3 Chromatografie

Chromatografie je analytická instrumentální metoda založena na rozdělování látek mezi dvě nemísitelné fáze. Podstatou separace směsí látek je opakované ustavování rozdělovacích rovnováh komponentů vzorku mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze (MF, eluent) je pohyblivá a určitým směrem unáší komponenty vzorku; stacionární fáze (SF, sorbent) je nepohyblivou náplní prostoru, ve kterém dochází k separaci<sup>14</sup>. Analyty ve vzorku unášeném mobilní fází opakovaně interagují (sorpce a desorpce) s fází stacionární. Separace je umožněna různými vazebnými silami těchto interakcí, a tedy i různou mírou brzdění pohybu jednotlivých komponent. Vztah (1) udává distribuci složky vzorku X mezi mobilní a stacionární fází:

$$K_D = \frac{[X]_s}{[X]_m} \quad (1)$$

Ve vztahu (1)  $[X]_s$  je molární koncentrace složky X ve SF,  $[X]_m$  je molární koncentrace složky X v MF,  $K_D$  je distribuční konstanta příslušné složky X, závislá na povaze látky X a vlastnostech MF a SF. Čím větší je hodnota  $K_D$ , tím víc je daná složka zadržována na SF<sup>15</sup>. Zásadním hlediskem pro rozdělení chromatografických metod je skupenský stav MF, podle něhož se vyčleňují plynová chromatografie (GC), kapalinová chromatografie (LC), případně superkritická fluidní chromatografie (SFC); hlubší přístup k třídění chromatografických metod musí zohledňovat mechanismus separace (adsorpce, rozdělování, iontová výměna atd.), který souvisí s vlastnostmi SF<sup>16</sup>.

### 1.3.1 HPLC

HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je instrumentální analytická chromatografická technika. Tato metoda používá kolony o přesných rozměrech s náplněmi SF o dobře definované, malé velikosti částic (řádově 3–10  $\mu\text{m}$ ), které vykazují velký hydrodynamický odpor (jako důsledek vysoké homogenity, vysoké hustoty náplně) <sup>17</sup>. K dispozici je mnoho různých typů kolon s náplněmi o různé pórovitosti, velikosti částic, s různými chemickými modifikacemi povrchu částic tvořících SF. Kolony, používané v HPLC analýzách, jsou nejčastěji vyráběny z odolné antikorozi ocele nebo ze speciálně tvrzeného borosilikátového skla, občas opatřeného ocelovým pláštěm. Nejrozšířenější je oxid křemičitý  $\text{SiO}_2$  modifikovaný navázáním funkčních skupin. Obecným rysem všech typů HPLC je použití vysokých tlaků (až do 400 bar), nutných pro dosažení optimálního průtoku mobilní fáze a dostatečné účinnosti separačního procesu. Bezpulzní, stálý průtok MF systémem se zajišťuje čerpadlem, které může být buď izokratickým (pro izokratickou eluci, kdy MF zachovává konstantní složení během analýzy) nebo gradientovým (pro eluci gradientovou, vhodnou pro separaci směsí složitějších, kdy se složení MF mění plynule během analýzy).

Nástřik (dávkování) vzorku se provádí nejčastěji automatických dávkovačem (u novějších instrumentů) nebo šesticestným ventilem s dávkovací smyčkou, aby se vyhnulo kolísání průtokové rychlosti. MF se účastní procesu separace, a tak správná volba jejího složení je velmi významná pro dosažení kýženého průběhu separačního procesu.

Detekce v kapalinové chromatografii se provádí pomocí různých instrumentálních metod: jsou používány detektory fotometrické, fluorimetrické, hmotnostní, elektrochemické. Na přístroji, na kterém byla vypracována tato práce, se používá detektor s diodovým polem (photodiode-array, PDA), který umožňuje kontinuálně měřit absorbanci MF a komponent vzorku na výtoku z kolony ve viditelné a UV oblasti elektromagnetického záření.

Technika HPLC má význačné postavení v analytické chemii, je to nezastupitelná metoda pro analýzu roztoků netěkavých látek ve vzorcích s komplexními maticemi. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se široce uplatňuje v mnoha oblastech chemického výzkumu, ve farmaceutickém průmyslu, v medicíně, v potravinářské chemii, v analýzách spojených s chemií životního prostředí<sup>18, 19,20</sup>.

### 1.3.2 UHPLC

UHPLC (ultra – vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je takzvanou rychlou technikou kapalinové chromatografie, která používá kratší náplňové kolony a porézní uniformní částice sorbentu SF o velmi malých průměrech (<2  $\mu\text{m}$ , často 1,7  $\mu\text{m}$ ) v systému s extrémně vysokými tlaky (až 1000 bar). Účinnost separace se obecně zvyšuje se snižující se velikostí částic. Zmenšení velikosti částic je ale příčinou značného zvýšení tlaku v systému, a proto je nutné použít kratší kolonu, aby bylo možné se dostat do oblasti prakticky realizovatelných tlaků. Tato chromatografická technika dovoluje dosáhnout vysoké účinnosti separace a vysokých hodnot rozlišení za stejnou nebo zkrácenou celkovou dobu analýzy ve srovnání s HPLC. Hlavní, primární výhodou použití UHPLC kolon je zkrácená doba analýzy<sup>21</sup>. Se zkrácenou dobou analýzy souvisí také úspora MF, a taky možnost rychlejšího testování kolon za různých chromatografických podmínek, což usnadňuje postupy optimalizace chromatografických metod.

Vývoj metody UHPLC souvisí s pokroky ve výrobě materiálů s částicemi o definované velikosti, tvaru, porozitě, s požadovanou hustotou uspořádání a vysokou homogenitou. Kolony naplněné sub-2  $\mu\text{m}$  částicemi se staly komerčně dostupnými od roku 2004. I když ke UHPLC analýze je nutností použití speciálních čerpadel pro zajištění ultra – vysokých tlaků, tato metoda se rychle rozšířila a ve mnoha případech začala nahrazovat metodu konvenční HPLC v průmyslových a výzkumných laboratořích<sup>22, 23</sup>. Tato práce byla vypracována na UHPLC systému vybaveném kvalitní vysokotlakou kvartérní pumpou, umožňující míchání až čtyř rozpouštědel a zajišťující velmi malé zpoždění gradientu a skvělou reprodukovatelnost.

### 1.3.3 Separační mody

Pro klasifikaci chromatografických metod je vždy ústřední separační mechanismus neboli příčiny zadržování a dělení látek analyzovaného vzorku na koloně. V adsorpční chromatografii (LSC) je základem rozdílná adsorpce molekul analytů na povrchu SF (fyzikální adsorpce, chemisorpce); v iontové výměnné chromatografii (IEC) se uplatňují mechanismy výměny iontů analytů na iontoměničích; gelová permeační chromatografie (GPC) dělí molekuly separovaných látek na základě jejich velikosti (sítový efekt) ; afinitní chromatografie (AC) se zakládá na vysoce specifických biochemických interakcích mezi specifickým selektorem, který je navázán na SF, a analytem, atd. Nejběžnější, a také důležitý pro tuto práci je

chromatografický systém RP-HPLC (HPLC s obrácenými fázemi), který patří mezi LLC, neboli rozdělovací chromatografii.

Rozdělovací chromatografie využívá různou rozpustnost složek vzorku ve dvou nemísitelných kapalinách, jedna, z kterých je eluentem a druhá je nanášena, navázána na SF (nejčastěji chemicky modifikovaný silikagel) <sup>24</sup>.

Zásadním kritériem pro třídění jednotlivých variant rozdělovací chromatografie je podstata interakce analytu se stacionární fází. Základní rozdělení se provádí podle relativní polaritě SF a MF, a právě toto rozdělení bude uvedeno v dané kapitole, poněvadž právě následující separační módy se normálně využívají v praxi pro separace kalamatických kapalných krystalů.

- V systémech s normálními fázemi (NP-HPLC) je víc polární sorbent a míň polární eluent. Jako SF se v takových variantách provedení LC používá čistý silikagel nebo alumina; může být použita i modifikovaná stacionární fáze (např. silikagel s navázanou diolovou, kyano anebo aminopropylovou skupinou). Jako MF se používají nepolární uhlovodíky (heptan, hexan, toluen), chlorované uhlovodíky (chloroform, dichlormethan); jako modifikátory mobilní fáze se pro úpravu, optimalizaci elučních vlastností mohou přidávat nízkomolekulární alkoholy nebo ethery. Retence klesá se zvyšujícím se podílem polárního rozpouštědla v mobilní fázi. Při tomto provedení chromatografického procesu se nejméně polární sloučeniny eluují jako první a nejpolárnější složky – jako poslední. Interakce analytů, které se uplatňují, jsou van der Waalsovy síly (disperzní, orientační, indukční),  $\pi$ - $\pi$  interakce, a také vodíková vazba <sup>25</sup>.
- V systémech s obrácenými neboli reverzními fázemi (RP-HPLC) je méně polární sorbent a více polární eluent. Jako SF se v takových variantách provedení LC nejčastěji používá silikagel modifikovaný navázáním vhodných funkčních skupin (oktadecyl-silikagel, oktyl-silikagel, fenyl(hexyl)-silikagel a jiné). Jako MF nejčastěji vystupují směsi vodných pufrů s organickými rozpouštědly (hlavně acetonitril, methanol, ethanol). Mohou být i bezvodé MF (např. směsi acetonitrilu s alkoholy). Tento mód bývá nazýván jako bezvodá reverzní fáze, případně polárně organický mód. Retence klesá se snižující se polaritou MF. Nepolární látky se eluují později než látky polární. Nekovalentní mezimolekulové interakce, které se podílí na procesech rozdělování jsou především hydrofobní interakce<sup>26</sup>.

### 1.3.4 Účinnost separace. Van Deemterova rovnice

Při chromatografickém procesu, kdy vzorek postupuje kolonou, se jeho jednotlivé složky navzájem od sebe dělí. Zároveň dochází k tomu, že se zóny jednotlivých analytů rozšiřují. Studium toho, co ovlivňuje retenci, retardaci, rychlosti migrace, interakce „sorbent – analyt“, se zabývá termodynamika separace. Z kinetické stránky věci, jsou zajímavé procesy rozmývání zón jednotlivých látek v systému a související rozšiřování píků. Oba tyto pohledy mezi sebou souvisí a mají rozhodující vliv na rozlišení píků ve výsledném chromatogramu. Bylo navrženo několik modelů pro vysvětlení rozmývání zón a vzniku charakteristického tvaru píků, přibližně odpovídajícího Gaussově distribuci <sup>27</sup>. Teorie chromatografického patra je starší a zakládá se na předpokladu dosažení rovnováhy na koloně v jednotlivých pomyslných krocích neboli délkových úsecích rozdělovacího procesu – virtuálních patrech. Sofistikovanější modely dynamické teorie uvažují procesy v nerovnovážném systému, však pojem „teoretické patro“ se zachoval i v těchto modernějších přístupech.

Počet teoretických pater kolony představuje míru účinnosti dané chromatografické kolony a může být vyjádřen následující rovnicí:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,545 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2)$$

kde  $N$  je počet teoretických pater analytické kolony,  $t_R$  je retenční čas uvažovaného analytu,  $W$  je šířka píku příslušejícího analytu při základně,  $W_{1/2}$  je šířka píku příslušejícího analytu v polovině jeho výšky.

Numerické koeficienty jsou odvozené na základě znalosti Gaussovy funkce. Podobně vztahu (2) může být nadefinován i vztah pro výškový ekvivalent teoretického patra,  $H$  (3):

$$H = \frac{L}{N} \quad (3)$$

kde  $L$  je délka chromatografické kolony.

Vyšší hodnoty  $N$ , respektive nižší hodnoty  $H$ , indikují vyšší účinnost separace. Účinnost separačního procesu lze ovlivňovat volbou chromatografických podmínek jako jsou délka kolony, teplota, výběr SF a MF, rychlost průtoku MF, velikost částic SF <sup>27</sup>.

K popisu míry separace dvou složek, a tedy k popisu separace jím příslušejících elučních křivek, se používá veličina zvaná rozlišení –  $R_{1,2}$ , rovnice (4). Je to hodnota bezrozměrná.

Optimalizací separačních podmínek se vždy snaží dosáhnout optimálních hodnot rozlišení.  $R_{1,2} = 1,5$  indikuje, že píky jsou rozdělené na základní linii.

$$R_{1,2} = \frac{(t_{R,2} - t_{R,1})}{0,5 (W_1 + W_2)} \quad (4)$$

Vysvětlení symbolů použitých v rovnici (4) je dáno výše v textu. Rovnice (4) je užitečná v praxi. Existuje však i další rovnice zvaná skutečnou rovnicí rozlišení, poskytující hlubší náhled do toho, jaké parametry rozlišení ovlivňují:

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(\alpha_{2,1} - 1)}{\alpha_{2,1}} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (5)$$

$$\alpha_{2,1} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R,2}}{t_{R,1}} \quad (6)$$

$$k_2 = \frac{t_{R,2}}{t_M} \quad (7)$$

V rovnici (5)  $N$  je počet pater kolony,  $\alpha_{2,1}$  je separační faktor, nadefinovaný podle rovnice (6),  $k_2$  je retenční neboli kapacitní faktor látky 2, nadefinovaný podle rovnice (7). Retenční (kapacitní) faktor ukazuje, kolikrát víc času stráví látka ve stacionární fázi než ve fázi mobilní.

Redukované retenční časy příslušných látek ( $t'_{R,2}$  a  $t'_{R,1}$ ) jsou, v podstatě znamenající čas, který ty analyty stráví ve stacionární fázi a  $t_M$  je mrtvý čas kolony.

Stejným způsobem jako v rovnici (6) se definuje i enantioselektivita kolony neboli schopnost chromatografického systému rozlišit, oddělit dva enantiomery látky od sebe navzájem. Enantioselektivita je vyjadřována separačním (selektivitním) faktorem  $\alpha$ :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (8)$$

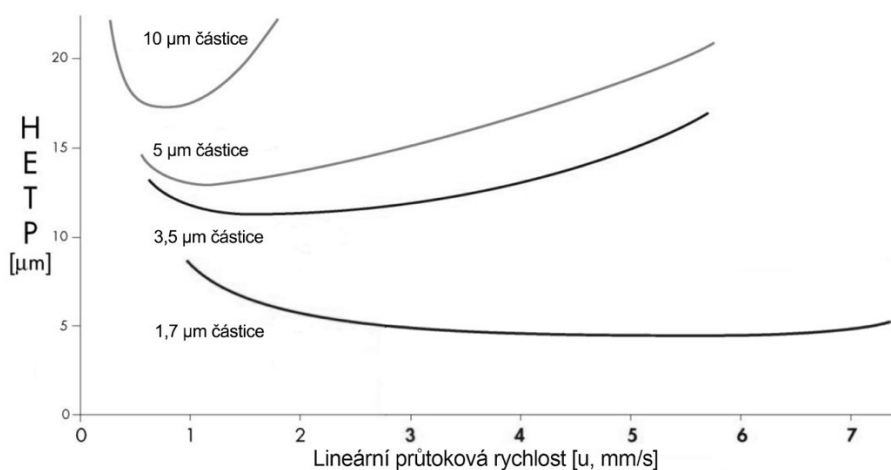
Ve vztahu (8) je  $k_2$  retenčním faktorem toho enantiomeru, který je detekován jako druhý,  $k_1$  přísluší tomu enantiomeru, který je eluován první.

Van Deemterova rovnice je jednou ze základních rovnic chromatografie, vyjadřující závislost mezi výškou teoretického patra (HETP, výškový ekvivalent teoretického patra) a střední lineární rychlostí toku mobilní fáze. Rovnice uvažuje různé příspěvky k difuznímu rozšíření chromatografických zón, její minimum odpovídá takové rychlosti průtoku MF,  $u$  [mm/s], při které je nejnižší HETP (a tedy nejvyšší účinnost separace) za daných podmínek (teplota, velikost částic SF, atd.). Ve své základní formě může být van Deemterova rovnice zapsána následujícím způsobem:

$$H = A + B/u + Cu \quad (9)$$

V rovnici (9) je význam symbolů  $H$  [mm] a  $u$  [mm/s] je vysvětlen výš v textu. Koeficient  $A$  je konstanta, nezávislá na průtokové rychlosti. Je to příspěvek vířivé difuze: kvůli nehomogenitě SF (přítomnosti více kanálů různých šířek a délky v porézních strukturách) různé částice MF musejí urazit různé vzdálenosti. Obecně je velikost příspěvku vířivé difuze úměrná velikosti částic SF a pravidelnosti plnění kolony. Koeficient  $B$  souvisí s podélnou molekulární difuzí v MF. Podélná difúze v mobilní fázi je dána přirozenou tendencí látek difundovat ze zón s vyššími koncentracemi do těch s nižšími. Tento příspěvek je nepřímo úměrný lineární rychlosti průtoku MF, tedy použití vyšších  $u$  vede ke snížení vlivu podélné difuze. Koeficient  $C$  symbolizuje souhrnně odpor proti přenosu hmoty v mobilní a stacionární fázích. Odpor proti přenosu hmoty v SF je dán tím, že různé molekuly difundují různě hluboko do SF; v MF rychlostní profil molekul je parabolický – ty stýkající se se stěny kanálků jsou bržděny. Tento příspěvek je přímo úměrný lineární rychlosti toku MF.

Na Obr. 6 je zobrazen průběh van Deemterových křivek pro různé velikosti částic SF. Je vidět, že snižující se průměry částic SF vedou k významnému snížení HETP (tedy ke zvýšení účinnosti separace), a taky ke posunu minima křivek směrem k vyšším průtokovým rychlostem. Zároveň se mění tvar křivky: existence větší oblasti minimálních HETP místo ostrého minima umožňuje flexibilnější výběr průtokových rychlostí <sup>28</sup>.

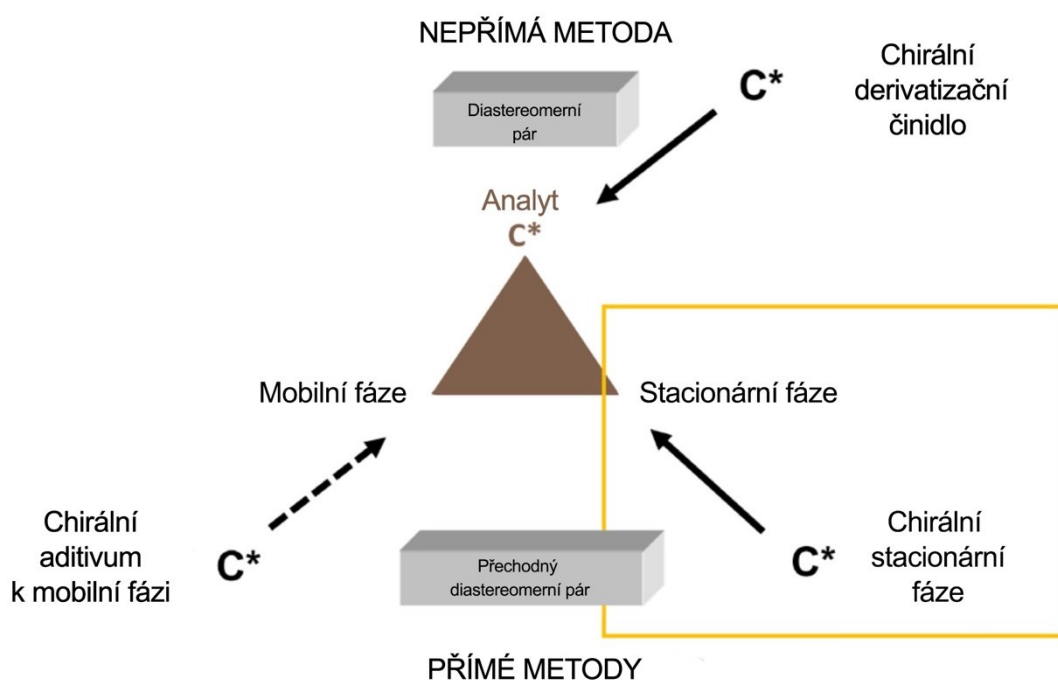


Obrázek 6. Průběh van Deemterových křivek pro různé velikosti částic SF <sup>28</sup>.

### 1.3.5 Chirální separace

Chirální separace neboli rozdělení enantiomerů látek s centrem (centry) chiralit, jsou mimořádně důležité pro vědecký výzkum a technologii – jsou nezbytné všude, kde je zapotřebí dosáhnout vysoké optické čistoty syntetizovaného nebo používaného materiálu. Co se týká medicínální chemie, 56 % v současnosti používaných léků jsou chirální molekuly<sup>29</sup>. Požadovanou biologickou aktivitu má pouze jeden enantiomer molekuly léčiva, a tak obrovský význam chirálních separací pro farmaceutický průmysl je zjevný. UHPLC se prokázala jako velice užitečná metoda pro tyto aplikace<sup>30</sup>.

Vzhledem ke vlastnostem enantiomerních sloučenin, které byly popsány v kapitole 1.1, jejich separace je možná pouze na základě jejich kovalentní (nepřímá metoda) nebo dočasné nekovalentní modifikace (přímé metody) za účelem získání diastereomerních entit, které vykazují rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti a jsou separovatelné<sup>31</sup> (viz Obr. 7).



Obrázek 7. Techniky přímé a nepřímé enantioseparace.

Nepřímou metodou pro enantioseparaci opticky aktivních molekul v kapalinové chromatografii je použití chirálních derivatizačních činidel (CDA) které reakcí s racemickou směsí izomerů uvažované látky poskytují pár diastereomerů s vhodnými vlastnostmi pro separaci a detekci. Mezi hlavní výhody této metody patří možnost výběru takového derivatizačního činidla, aby se získaly diastereomerní deriváty s dobrými chromatografickými charakteristikami, předvídatelnou eluční sekvencí, snadnou detekcí a používání konvenčních achirálních HPLC

kolon. Překážkou však často je kritická nutnost mít vysoce opticky čisté derivatizační činidlo a v neposlední řadě náročnost a zdoluhavost celého procesu separace (kovalentní navázání a odstranění nezreagovaného CDA).

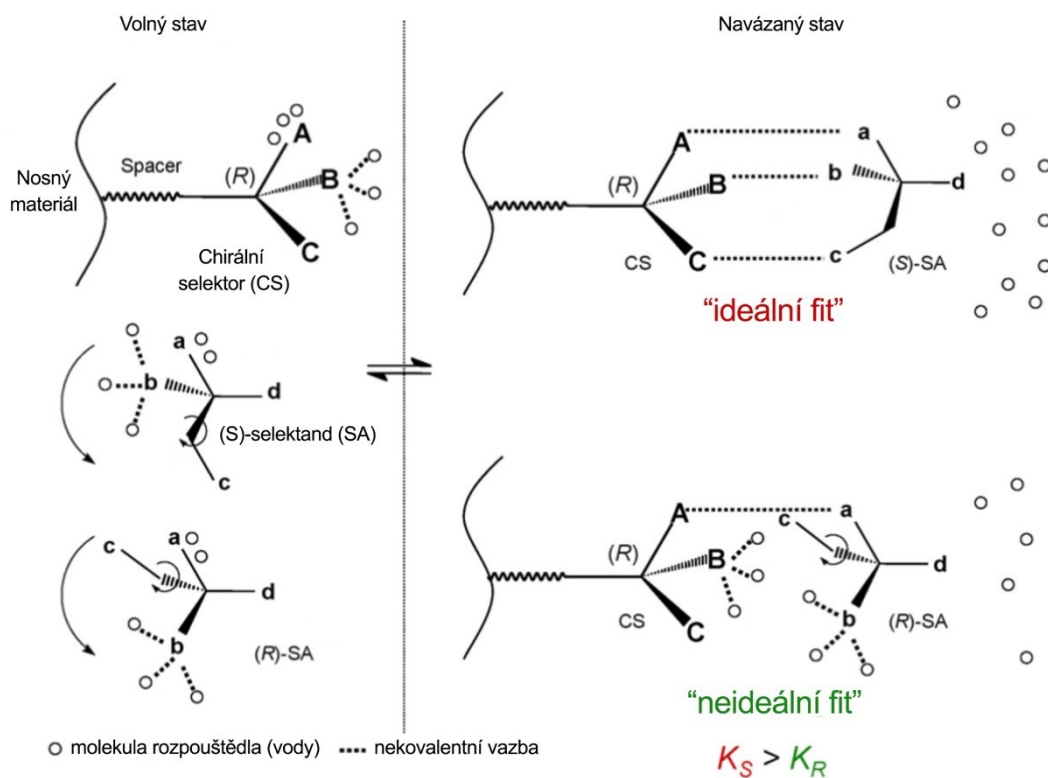
Přímé metody enantioseparace jsou dvě. Zprv, problém chirální separace může být vyřešen na konvenční achirální SF přidáním vhodného chirálního selektoru (např. chirálního crown-etheru) do MF<sup>32</sup>. Chirální selektor je opticky aktivní látka přidávána jako aditivum, která tvoří s analyty přechodné diastereomerní páry. Tato technika však v praxi má jen okrajový význam. Mnohem důležitější je metoda spočívající ve využití chirální stacionární fáze (CSF), a právě tato metoda je používána v této práci.

V enantioseparacích založených na použití CSF je chirální selektor zakotven na stacionární fázi. Interakcí enantiomerů analytu se zakotveným chirálním selektorem dochází ke vzniku přechodných diastereomerních komplexů, které se liší svými konstanty stability, což je základem pro jejich rozdílnou retenci, a tak i separaci. Tento princip je ilustrován rovnicemi (10) a (11).



V rovnicích (10), (11) A symbolizuje analyt, S symbolizuje selektor. *R*, *S* – jsou konvenčně užívané stereodeskriptory popisující absolutní konfiguraci na stereogenních centrech. Chirální selektor v daném příkladu má konfiguraci *R*.

Pro vysvětlení molekulárního mechanismu chirálního rozpoznávání se často používá tzv. model tříbodové interakce (Obr. 8). Chirální stacionární fáze je tvořena chirálním selektorem navázaným přes spacer na silikagelové matrici. S tím, jak se přibližují enantiomery selektandu, zaujímá selektor „aktivní“ konformaci (působením určitých fyzikálně-chemických sil anebo kvůli náhodné kolizi), a kvůli specifickým prostorovým restrikcím s jedním z enantiomerů je tvořen silnější komplex („ideal fit“ na Obr. 8 pro *S*-enantiomer analytu; uplatňují se vše tři interakce), druhý enantiomer z páru je vázán slaběji („non-ideal fit“ na Obr. 8 pro *R*-enantiomer analytu), a tak  $K_S > K_R$  a vlivem rozdílné retence dochází k chromatografickému rozdělení enantiomerů<sup>33</sup>.

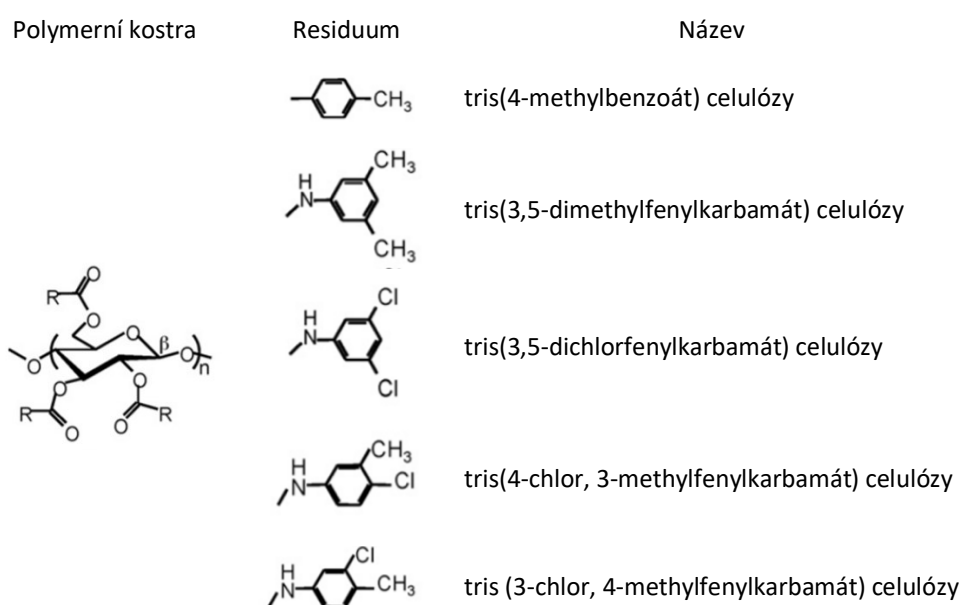


Obrázek 8. Znáznornění modelu tříbodové interakce při chirálním rozpoznávání na CSF.

Tvorba komplexů, a tedy chirální rekognice je založena pouze na nekovalentních interakcích<sup>34</sup>. Přímá enantioseparace je výhodná tím, že postup nevyžaduje předúpravu vzorku derivatizací, tedy je to z hlediska pracnosti rychlá a jednoduchá metoda. Pokud se jedná o preparativní měřítko, je možné snadno izolovat čisté enantiomery. Poměr enantiomerních forem analytu může být velice snadno zjištěn na základě vyhodnocení ploch výsledných píků na chromatogramu. Nevýhodou je však to, že kolony s CSF jsou výrazně dražší<sup>34</sup>.

Jak už bylo uvedeno výš, v současné době existuje celá řada chirálních stacionárních fází; přes dvě stě CSF jsou komerčně dostupných, včetně speciálních „tailor-made“ CSF, vyvinutých přímo pro speciální případ enantioseparace<sup>35</sup>. Podle separačního mechanismu a použitého chirálního selektoru se dají komerční CSF rozřadit do několika skupin. Nejčastěji se vyčleňují následující základní třídy: Pirklovy CSF (fungují na základě donor-akceptorových interakcí), proteinové CSF, CSF na bázi helikálních polymerů (polysacharidové CSF, ale taky některé syntetické polymery), CSF s makrocyclickými selektory (do této skupiny spadají cyclodextrinové CSF a CSF na bázi makrocyclických antibiotik), iontově a ligandově výměnné CSF (souhrnně se taky jmenují nízkomolekulární CSF)<sup>33</sup>. V rámci dané práce se pracuje s kolonou Chiralpak IB-U, která je příkladem UHPLC kolony s chirální stacionární fází na bázi celulózy.

Polysacharidové chirální stacionární fáze mají v enantioselektivní kapalinové chromatografii dlouhou tradici. Polysacharidy (jako jsou celulóza, inulin, dextran, amylóza, chitosan a další) jsou přirozeně se vyskytující polymery. Celulóza je krystalický polymer složený z  $\beta$ -D-1,4-glukopyranosových zbytků, které vytváří polymerní řetězce s helikální (šroubovicovou) strukturou. Vhodná derivatizace polymeru, která spočívá v navázání aromatických substituentů na volné hydroxylové skupiny polymerní kostry esterovou nebo karbamátovou vazbou, poskytuje rozmanité v praxi používané CSF. Takto derivatizované polymery se vyznačují rozličnou selektivitou pro různé analyty (podle konkrétní použité modifikace). Některé konkrétní příklady CSF na bázi celulózy jsou znázorněny na Obrázku 9.



Obrázek 9. Struktura vybraných chirálních selektorů v CSF-HPLC na bázi celulózy.

Pro molekulární mechanismus chirálního rozpoznávání na (fenyl)karbamátových polysacharidových SF (případ relevantní pro tuto studii) jsou obzvlášť důležité H-vazby a dipól-dipólové interakce zprostředkované polární karbamátovou skupinou. Pro systémy s obrácenými fázemi (RP-HPLC) jsou důležité taky  $\pi$ - $\pi$  interakce mezi fenylovými skupinami selektoru CSF a aromatickými jádry analytů. Povaha substituentů na benzenových jádrech (fenyl)karbamátových selektorů ovlivňuje polaritu karbamátových zbytků, a tedy má vliv na selektivitu a rozlišovací schopnost systémů<sup>36</sup>.

Polysacharidové CSF jsou populární volbou pro různé účely enantioseparací; jsou relativně dostupné z hlediska finančních nákladů, jsou kompatibilní s dostatečným rozsahem mobilních fází a vykazují dobré chirální rozpoznávací vlastnosti<sup>30, 35, 36</sup>.

V rámci této bakalářské práce se pracovalo s kolonou CHIRALPAK IB-U, jejíž podrobný popis je uveden v kapitole 2.2 Instrumentace. Jedná se o UHPLC systém s chirálním selektorem *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátem) celulózy (viz Kapitola 3.3 Tab.5).

## 2. Experimentální část

### 2.1 Chemikálie

Byl použit acetonitril (Chromasolv, gradient grade  $\geq 99,9\%$ ) a Methanol (Chromasolv, gradient grade  $\geq 99,9\%$ ), které oboje byly koupeny od prodejce Sigma-Aldrich se sídlem v USA. Deionizovaná voda byla zakoupená od LiChrosolv (Německo). Jednotlivé kapalné krystaly (dle struktur viz Příloha 1) byly k dispozici jako racemická směs (R, S) a S enantiomer. Látky odvozené od 2-oktanolu byly syntetizovány na Wojskove Akademii Techniczne, látky odvozené od kyseliny mléčné a Z12/\* byly syntetizovány na Fyzikálním Ústavu Akademie Věd ČR.

### 2.2 Instrumentace

Přístroj Acquity H-Class UHPLC® byl dodán společností Waters Corporation (Milford, USA). Přístroj se skládá z kvartérního čerpadla, autosampleru, detektoru s diodovým polem (PDA) a kolonového termostatu. Chromatografický software Waters® Empower 3™ byl použit pro zpracování a vyhodnocení dat.

Byla použita kolona CHIRALPAK® IB-U, s chirálním selektorem tris(3,5-dimethylphenylkarbamátu) celulózy kovalentně imobilizovaném na silikagelu, která byla zakoupena od firmy Daicel Corporation (Japonsko). Struktura chirálního selektoru kolony je znázorněna na obrázku v Tab.5, kapitola 3.3. Rozměry kolony jsou 100 x 3,0 mm, velikost částic 1,6  $\mu\text{m}$ . Objem dávkovaného vzorku byl 1  $\mu\text{l}$ . Chromatogramy byly zaznamenány při vlnových délkách 276 nm, 298 nm, 303 nm, 366 nm odpovídající absorpčnímu maximu jednotlivých látek.

### 2.3 Metodika práce

Nařezávání vzorků probíhalo pomocí analytických vah s přesností na pět platných číslic. Látky byly rozpuštěné v čistém acetonitrilu a výsledná koncentrace byla 0,2 mg/ml pro látky odvozené od 2-oktanolu a 0,05 mg/ml pro látky odvozené od kyseliny mléčné (a látku Z 12/\*). Separace enantiomerů obsažených v racemické směsi se prováděla na UHPLC systému. Nejdříve byly optimalizovány podmínky pro enantioseparaci. Optimální podmínky činily 40 °C pro teplotu kolony a 0,2 ml·min<sup>-1</sup> jako rychlost průtoku mobilní fáze. Poté byl proveden screening všech kapalně krystalických látek v různých MF. Použité MF byly 90/10 (v/v)

acetonitril/voda, 80/20 (v/v) acetonitril/voda, 100 % acetonitril, 100 % methanol, 100 % ethanol, 20/80 (v/v) acetonitril/ methanol. Složení mobilní fáze je vždy uváděno ve formě objemových procent.

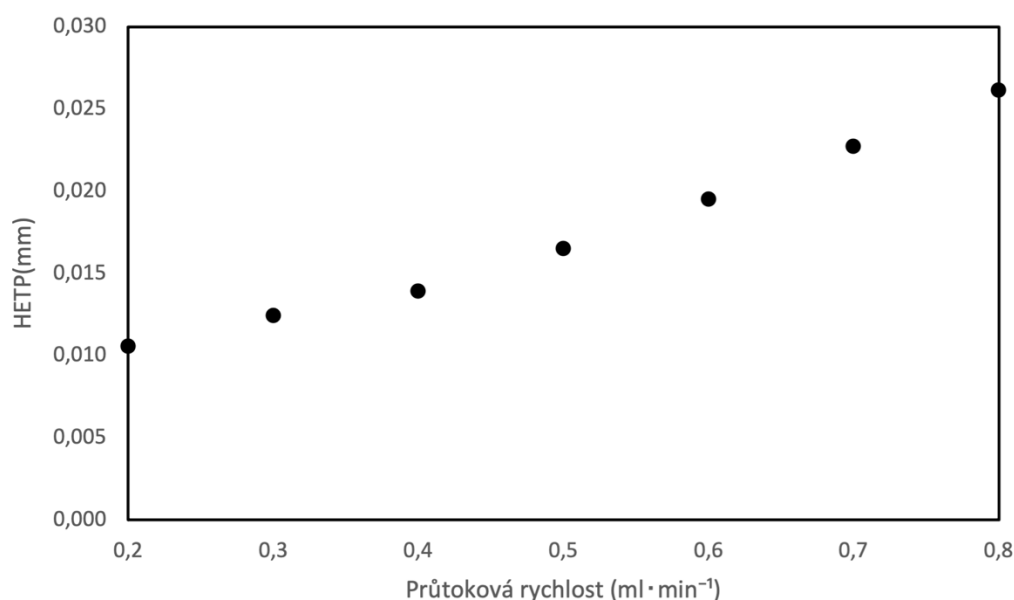
## 3. Výsledky a diskuze

### 3.1 Optimalizace podmínek pro enantioseparaci

Pro účely minimálního rozšiřování zón analytů, a tedy největší účinnosti kolony je třeba zvolit optimální průtokovou rychlost. Během studií enantioseparace kapalných krystalů s centrem chiraloty na bázi kyseliny mléčné bylo zjištěno, že nízké průtokové rychlosti odpovídaly účinnější enantioseparaci<sup>4</sup>. Teplota má vliv na termodynamický i kinetický aspekt chromatografického procesu, a proto byl vyzkoušen i vliv teploty.

#### 3.1.1 Optimalizace průtoku

Optimalizace průtoku se prováděla za podmínek konstantní teploty (40 °C) pro vzorek ZL12/10 (racemát), který patří do skupiny kapalných krystalu, jejichž centrum chiraloty je odvozeno od kyseliny mléčné. Rychlost průtoku se zkoumala v rozsahu doporučeném výrobcem pro tuto kolonu, a to mezi 0,2 a 0,8 ml·min<sup>-1</sup> v intervalu 0,1 ml·min<sup>-1</sup>. Složení mobilní fáze bylo zvolené na 15 % acetonitrilu a 85 % methanolu. Závislost HETP na průtokové rychlosti je zobrazená na Obrázku 10.



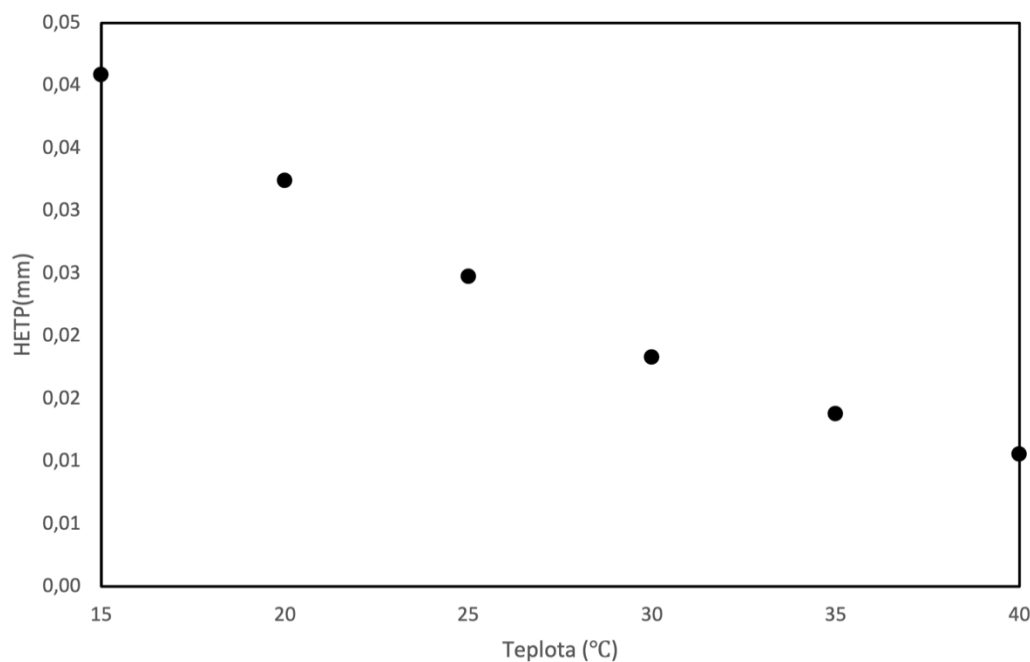
Obrázek 10. Závislost výšky teoretického patra HETP na průtokové rychlosti MF pro vzorek ZL 12/10 při teplotě 40 °C, MF o složení 15 % acetonitrilu a 85 % methanolu.

Z Obr. 10 je vidět jasný trend, že účinnost kolony významně klesá se vzrůstající rychlostí průtoku. Nejnižší hodnotě výšky teoretického patra, a tedy nejvyšší účinnosti odpovídá jediná hodnota rychlosti průtoku  $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Ve srovnání s grafem zobrazujícím běžnou závislost HETP na průtoku pomocí Van Deemterové rovnice, tak pozorujeme, že obvykle existuje rozsah hodnot průtokové rychlosti, které můžeme zvolit, aniž by došlo ke snížení účinnosti kolony, tyto hodnoty odpovídají minimální výšce teoretického patra. V našem případě vidíme jenom jednu odpovídající hodnotu  $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , která byla zvolena pro všechna další měření.

### 3.1.2 Optimalizace teploty

Obecně, zvýšení teploty systému v UHPLC vede k tomu, že se zkracuje doba analýzy a proces separace je účinnější<sup>37</sup>. V termodynamickém kontextu zvýšení teploty vede ke zkrácení doby analýzy a snížení kapacitního poměru. Kinetickým aspektem tohoto děje je zvýšení účinnosti kolony. Zvýšená teplota též ovlivňuje viskozitu mobilní fáze, a tím je dáno snížení tlaku na koloně. Z výše uvedených důvodů je patrné, že optimalizace teploty je nutná a důležitá pro účinnou separaci. Během chirálních separací s polysacharidovými stacionárními fázemi může kvůli změně teploty docházet ke konformační změně hlavního polysacharidového řetězce. Tento děj se může projevit změnou enantioselektivity, která někdy vede až ke změně pořadí eluce enantiomerů. Z těchto příčin nelze předem odhadnout, zda bude pro enantioseparace vhodnější nižší či vyšší teplota – závislost enantioselektivity na teplotě může být vzestupná i sestupná anebo se s teplotou neměnit.

Závislost účinnosti kolony na teplotě byla měřena v rozsahu teplot, které činily 15 až 40 °C s intervalem 5 °C pro látku ZL12/10 při průtokové rychlosti stanovené v předchozím kroku na  $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Maximum teplotního intervalu měření je dáno rozsahem teplot doporučeným výrobcem kolony (0–40 °C). Minimální teplota 15 °C byla zvolena s ohledem na značné prodlužování retence a snižování účinnosti při použití nižších teplot. Teplotní závislost je zobrazená na Obr. 11.



Obrázek 11. Závislost HETP na teplotě pro vzorek ZL 12/10, MF o složení 15/85 (v/v) acetonitril/methanol, průtoková rychlost  $0,2 \text{ ml min}^{-1}$

Z grafu na Obr. 11 je vidět, že teplota  $40 \text{ °C}$  odpovídá největší účinnosti kolony (nejnižší HETP). Počet teoretických pater pro vzorek ZL 12/10 při teplotě  $40 \text{ °C}$  činí 9498, při  $15 \text{ °C}$  2448, což znamená, že zvýšení teploty z  $15 \text{ °C}$  do  $40 \text{ °C}$  vede k 3,9krát zvýšení účinnosti kolony.

Změna enantioselektivity na teplotě byla také pozorována. Změny hodnot enantioselektivity s teplotou se pochybovaly v řádu jednotek procent, což znamená, že vliv teploty na enantioselektivitu je v daném případě malý. Z toho důvodu se faktor enantioselektivity při výběru optimální teploty se neuvažoval, a tato teplota byla vybrána podle největší účinnosti kolony. Optimální teplota tak byla stanovená na  $40 \text{ °C}$ .

### 3.2 Vliv složení mobilní fáze na enantioseparaci

Složení mobilní fáze má vliv na účinnost separace, kapacitní, retenční poměr, rozlišení, dobu analýzy a selektivitu, a proto je nepostradatelnou částí vývoje a optimalizace metody enantioseparace.

Separace se prováděla v reverzním modu (RP-HPLC), tj. SF je méně polární než MF, tento mód se přednostně využívá pro nepolární analyty.

Acetonitril a methanol jsou nejvíce používána rozpouštědla pro RP-HPLC. Pro první experimentální složení MF byl zvolen čistý acetonitril z důvodu své nízké viskozity (což

snižuje tlak v systému) ve srovnání s methanolem a vhodnosti pro rozpouštění hydrofobních analytů. Přidání vody do acetonitrilu snižuje eluční sílu MF a prodlužuje retenci analytu skrze zesílení hydrofobních interakcí. Dalším důvodem byly výsledky předchozích studií enantioseparací kapalných krystalů s chirálním centrem na bázi 2-oktanolu, které ukázaly úspěšnou enantioseparaci kapalných krystalů při tom, že mobilní fáze byla složená z acetonitrilu a vody v různých poměrech<sup>4</sup>. Výsledky enantioseparace pro všechny vzorky se složením MF acetonitril/voda v různých poměrech (voda 0%, 10%, 20%) jsou uvedené v Tabulce 1.

Tabulka 1. Hodnoty enantioselektivity pro všechny zkoumané vzorky v závislosti na poměru vody a acetonitrilu v MF

%vody/ název vzorku	0 %	10 %	20 %
2HH	1,000	1,000	1,029
5HF	1,000	1,000	1,032
5FF	1,000	1,000	1,033
7HH	1,000	1,000	1,027
5HH	1,000	1,000	1,028
5FH	1,000	1,000	1,026
MDA 6/6	1,000	1,000	1,000
MDA 10/6	1,000	1,000	1,000
MDA 10/10	1,000	1,000	1,000
MDA 6/10	1,000	1,000	1,000
ZL 12/10	1,000	1,000	1,000
BCL 6/10	1,000	1,000	1,000
10ZBBL	1,000	1,000	1,000
10ZBDL	1,000	1,000	1,000
12PHB AL	1,000	1,000	1,000
Z12/*	1,000	1,000	1,000

Výsledky ukazují, že enantioselektivita je nejvyšší pro MF o složení 20/80 (v/v) voda/acetonitril, a platí to pro skupinu kapalných krystalů s centrem chiralita na bázi 2-oktanolu. Ostatní vzorky se neseperoaly. I přestože výsledky enantioseparace pro vzorky první skupiny kapalných krystalů ukazují hodnoty selektivity větší než jedna, stejně nelze tyto výsledky považovat za úspěšné, protože došlo pouze k částečné enantioseparaci a hodnoty rozlišení byly velmi nízké; u některých látek nebylo ani možné rozlišení spočítat. Z těchto důvodů bylo rozhodnuto o změně hlavní složky MF z acetonitrilu na další organické široce používané a dostupné rozpouštědlo methanol.

Rozpouštědla, která tvoří MF se dají rozdělit do určitých skupin, podle jejich vlastností (kyselá, bazická, bipolární povaha látky a polarita), což bylo předloženo ve studii L. R. Snydera, který v roce 1993 publikoval svoji klasifikaci rozpouštědel pro kapalinovou chromatografii<sup>38</sup>. Z této studie vychází index polarity (P'), který určuje polaritu rozpouštědla (rozpouštědlo je tím polárnější, čím větší je jeho hodnota). Hodnoty pro rozpouštědla využívána v této práci jsou představeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Hodnoty indexu polarity pro vybrané rozpouštědla

Rozpouštědlo	Index Polarity (P')
voda	10,2
acetonitril	5,8
methanol	5,1
ethanol	4,3

Je vidět, že nejvyšší polaritu má voda, pak následuje acetonitril, nejmenší polaritu má ethanol. Následující experimenty byly provedené se změnou hlavní složky MF z acetonitrilu na methanol. Výsledky enantioseparace s použitím MF o složení 20/80 (v/v) acetonitril/methanol a čistý 100 % methanol jsou zobrazené v Tabulce 3.

Tabulka 3. Výsledky enantioseparace všech zkoumaných vzorků s MF o složení 20/80 (v/v) acetonitril/methanol a čistý 100% methanol.  $t_{r,S}$ ,  $t_{r,R}$  retenční časy S a R enantiomeru,  $R_s$  rozlišení. \* znamená velmi dlouhý retenční čas (větší než 60 min). Pokud alespoň první enantiomer neeluoval do 60 minut, byla analýza ukončena bez získání výsledků.

	20/80 (v/v) acetonitril/methanol			methanol 100 %		
	$R_s$	$t_{r,S}/min$	$t_{r,R}/min$	$R_s$	$t_{r,S}/min$	$t_{r,R}/min$
ZL 12/10	2,75	8,65	9,55	6,68	47,5	63,4
BCI 6/10	1,46	5,49	5,76	3,85	11,5	13,2
10ZBBL	6,94	11,0	14,4	*		
10ZBDL	11,4	16,4	25,6	*		
12PHB AL	-	3,83	3,89	1,63	5,87	6,24
Z12/*	-		6,68	1,37	20,3	21,4
MDA 6/6	-	4,99	5,08	1,83	9,86	10,5
MDA 10/6	-	5,60	5,71	1,59	12,1	12,9
MDA 10/10	-	6,28	6,53	2,59	14,9	16,4
MDA 6/10	-		3,73	2,87	11,7	13,0
2HH			3,45	0,54	5,02	4,87
5HF	-		3,53	0,90	5,61	5,38
5FF	-		3,68	0,77	5,45	5,26
7HH	-		4,17	1,78	10,3	9,51
5HH	-		3,79	1,20	7,21	6,83
5FH	-		3,68	0,62	5,76	5,57

Z výsledků je vidět, že nejlepší enantioseparace (hodnoty  $R_s$  0,9 až 1,78) skupiny kapalných krystalů s centrem chiralitity na bázi 2-oktanolu bylo dosaženo v MF složené ze 100 % methanolu. Skupina kapalných krystalů s centrem chiralitity na bázi kyseliny mléčné byla nejlépe separovaná ( $R_s$  1,46 až 11,38) v MF o složení 20/80 (v/v) acetonitril/methanol. Je také vidět, že hodnoty retenčního času analytů jsou relativně velké, a tedy proces separace je zdoluhavý a že se záměnou methanolu za acetonitril jako MF se retence značně (až 5,5krát) zvýšila.

Dále byl vyzkoušen ještě 100% ethanol jako MF. Ethanol je ve srovnání s methanolem méně polární. Výsledky enantioseparace jsou představené v Tabulce 4.

Tabulka 4. Výsledky enantioseparace všech zkoumaných vzorků s MF o složení 100% ethanol.  $t_{r,S}$ ,  $t_{r,R}$  retenční časy S a R enantiomeru,  $R_s$  rozlišení.

	$t_{r,S}/min$	$t_{r,R}/min$	$\alpha$	$R_s$
ZL 12/10	10,6	13,5	1,35	3,82
BCI 6/10	5,60	6,12	1,16	1,55
10ZBBL	22,5	36,8	1,71	7,10
10ZBDL	29,6	56,9	2,00	8,86
12PHB AL	3,84	3,96	1,09	-
Z12/*		7,51	1,00	-
MDA 6/6	5,55	5,76	1,07	-
MDA 10/6	5,78	5,97	1,06	-
MDA 10/10	6,04	6,46	1,11	1,03
MDA 6/10	5,75	6,16	1,12	1,06
2HH		3,85	1,00	-
5HF		3,81	1,00	-
5FF		3,95	1,00	-
7HH		4,68	1,00	-
5HH		4,15	1,00	-
5FH		3,89	1,00	-

Výsledky enantioseparace v MF o složení 100% ethanol ukazují snížení hodnot enantioselektivity a rozlišení oproti hodnotám získaným ve 100 % methanolu. Ve srovnání s výsledky enantioseparace s hlavní složkou MF acetonitrilem, enantioseparace v 100 % ethanolu ukazuje lepší selektivitu a rozlišení.

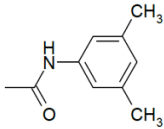
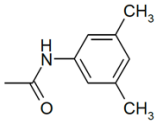
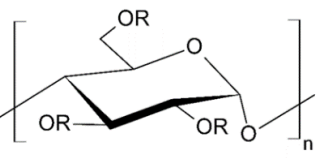
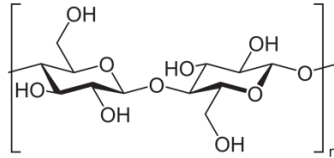
### 3.3 Vliv stacionární fáze na enantioseparaci

Stacionární fáze významně ovlivňuje enantioselektivitu a její výběr má klíčovou roli pro úspěšnou enantioseparaci. I přestože že na trhu je představen velký výběr CSP predikce pro separace dané určité látky je téměř nemožná z důvodu komplexity celého děje enantioseparace a vlivu ze strany složení MF, chromatografických podmínek, struktury analytu. Z toho důvodu studium vlivu SF na chirální separace je předmětem zájmu této práce.

#### Porovnání účinnosti kolon Chiralpak IB-U a Chiralpak IA-U

Na základě výsledku zpracovaných P. Vaňkátovou et al. <sup>4</sup> bylo provedeno porovnání účinnosti kolon Chiralpak IB-U na bázi celulózy a Chiralpak IA-U na bázi amylozy (liší se pouze polymerní kostrou chirálního selektoru), která se využívala pro enantioseparace kapalných krystalů s chirálním centrem na bázi 2-oktanolu a kyseliny mléčné. Porovnání struktur obou kolon je představeno v Tabulce 5.

Tabulka 5. Porovnání struktur chirálních selektorů dvou kolon Chiralpak IA-U a Chiralpak IB-U

kolona	Chiralpak IA-U	Chiralpak IB-U
Chirální selektor	tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylózy	tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulózy
Struktura chirálního selektoru		
Polymerní kostra	amylóza 	celulóza 

Při porovnání výsledku enantioseparace (Tab. 6) s použitím kolony Chiralpak IB-U s kolonou Chiralpak IA-U, je vidět, že pro stejnou skupinu vzorků změna kolony Chiralpak IA-U na Chiralpak IB-U (tj. změna báze chirálního selektoru polysacharidové CSP z amylózy na celulózu) způsobila velkou změnu enantioseparace.

Pokud se podíváme na hodnoty enantioseparace pro skupinu LCs s centrem chiralitity na bázi kyseliny mléčné, tak v čistém acetonitrilu nebyla žádná látka separována na základní linii při použití kolony Chiralpak IB-U. Naopak u kolony Chiralpak IA-U, u které hodnoty enantioselektivity jsou větší než 1,13 pro každou látku, byly LCs této skupiny úspěšně separovány. MF o složení 90/10 (v/v) acetonitril/voda ukazuje obdobné výsledky, a to žádná rozseparovaná látka u kolony Chiralpak IB-U oproti třem z pěti stanovených hodnot enantioselektivity ( $\alpha > 1,48$ ) u kolony Chiralpak IA-U. Výsledky enantioseparace při složení MF z čistého ethanolu ukazují, že enantioseparace pro tuto skupinu LCs proběhla lépe (hodnoty enantioselektivity jsou vyšší) u kolony Chiralpak IB-U. Celá skupina LCs s centrem chiralitity na bázi 2-oktanolu byla lépe separována s použitím kolony Chiralpak IA-U.

Pro shrnutí kolona Chiralpak IA-U vykazuje vyšší hodnoty enantioseparace pro obě skupiny LCs se složením MF z 100 % acetonitrilu, 90/10 (v/v) acetonitril/voda i 100 % methanolu, než kolona Chiralpak IB-U. Kolona Chiralpak IB-U vykazuje vyšší enantioselektivitu jenom

v případě složení MF z 100 % ethanolu a pro skupinu LC s centrem chiralitity na bázi kyseliny mléčné.

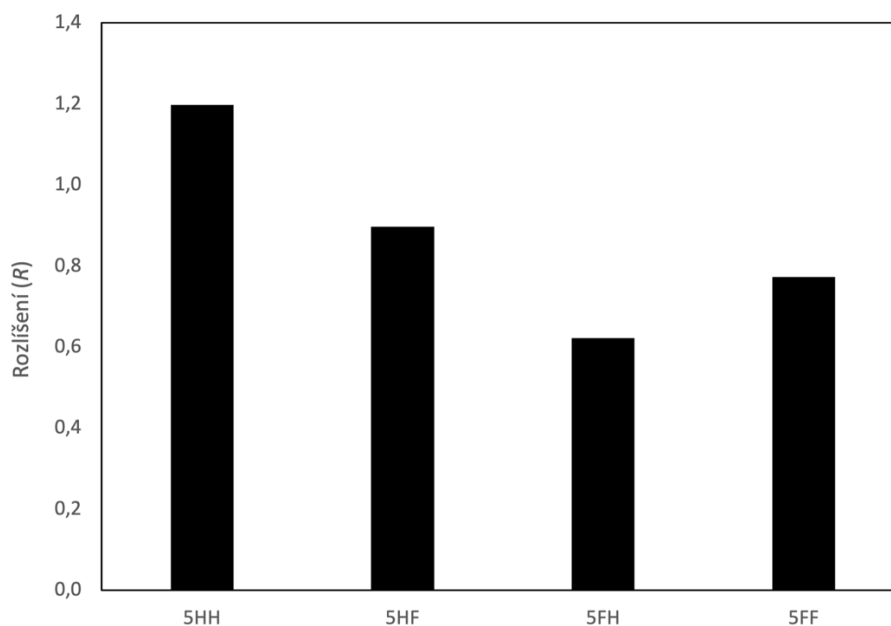
Tabulka 6. Porovnání hodnot enantioselektivity pro dva typy chromatografických kolon: Chiralpak IA-U (tris(3,5-dimethylfenyl)karbamát) amylozy), Chiralpak IB-U (tris(3,5-dimethylfenyl)karbamát) celulózy) za stejných podmínek (teplota 40 °C, průtoková rychlost 0,2 ml·min<sup>-1</sup>) a o stejném složení MF (100 % acetonitril a 90/10 (v/v) acetonitril/voda).

	IB-U			
	Methanol 100 %	Ethanol 100 %	Acetonitril 100 %	Acetonitril/voda 90/10 (v/v)
ZL 12/10	1,35	1,35	1,00	1,00
BCI 6/10	1,19	1,16	1,00	1,00
10ZBBL	*	1,71	1,00	1,00
10ZBDL	*	2,00	1,00	1,00
12PHB AL	1,11	1,09	1,00	1,00
2HH	1,06	1,00	1,00	1,00
5FF	1,07	1,00	1,00	1,00
7HH	1,12	1,00	1,00	1,00
5HH	1,09	1,00	1,00	1,00
5FH	1,06	1,00	1,00	1,00
	IA-U			
	Methanol 100 %	Ethanol 100 %	Acetonitril 100 %	Acetonitril/voda 90/10 (v/v)
ZL 12/10	nejsou data	1,25	1,41	1,00
BCI 6/10	nejsou data	1,41	1,13	1,48
10ZBBL	nejsou data	1,32	1,19	1,73
10ZBDL	nejsou data	1,49	1,34	1,00
12PHB AL	nejsou data	1,26	1,28	1,73
2HH	3,04	1,12	1,15	1,39
5FF	2,02	1,13	1,17	1,35
7HH	4,49	1,09	1,35	1,93
5HH	4,66	1,12	1,34	1,83
5FH	2,60	1,14	1,31	1,55

## 3.4 Vliv struktury kapalných krystalů s centrem chiralita na bázi 2-oktanolu na enantioseparaci

### 3.4.1 Vliv přítomnosti fluoru na benzenovém jádře na enantioseparaci

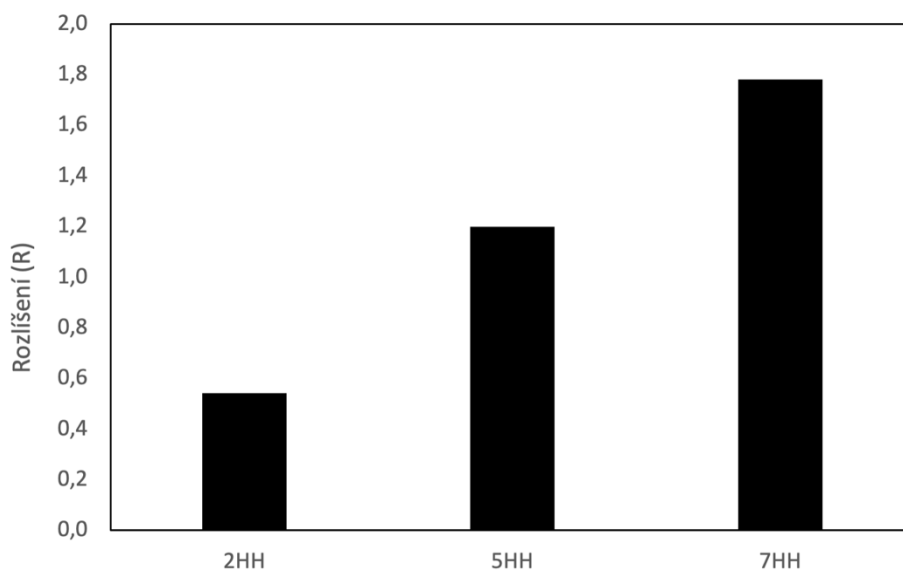
Některé molekuly (5HF, 5FF, 5FH) ze skupiny kapalných krystalů s centrem chiralita na bázi 2-oktanolu mají na benzenovém jádře přítomen atom fluoru (viz Příloha 1). Laterální substituce fluorem má vliv na krystalické vlastnosti kapalných krystalů a také na jejich chromatografické chování. Molekula látky 5HF se liší od 5FH pozicí jednoho atomu fluoru ( $X_1$  pozice – 5FH,  $X_2$  pozice – 5HF). Počet fluorových atomů je odlišný pro látky 5HF a 5FH (jeden atom fluoru) a 5FF (dva atomy fluoru). Vzorek látky 5HH není substituovaný fluorem. Všechny vzorky látek byly analyzovány za stejných podmínek, a to při teplotě 40 °C, průtokové rychlosti 0,2 ml·min<sup>-1</sup> a o stejném složení MF (100 % methanol). Enantiomery látek obsahující substituovaný fluor byly separované méně úspěšně (nižší hodnoty  $R_s$ ) oproti enantiomerům, které fluor neobsahovaly (Obr. 12). Dále je vidět, že enantiomery 5FH byly nejhůř odseparované ( $R_s = 0,62$ ) i když isomer lišící se jenom pozicí fluoru na benzenovém jádře (látky 5HF, tj.  $X_1$  oproti  $X_2$ ) během chromatografického procesu dosáhl enantioseparaci s vyšší hodnotou rozlišení ( $R_s = 0,90$ ). Enantiomery látky 5FF a 5HF dosáhly přibližně stejné hodnoty rozlišení při enantioseparaci. Z toho lze usoudit, že nejenom přítomnost fluoru ovlivňuje enantioseparaci, ale také samotná pozice fluorového atomu na benzenovém jádře má značný vliv, i když počet fluorových atomů téměř enantioseparaci neovlivňuje. Je také třeba zdůraznit, že hodnoty rozlišení dosažené při enantioseparaci vzorků obsahujících fluor nelze považovat za úplně úspěšné, jelikož nedosahují hodnot rozlišení na základní linii ( $R_s < 1,5$ ).



Obrázek 12. Vliv přítomnosti fluoru na benzenovém jádře na enantioseparaci. Hodnoty rozlišení pro skupinu kapalných krystalů s centrem chiralitity na bázi 2-oktanolu

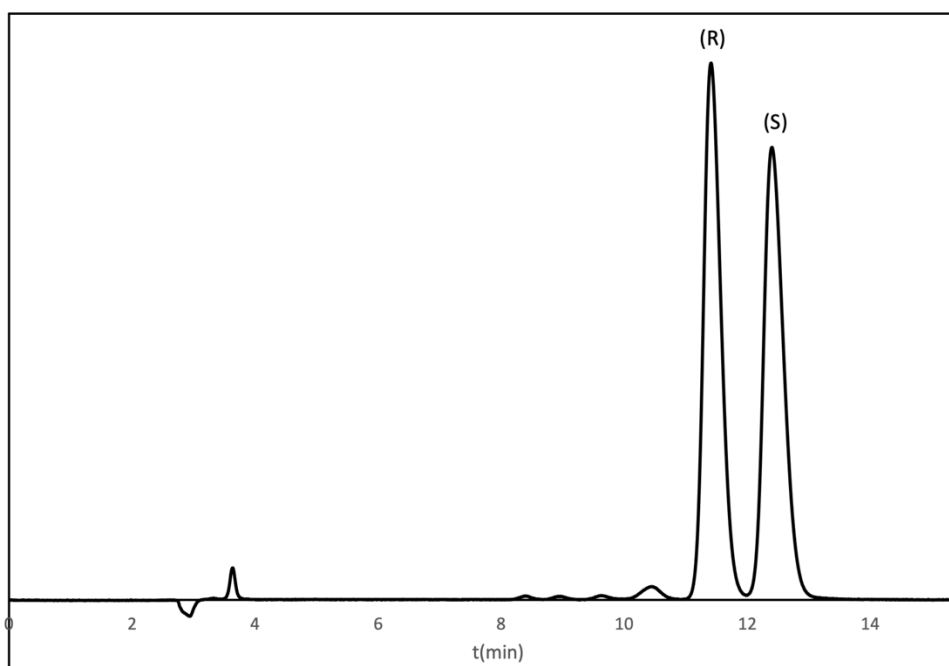
### 3.4.2 Vliv délky alkyloxylového řetězce na enantioseparaci

Vliv délky alkyloxylového řetězce na enantioseparaci byl studován s využitím vybraných enantiomerů skupiny LC s centrem chiralitity na bázi 2-oktanolu, jelikož tyto LC se liší pouze délkou alkyloxylového řetězce. Pro experimenty byly vybrány vzorky látek nesubstituovaných fluorem a to 2HH, 5HH, 7HH. Podmínky chromatografického procesu byly stejné pro všechny vzorky, teplota 40 °C, průtoková rychlost 0,2 ml·min<sup>-1</sup> a složení MF 100 % methanol. Výsledky enantioseparace zobrazené na Obr. 13. ukazují jasný trend zvýšení rozlišení se zvýšením délky alkyloxylového řetězce.



Obrázek 13. Vliv délky alkyloxylového řetězce na enantioseparaci. Hodnoty rozlišení pro skupinu kapalných krystalů s centrem chiralitu na bázi 2-oktanolu, které se liší jenom délkou alkyloxylového řetězce.

Nejvyššího rozlišení dosáhla enantioseparace vzorku 7HH - 1,78, což odpovídá separaci na základní linii ( $R_s > 1,5$ ). Na obr. 14 je zobrazen chromatogram enantioseparace vzorku 7HH.



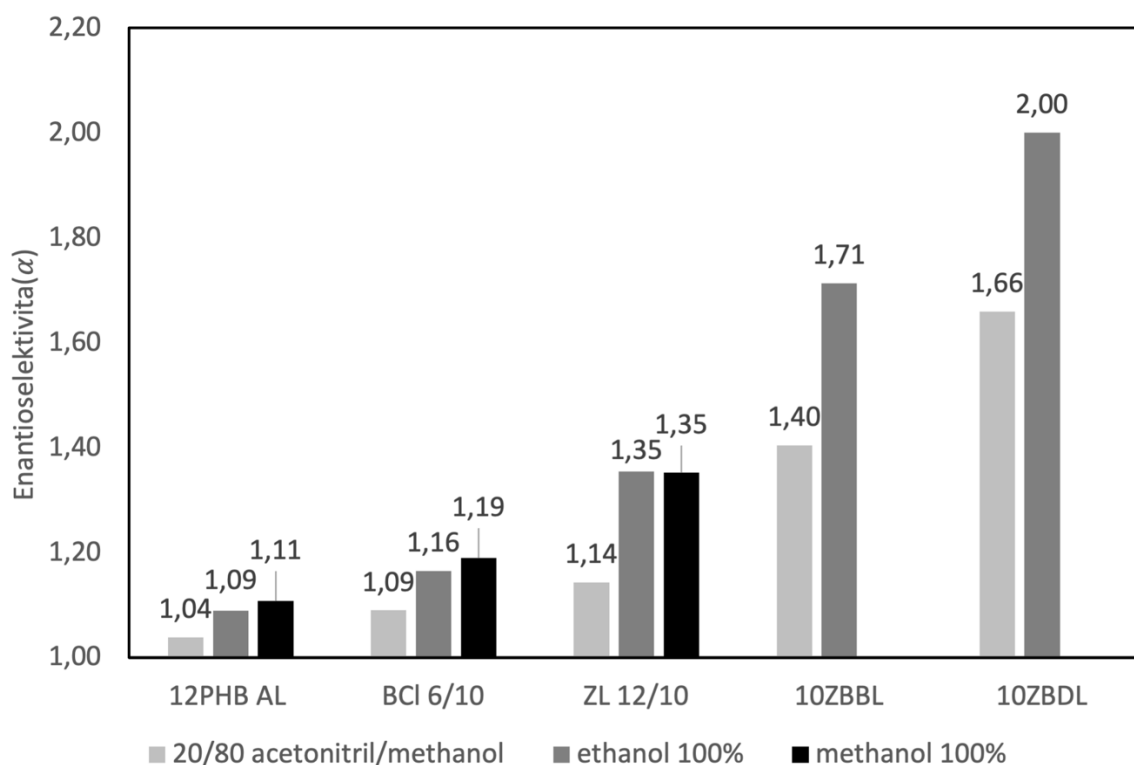
Obrázek 14. Časová závislost chromatografického separačního procesu (chromatogram) pro enantiomery vzorku 7HH. Měřeno za optimálních podmínek v mobilní fázi 100% methanol.

### 3.5 Vliv struktury kapalných krystalů s centrem chiralidy na bázi kyseliny mléčné na enantioseparaci

První podskupinu LCs s centrem chiralidy na bázi kyseliny mléčné tvoří látky 12PHB<sup>2</sup> AL, BCL 6/10, ZL 12/10, 10ZBBL, 10ZBDL a Z 12/\* (viz Příloha 1).

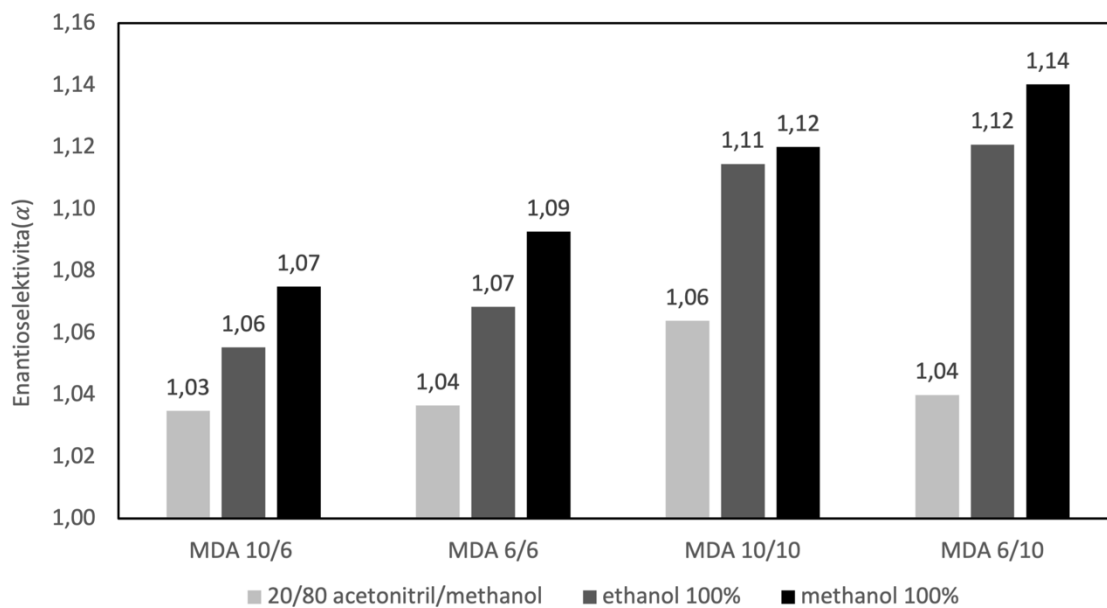
Studované LCs s centrem chiralidy na bázi kyseliny mléčné se liší přítomností atomu chloru na benzenovém jádře, délkou proximálního a/nebo distálního alkylového řetězce (vůči středu chiralidy) a počtem benzenových kruhů. Hlavní rozdíl v enantioseparaci je způsoben přítomností atomu chloru, vliv má taky počet aromatických jader ve struktuře kapalných krystalů, jak je vidět z Obrázku 15. Chlor-substituované LCs a taky LCs s vyšším počtem aromatických jader vykazují vyšší hodnoty enantioselektivity. Odchytku od tohoto trendu vykazuje pár analytů BCL 6/10 a ZL 12/10. Toto je pravděpodobně dáno rozdílem v délce distálního alkylového řetězce, který je delší (C12) u nechlorovaného analytu ZL 12/10 (oproti C6 u látky BCL 6/10). Delší alkylové řetězce v distálních a proximálních polohách pravděpodobně korespondují se zvýšenou enantioselektivitou. Pro spolehlivé potvrzení tohoto trendu by však bylo nutné posuzovat větší soubor LCs lišících se vždy pouze v jednom ze sledovaných parametrů.

Pro všechny LCs z této skupiny platí, že delší retenční časy a větší enantioselektivitu vykazují v MF složené ze 100 % ethanolu.



Obrázek 15. Enantioselektivita separace kapalných krystalů skupiny s centrem chiralitity na bázi kyseliny mléčné pro tři MF (20/80(v/v) acetonitril /methanol, čistý 100 % ethanol, čistý 100 % methanol). Měřeno za optimálních podmínek. Uvedeny jsou hodnoty enantioselektivity pouze pro LCs, u kterých bylo dosaženo alespoň částečné separace, a proto vzorek Z 12/\* není do výsledků zahrnut, ze stejného důvodu nejsou uvedené hodnoty enantioselektivity pro vzorky 10ZBBL a 10ZBDL v 100 % methanolu.

Druhou podskupinu studovaných LCs s centrem chiralitity na bázi kyseliny mléčné tvoří látky obsahující azoskupinu, tedy MDA 6/6, MDA 10/10, MDA 6/10, MDA 10/6 (viz. Příloha 1). Tyto látky se liší pouze délkou proximálního a/nebo distálního alkyloxylového řetězce (vůči středu chiralitity). Na Obrázku 16 jsou sloupcové grafy, které znázorňují dosaženou enantioselektivitu pro každou látku v podskupině pro tři použité MF. Je vidět, že v čistých alkoholech jako MF (methanol, ethanol) se analyty této skupiny chovají podobným způsobem (nárůst hodnot enantioselektivity). V MF 20/80 acetonitril/methanol je pořadí zvýšení enantioselektivity odlišné. V této podskupině LCs na bázi laktátů ze získaných dat není možné jednoznačně vyvodit vliv délky proximálních a/nebo distálních alkyloxylových řetězců na enantio enantioselektivitu. Retenční časy jednotlivých enantiomerů na rozdíl od enantioselektivity rostou dle očekávání v pořadí MDA6/6 <MDA6/10 ~ MDA10/6 <MDA 10/10.



Obrázek 16. Enantioselektivita separace kapalných krystalů skupiny s centrem chiralita na bázi kyseliny mléčné pro tři mobilní fáze (20/80 (v/v) acetonitril/methanol, čistý 100% ethanol, čistý 100% methanol). Měřeno za optimálních podmínek.

## 4. Závěr

V rámci dané bakalářské práce byla prostudována chirální separace dvou typů kapalných krystalů za využití UHPLC s reverzními fázemi, na koloně Chiralpak IB-U obsahující tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulózy jako chirální selektor. Pro chirální separace byla provedena optimalizace chromatografických podmínek t.j teploty a rychlosti průtoku MF. Jako MF pro tuto studii byl použit acetonitril, methanol, ethanol a deionizována voda v různých poměrech. Všechny enantiomery studovaných kapalných krystalů se na koloně Chiralpak IB-U nepodařilo rozdělit, pro skupinu kapalných krystalů s centrem chiralita na bázi 2-oktanolu se nepodařilo dosáhnout ani rozlišení na základní linii, enantiomery druhé skupiny kapalných krystalů s centrem chiralita na bázi kyseliny mléčné byly nejlépe rozseparovány v čistém 100 % methanolu a 20/80 (v/v) acetonitril/methanol jako MF. Pro tuto skupinu látek byly získány vysoké hodnoty rozlišení a enantioselektivity (pro racemát 10ZBDL  $R_s = 11,38$  a  $\alpha = 1,66$  v MF 20/80 (v/v) acetonitril/methanol), což dělá RP-UHPLC zajímavé z hlediska separace kapalných krystalů a prokazuje velký potenciál této metody. Byl prokázán významný vliv struktury kapalných krystalů (přítomnost atomu fluoru na benzenovém jádře a délka alkyloxylového řetězce) na enantioseparaci. Jedinou nevýhodou studované metody se jeví dlouhé retenční časy analytů, které mohou přesahovat 60 min.

Výsledky této práce byly porovnané s výsledky práce P. Vaňkátové et al. <sup>4</sup> a tím se podařilo diskutovat vliv SF, které se liší pouze bázi chirálního selektoru (derivatizovaná celulóza u kolony Chiralpak IB-U oproti derivatizované amyloze u kolony Chiralpak IA-U), na enantioseparaci. Při porovnání za stejných chromatografických podmínek kolona Chiralpak IB-U vykazala vyšší enantioselektivitu pro skupinu kapalných krystalů s centrem chiralita na bázi kyseliny mléčné v 100 % ethanolu jako MF, když kolona Chiralpak IA-U ukázala lepší enantioselektivitu ve všech použitých MF pro skupinu kapalných krystalů s centrem chiralita na bázi 2-oktanolu.

## Seznam použité literatury

- (1) The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use | Wiley <https://www.wiley.com/en-us/The+Impact+of+Stereochemistry+on+Drug+Development+and+Use-p-9780471596448> (accessed 2021 -05 -31).
- (2) Sekhon, B. Enantioseparation of Chiral Drugs - An Overview. *Int. J. PharmTech Res.* **2010**, 2, 1584–1594.
- (3) Kawamoto, H. The History of Liquid-Crystal Displays. *Proc. IEEE* **2002**, 90 (4), 460–500. <https://doi.org/10.1109/JPROC.2002.1002521>.
- (4) Vaňkátová, P.; Šrolerová, T.; Kubičková, A.; Kalíková, K. Fast UHPLC Enantioseparation of Liquid Crystalline Materials with Chiral Center Based on Octanol in Reversed-Phase and Polar Organic Mode. *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* **2020**, 151 (8), 1235–1240. <https://doi.org/10.1007/s00706-020-02622-5>.
- (5) Vojtylová, T.; Kašpar, M.; Hamplová, V.; Novotná, V.; Sýkora, D. Chiral HPLC for a Study of the Optical Purity of New Liquid Crystalline Materials Derived from Lactic Acid. *Phase Transit.* **2014**, 87 (8), 758–769. <https://doi.org/10.1080/01411594.2014.893344>.
- (6) Geelhaar, T.; Griesar, K.; Reckmann, B. 125 Years of Liquid Crystals—A Scientific Revolution in the Home. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (34), 8798–8809. <https://doi.org/10.1002/anie.201301457>.
- (7) Kratochvíl, B.; Švorčík, V.; Vojtěch, D. *Úvod Do Studia Materiálů*, Vyd. 1.; Vysoká škola chemicko-technologická [Praha]: Praha, 2005.
- (8) Singhvi, G.; Banerjee, S.; Khosa, A. Chapter 11 - Lyotropic Liquid Crystal Nanoparticles: A Novel Improved Lipidic Drug Delivery System. In *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery*; Grumezescu, A. M., Ed.; William Andrew Publishing, 2018; pp 471–517. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813663-8.00011-7>.
- (9) Andrienko, D. Introduction to Liquid Crystals. *J. Mol. Liq.* **2018**, 267, 520–541. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.175>.
- (10) Collings, P. J.; Hird, M. *Introduction to Liquid Crystals Chemistry and Physics: Chemistry and Physics*; CRC Press: London, 2017. <https://doi.org/10.1201/9781315272801>.
- (11) Dierking, I. Handbook of Liquid Crystals, Volume 1: Fundamentals of Liquid Crystals. *Liq. Cryst. Today* **2014**, 23 (4), 79–81. <https://doi.org/10.1080/1358314X.2014.945242>.
- (12) Vaňkátová, P.; Kalíková, K.; Kubičková, A. Ultra-Performance Supercritical Fluid Chromatography: A Powerful Tool for the Enantioseparation of Thermotropic Fluorinated Liquid Crystals. *Anal. Chim. Acta* **2018**, 1038, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.001>.
- (13) Urbaňská, M.; Vaňkátová, P.; Kubičková, A.; Kalíková, K. Synthesis, Characterisation and Supercritical Fluid Chromatography Enantioseparation of New Liquid Crystalline Materials. *Liq. Cryst.* **2020**, 47 (12), 1832–1843. <https://doi.org/10.1080/02678292.2020.1733684>.
- (14) Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology, 2nd Edition | Wiley <https://www.wiley.com/en-us/Fundamental+Laboratory+Approaches+for+Biochemistry+and+Biotechnology%2C+2nd+Edition-p-9780470087664> (accessed 2021 -08 -09).
- (15) F. Opekar; I. Jelínek; P. Rychlovský; Z. Plzák. *Základní analytická chemie*; Praha, 2010.
- (16) Fahr, E. Instrumental Methods of Analysis. Von H. H. Willard, L. L. Merritt, Jr. Und J. A. Dean. D. van Nostrand Company, New York-Wokingham 1974. 5. Aufl. XIX, 860 S., Zahlr. Abb., Geb. £ 8.50. *Angew. Chem.* **1976**, 88 (6), 195–196. <https://doi.org/10.1002/ange.19760880618>.

- (17) HPLC: Early and Recent Perspectives | Journal of Chemical Education <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ed074p45> (accessed 2021 -08 -09).
- (18) Sankar, R.; Snehathatha, K.; Firdose, S.; Babu, P. Applications in HPLC in Pharmaceutical Analysis. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2019**, *59*, 117–124.
- (19) Núñez, O.; Lucci, P. Application of Liquid Chromatography in Food Analysis. *Foods* **2020**, *9* (9), 1277. <https://doi.org/10.3390/foods9091277>.
- (20) Lee, W.-Y.; Salvador, J. M. ENVIRONMENTAL APPLICATIONS OF CHIRAL HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. **2000**, 10.
- (21) Alkhateeb, F. L.; Wilson, I.; Maziarz, M.; Rainville, P. Ultra High-Performance Liquid Chromatography Method Development for Separation of Formoterol, Budesonide, and Related Substances Using an Analytical Quality by Design Approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *193*, 113729. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113729>.
- (22) Guillaume, D.; Ruta, J.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. New Trends in Fast and High-Resolution Liquid Chromatography: A Critical Comparison of Existing Approaches. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397* (3), 1069–1082. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3305-8>.
- (23) Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications | Wiley <https://www.wiley.com/en-us/Ultra+High+Performance+Liquid+Chromatography+and+Its+Applications-p-9780470938423> (accessed 2021 -08 -09).
- (24) Practical HPLC Method Development, 2nd Edition | Wiley <https://www.wiley.com/en-ru/Practical+HPLC+Method+Development%2C+2nd+Edition-p-9780471007036> (accessed 2021 -08 -09).
- (25) Encyclopedia of Analytical Science - 3rd Edition <https://www.elsevier.com/books/encyclopedia-of-analytical-science/worsfold/978-0-08-101983-2> (accessed 2021 -08 -09).
- (26) Molnár, I.; Horváth, C. Reverse-Phase Chromatography of Polar Biological Substances: Separation of Catechol Compounds by High-Performance Liquid Chromatography. *Clin. Chem.* **1976**, *22* (9), 1497–1502. <https://doi.org/10.1093/clinchem/22.9.1497>.
- (27) Štulík, Karel. *Analytické separační metody*, 1st ed.; Karolinum: Praha, 2004.
- (28) Barackman, J. ACQUITY UPLC®: An Analytical Platform for Biopharmaceuticals. 76.
- (29) Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. Chiral Drugs: An Overview. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* **2006**, *2* (2), 85–100.
- (30) Heyden, Y. V.; Mangelings, D.; Matthijs, N.; Perrin, C. 18 - Chiral Separations. In *Separation Science and Technology*; Ahuja, S., Dong, M. W., Eds.; Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC; Academic Press, 2005; Vol. 6, pp 447–498. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(05\)80062-5](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(05)80062-5).
- (31) Speybrouck, D.; Lipka, E. Preparative Supercritical Fluid Chromatography: A Powerful Tool for Chiral Separations. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1467*, 33–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.050>.
- (32) Aldrich, S. HPLC Enantiomeric Separations of Pharmaceuticals Using Polar Organic Mobile Phases. 22.
- (33) Lämmerhofer, M. Chiral Recognition by Enantioselective Liquid Chromatography: Mechanisms and Modern Chiral Stationary Phases. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (6), 814–856. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.022>.
- (34) Scriba, G. K. E. Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences. *Chromatographia* **2012**, *75* (15), 815–838. <https://doi.org/10.1007/s10337-012-2261-1>.
- (35) Teixeira, J.; Tiritan, M. E.; Pinto, M. M. M.; Fernandes, C. Chiral Stationary Phases for Liquid Chromatography: Recent Developments. *Molecules* **2019**, *24* (5), 865. <https://doi.org/10.3390/molecules24050865>.
- (36) Yashima, E. Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases for High-Performance

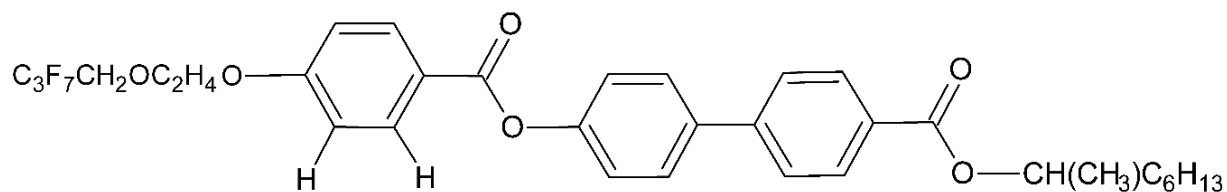
Liquid Chromatographic Enantioseparation. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906* (1), 105–125. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00501-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00501-X).

(37) Heidorn, M. The Role of Temperature and Column Thermostatting in Liquid Chromatography. 6.

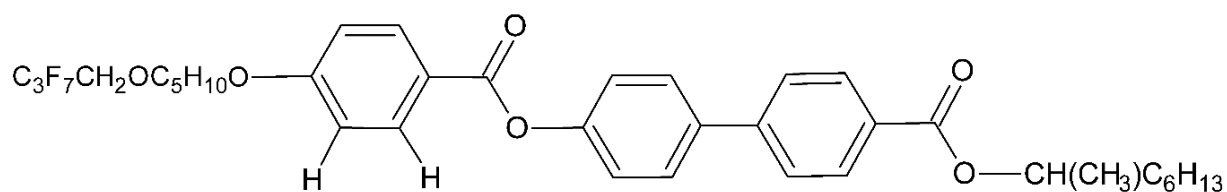
(38) Snyder, L. R.; Carr, P. W.; Rutan, S. C. Solvatochromically Based Solvent-Selectivity Triangle. *J. Chromatogr. A* **1993**, *656* (1), 537–547. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80818-S](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80818-S).

## Příloha 1

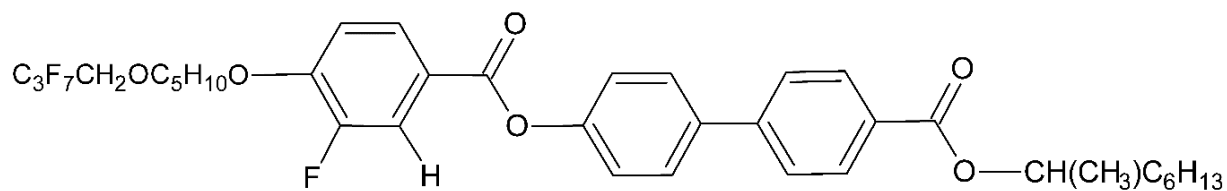
2HH



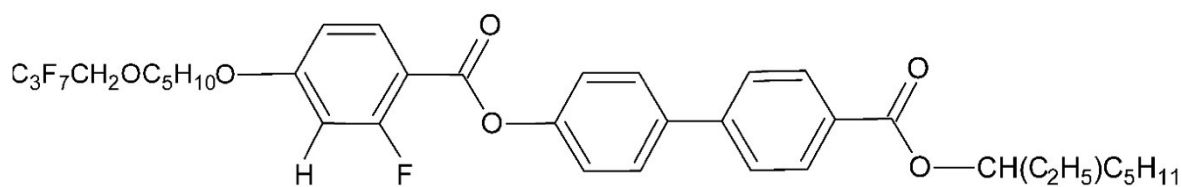
5HH



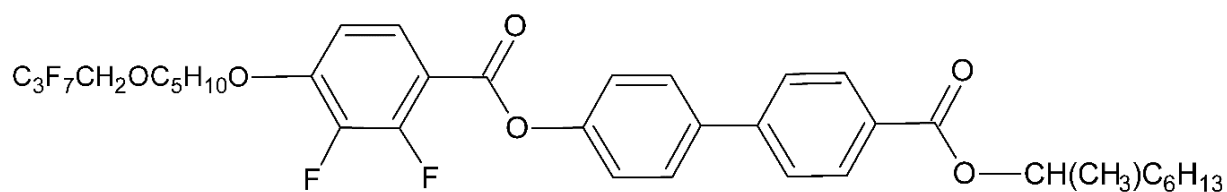
5FH



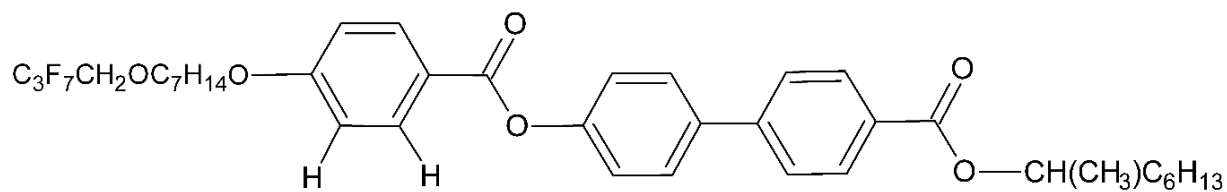
5HF



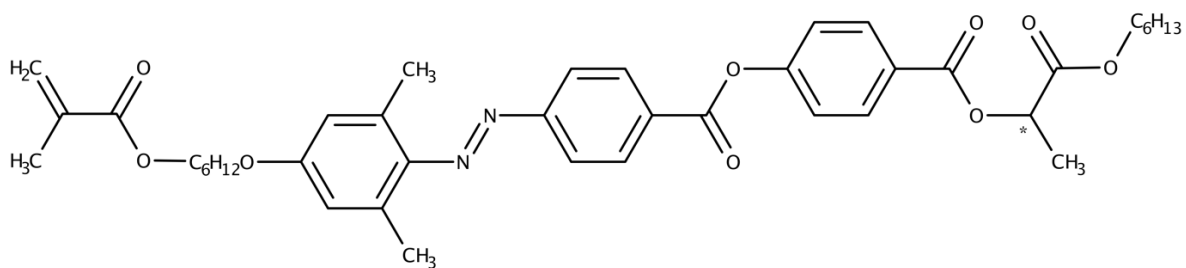
5FF



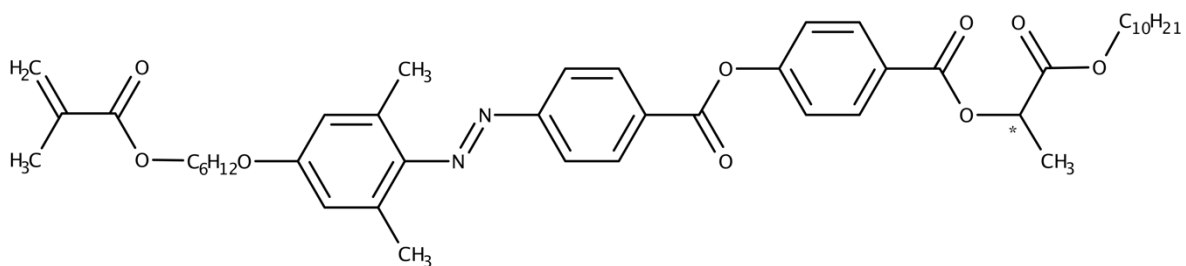
7HH



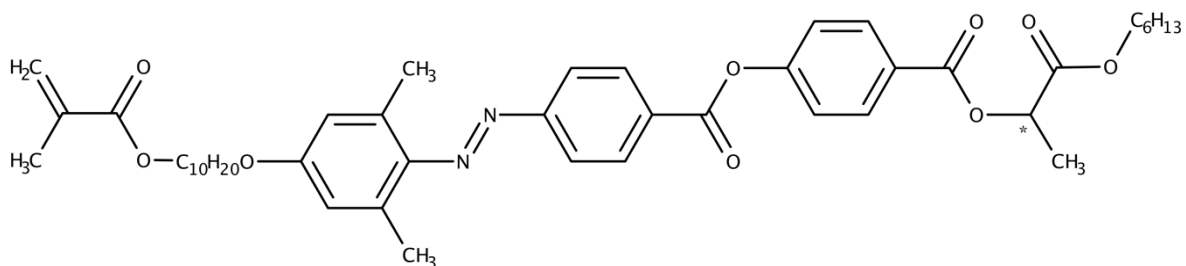
MDA 6/6



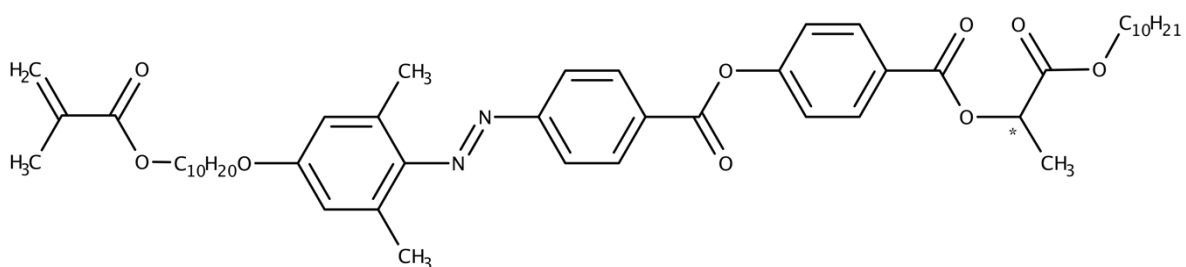
MDA 6/10



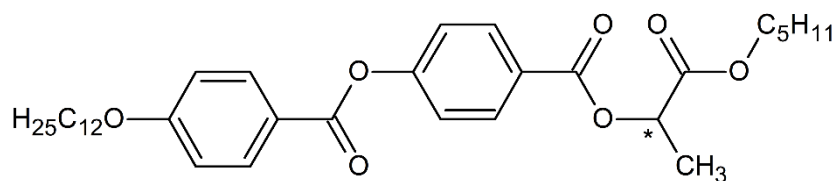
MDA 10/6



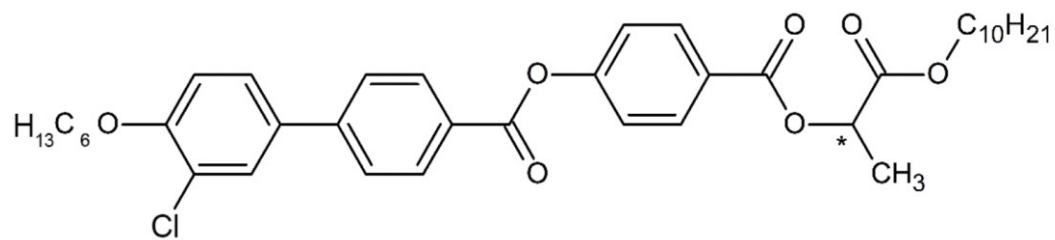
MDA 10/10



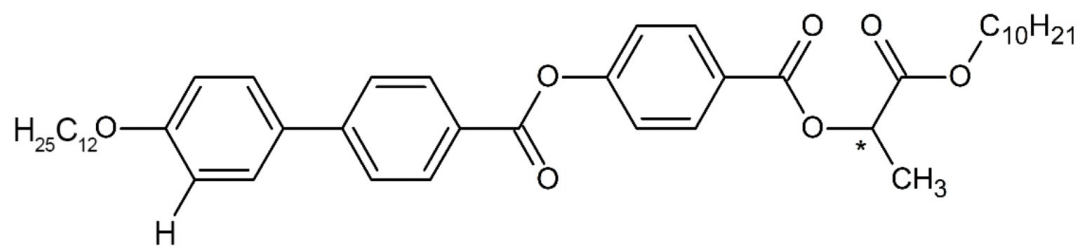
12PHB<sup>2</sup> AL



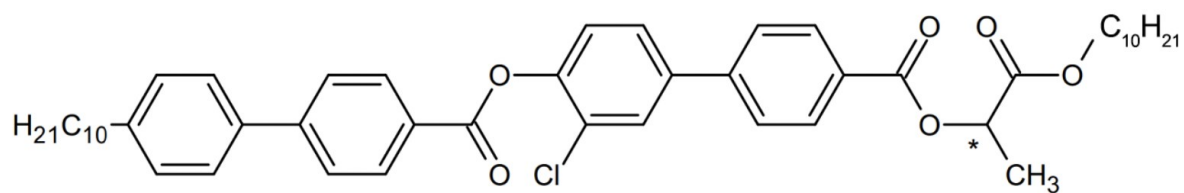
BCI 6/10



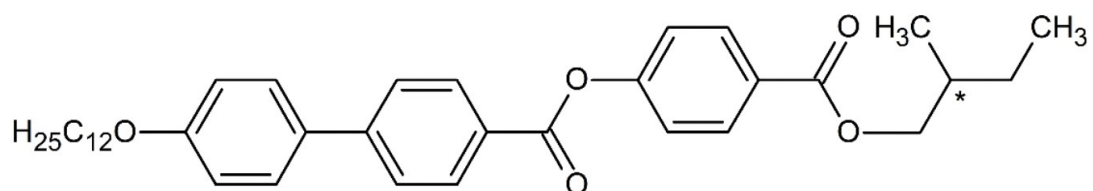
ZL 12/10



10 ZBDL



ZL 12/\*



10 ZBBL

