

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyzikální chemie



Mgr. Gabriela Kučerová

Charakterizace chirálních a achirálních chromatografických separačních systémů
Chromatographic characterization of chiral and achiral separation systems

Dizertační práce

Vedoucí práce/Školitel: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Konzultant: RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha, 2018

Předkládaná dizertační práce shrnuje výsledky získané v letech 2013 – 2017 během mého doktorského studia na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Práce byla financována v rámci výzkumného záměru MŠMT číslo MSM0021620857 a v rámci řešení projektů: GAUK – č. 356411 a 790314, GAČR – č. 13-01440S, 16-05942S a P206/14-19278P, CEEPUS – č. CIII-RO-0010-07-1213, KONTAKT AM 2010 projekt LH11018.

Prohlášení

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

V Praze

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za vedení celým svým studiem, za cenné rady a trpělivost a dále RNDr. Květě Kalíkové Ph.D. za její přístup a podporu.

Klíčová slova

Vysokoučinná kapalinová chromatografie, superkritická fluidní chromatografie, chirální separace, stacionární fáze, mobilní fáze, separační systémy, charakterizace, interakční mechanismus.

Keywords

High-performance liquid chromatography, supercritical fluid chromatography, chiral separations, stationary phase, mobile phase, separation systems, characterization, interaction mechanism.

Abstrakt

Předkládaná dizertační práce, tvořená komentovaným souborem pěti publikací, se zabývá charakterizací a aplikačním potenciálem cyklodextrinových a polysacharidových chirálních stacionárních fází a dále stacionárních fází na bázi makrocyklických antibiotik, přičemž není studován pouze vliv daných stacionárních fází, ale je kladen důraz i na složení mobilní fáze. Tento přístup zajišťuje komplexní pohled na daný separační systém.

Byly studovány systémy s rozdílnou povahou chirálního selektoru ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Jednalo se o chirální stacionární fáze na bázi makrocyklických antibiotik a derivatizovaných polysacharidů, přičemž pro enantioseparaci nekódovaných aminokyselin se jako nejvhodnější jevil teikoplaninový chirální selektor.

Byla provedena charakterizace nové kationické chirální stacionární fáze na bázi cyklodextrinu připravené pomocí tzv. dynamického pokrývání. Charakterizační metoda lineárních vztahů volných energií byla použita pro porovnání dvou separačních systémů, tj. nově připravené stacionární fáze s komerčně dostupnou stacionární fází. Na základě získaných výsledků se pro separaci různých achirálních skupin analytů jako vhodnější jeví nově připravená stacionární fáze.

Dynamickým pokrýváním připravená další stacionární fáze, která byla porovnána s chromatografickým systémem, v němž byl stejný, nově syntetizovaný chirální selektor, použitý pro dynamické pokrývání, přítomen jako aditivum v mobilní fázi. Na sadě chirálních aminokyselin a nechirálních směsí dipeptidů byla prokázána odlišná vhodnost obou separačních systémů pro různé typy analytů.

Pomocí metody lineárních vztahů volných energií byl vyšetřen vliv složení mobilní fáze na separaci. Bylo zjištěno, že nevhodná volba určité složky mobilní fáze může mít fatální vliv na separaci analytů.

Polysacharidové chirální stacionární fáze byly studovány rovněž v systému superkritické fluidní chromatografie. Byla použita sada 52 biologicky aktivních látek a byl vyšetřen vliv typu polysacharidové kostry chirálního selektoru a vliv rozdílného organického modifikátoru a aditiva mobilní fáze na retenci a enantioseparaci.

Abstract

Dissertation thesis is a 5-publications' collection concerning characterization and application potential of cyclodextrins, polysaccharides and macrocyclic antibiotics based chiral stationary phases. The effects of stationary phase and mobile phase are studied. This approach ensures the complex insight into separation systems studied.

Systems with different nature of chiral selector were studied by HPLC. Namely, macrocyclic antibiotics and derivatized polysaccharides were used for experiments. Former ones provided better results for enantioseparation of non-coded amino acids than latter ones.

Dynamic coating procedure was used for preparation of a new chiral stationary phase. Characterization of new cationic cyclodextrin based chiral stationary phase was performed. Linear free energy relationship method was used for characterization of two different separation systems, *i.e.* newly prepared stationary phase and commercially available stationary phase. Based on results obtained, newly prepared stationary phase showed better results for separation of different achiral groups of analysts.

New stationary phase prepared by dynamic coating was compared with chromatographic system, in which the chiral selector was used as a mobile phase additive. The chiral selector used for the two different approaches was identical. The set of chiral amino acids and non-chiral mixtures of dipeptides was used as analysts for the experiment. Different performance of the two separation systems was shown.

Linear free energy relationship method was used for examination of effect of mobile phase composition on separation. Results carried an important message – inappropriate choice of a specified part of mobile phase should have fatal influence on analyst separation.

Polysaccharide-based chiral stationary phases were studied via supercritical fluid chromatography. The set of 52 biologically active compounds was tested. The influence of different polysaccharide backbone, different organic modifier and mobile phase additive on retention and enantioseparation was examined.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	8
1. ÚVOD	9
2. CÍL PRÁCE	10
3. CHROMATOGRAFICKÉ SEPARAČNÍ SYSTÉMY	11
3.1 HPLC	11
3.2 SFC.....	11
3.3 CHIRÁLNÍ SEPARACE V HPLC A SFC	12
4. CHIRÁLNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE.....	13
4.1 KOMERČNĚ DOSTUPNÉ CHIRÁLNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE	13
4.2 CSF NA BÁZI MAKROCYKLICKÝCH ANTIBIOTIK	13
4.2.1 Cyklodextrinové CSF.....	14
4.2.2 Polysacharidové CSF	17
4.3 PŘÍPRAVA CHIRÁLNÍCH STACIONÁRNÍCH FÁZÍ.....	19
4.3.1 Dynamické pokrývání.....	19
5. CHARAKTERIZACE SEPARAČNÍCH SYSTÉMŮ	21
5.1 LFER.....	21
6. VÝSLEDKY A DISKUZE	23
6.1 PUBLIKACE I.....	23
PUBLIKACE I - ABSTRAKT.....	25
6.2 PUBLIKACE II	26
PUBLIKACE II - ABSTRAKT.....	28
6.3 PUBLIKACE III.....	29
PUBLIKACE III - ABSTRAKT.....	31
6.4 PUBLIKACE IV.....	32
PUBLIKACE IV - ABSTRAKT	34
6.5 PUBLIKACE V.....	35
PUBLIKACE V - ABSTRAKT	38
7. ZÁVĚR.....	39
POUŽITÁ LITERATURA.....	41
SEZNAM PUBLIKACÍ	46
SEZNAM KONFERENCEČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ - PŘEDNÁŠKY	47
SEZNAM KONFERENCEČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ - PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ	48
PŘILOŽENÉ PUBLIKACE.....	50

Seznam použitých zkratk a symbolů

α	selektivita
a	regresní koeficient LFER, značí rozdíl v bazicitě vodíkové vazby
A	LFER rovnice, efektivní či celková acidita vodíkové vazby
ACN	acetonitril
b	regresní koeficient LFER, značí rozdíl v aciditě vodíkové vazby
B	LFER rovnice, efektivní či celková bazicita vodíkové vazby
c	průsečík LFER rovnice, charakteristika daného systému
CE	kapilární elektroforéza
CSF	chirální stacionární fáze
<i>e</i>	regresní koeficient LFER, rozdíl ve schopnosti interace s n- a π -el.páry
E	LFER rovnice, rozsah molární refrakce
ΔG°	změna standardní Gibbsovy energie systému
HILIC	hydrofilně-interakční kapalinová chromatografie
HOAc	kyselina octová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>k</i>	LFER rovnice, retenční faktor solutu
<i>K</i>	rovnovážná konstanta
<i>k</i> ₁	retenční faktor prvního elujícího enantiomeru
MEOH	methanol
MF	mobilitní fáze
NP	normální mód
PEMPDA- β -CD	6 ¹ -deoxy-6 ¹ -(dimethyl(3-(trimethylammonio)propyl)ammonio)- β -cyklodextrin dijodid
PO	polárně-organický mód
R	univerzální plynová konstanta
<i>R</i>	rozlišení
RP	reverzní mód
<i>R</i> _S	rozlišení píků
s	regresní koeficient LFER, značí rozdíl v dipolaritě/polariabilitě
S	LFER rovnice, dipolarita/polarizabilita
SBE- β -CD	sulfobutylether- β -cyklodextrin
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie
T	termodynamická teplota
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
v	regresní koeficient LFER, značí rozdíl v disperzních interakcích mezi dvěma fázemi
V	LFER rovnice, McGowanův objem

1. Úvod

Chromatografické separační systémy, tedy vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a superkritická fluidní chromatografie (SFC), se řadí v dnešní době k těm nejužívanějším pro chirální i achirální separace, zejména díky spolehlivosti a opakovatelnosti obou technik. Pro SFC systém je nutné zmínit další výhodu a to velmi krátkou dobu trvání analýzy. Zejména HPLC je již zavedenou technikou ve farmaceutickém, agrochemickém i potravinářském průmyslu. Přes široké aplikační možnosti stávajících separačních systémů neustává vývoj nových stacionárních fází (SF), které by dále zlepšily selektivitu separace a zkrátily dobu analýzy. Studie vedoucí k detailnímu pochopení mechanismu separace mají přispívat ke snadnější volbě separačních podmínek pro konkrétní analýzy. Obecně důležitým aspektem vedoucím k úspěšné separaci je správná volba SF a složení mobilní fáze (MF). Celý proces separace je totiž komplexní záležitostí, kterou ovlivňují mnohé faktory. Popis separačního mechanismu v chromatografickém systému vede k zefektivnění celého procesu vývoje metody.

2. Cíl práce

Cílem práce bylo vyšetřit a charakterizovat retenční a (enantio)selektivní mechanismy uplatňující se na achirálních i chirálních stacionárních fázích (CSF) v HPLC a SFC. Vzhledem k tomu, že retenci a separaci v kapalinově-chromatografickém systému resp. v systému SFC ovlivňuje jak SF, tak MF, je potřeba při studiu separačních možností zvažovat příspěvek obou. Z toho důvodu byla v jednotlivých publikacích zahrnutých v této práci věnována pozornost oběma fázím.

Dílčí cíle:

- Srovnání enantioselektivního potenciálu CSF na bázi makrocyclických antibiotik a derivatizovaných polysacharidů pro dělení nekódovaných aminokyselin v HPLC – publikace I.
- Chromatografická charakterizace nové kationické CSF na bázi cyklodextrinu připravené tzv. dynamickým pokrýváním – publikace II.
- Srovnání separačních schopností sulfobutylether- β -cyklodextrinu jako aditiva MF s CSF připravenou tzv. dynamickým pokrytím – publikace III.
- Vyšetření vlivu složení MF na chirální a achirální separace na cyklodextrinové CSF – publikace IV.
- Studium enantioselektivního potenciálu CSF na bázi polysacharidů pro separace v SFC – publikace V.

3. Chromatografické separační systémy

Kapitola 3 pojednává o dvou separačních technikách, které byly využity pro experimenty v této práci. Jedná se o HPLC a SFC, přičemž oba systémy hrají významnou roli na poli chirálních i achirálních separací obecně [1-4]. Z důvodu rozšířenosti HPLC i renesanci, kterou zažívá SFC v posledních letech, tedy díky základnímu povědomí o těchto technikách, bude následující text pouze stručným pojednáním. Důraz bude kladen na základní faktory, které ovlivňují separaci v achirálních i chirálních systémech HPLC a SFC.

3.1 HPLC

HPLC je dominantní technika pro separace v analytickém, semipreparativním i preparativním měřítku [1]. V HPLC dochází k distribuci jednotlivých analyzovaných složek mezi nepohyblivou a pohyblivou fází. Z tohoto důvodu je možné ovlivnit danou separaci vhodnou volbou nejen SF, ale i MF [5]. V HPLC lze pracovat v několika základních módech – reverzním (RP), normálním (NP), polárně-organickém (PO) a v tzv. hydrofilně interakční kapalinové chromatografii (HILIC). Tyto systémy se liší vlastnostmi SF a MF.

Dnešní trh nabízí množství SF, které je možné použít v HPLC [6]. SF mohou být podle způsobu přípravy pokrývané nebo imobilizované (rozdíl je vysvětlen v kapitole 4.2.2 na příkladu polysacharidových CSF) či achirální vs. chirální. SF interaguje s analytem, přičemž dochází k jeho zadržování a zpoždování.

3.2 SFC

SFC je spolehlivou technikou pro rychlé a účinné chirální i achirální separace [7-12]. V dnešní době se používá pro separace neutrálních, kyselých, a také bazických látek [13, 14]. Stejně jako u HPLC dochází ve SFC k distribuci analytů mezi SF a MF. SF pro SFC může být použita stejná jako pro HPLC, avšak s novou generací SFC systémů vznikly plně kompatibilní, vysoce účinné, moderní SF; jedná se o fáze s plně porézními sub-2 μm či sub-3 μm částicemi [15]. MF je ve SFC složena z tekutiny v nadkritickém stavu s přísávkou organických modifikátorů, aditiv případně přímo vody. MF ve SFC disponuje vyšší difuzivitou, a tím snazší kinetikou přenosu hmoty. Důsledkem je pak vyšší separační účinnosti, lepší tvar píků a kratší retence (doba analýzy) v porovnání s HPLC [4]. Nejčastěji užívanou superkritickou tekutinou je

CO₂, která je i hlavní komponentou MF. Tabulka 1 uvádí hodnoty kritických tlaků, kritických teplot a hustoty vybraných látek. Je zřejmé, že kritické hodnoty pro CO₂ jsou rutinně dosažitelné. Dalšími výhodnými parametry superkritického CO₂ je jeho netoxičita, nehořlavost, snadná purifikace, cena a fakt, že je považován za tzv. „green solvent“ [1, 7, 16].

Tabulka 1. Hodnoty kritických tlaků a teplot pro vybrané látky.

Látka	Pc (bar)	Tc (°C)	ρ (g/ml)
CO ₂	72,9	31,3	0,47
N ₂ O	72,5	36,5	0,45
SF ₆	37,1	45,5	0,74
Xe	58,4	16,6	1,10
CH ₃ OH	78,9	240,5	0,27
CH ₃ CH(OH)CH ₃	47,0	235,3	0,27
H ₂ O	218	374	0,32

Pc – kritický tlak, Tc – kritická teplota, ρ - hustota

3.3 Chirální separace v HPLC a SFC

Chirální separace uskutečněné pomocí HPLC a SFC tvoří více než 50% publikovaných článků v této oblasti vůbec [17]. V HPLC i SFC existují dvě možnosti jak docílit chirální separace studovaného analytu a to: přímá a nepřímá metoda [18, 19]. Přímá separace vyžaduje, buď aby byly pro analýzu použity CSF, tedy fáze s navázaným chirálním selektorem na vhodném nosiči, nebo je přidáván chirální selektor do MF [19-22]. Nepřímá metoda představuje derivatizaci analyzované látky vhodným chirálním činidlem a následnou separaci vzniklých diastereomerních párů na vhodné achirální SF [20, 22]. Výhoda přímé metody je jednoduchost a menší časová náročnost oproti metodě nepřímé. Vzhledem k množství komerčně dostupných CSF se od využití nepřímé metody ustupuje [19, 21, 22]. V souladu s tímto trendem byla i v této práci používána výhradně přímá metoda za použití řady CSF. Zkoumán byl i separační systém s přidavkem chirálního selektoru do MF.

4. Chirální stacionární fáze

Kapitola 4 pojednává o komerčně dostupných CSF s důrazem na ty, které byly použity pro experimenty v této práci. Dále se zmiňuje o přípravě chirálních SF, přičemž toto téma omezuje pouze na cyklodextrinové CSF připravené tzv. dynamickým pokrýváním.

4.1 Komerčně dostupné chirální stacionární fáze

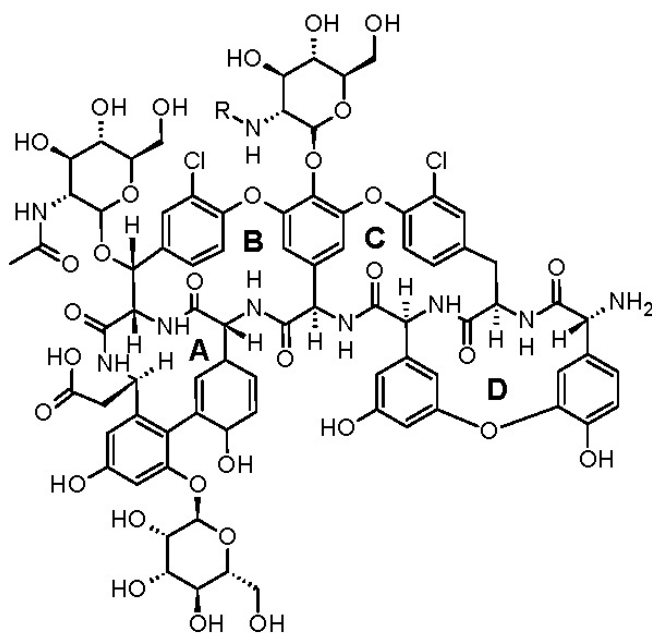
Dnešní trh nabízí nepřehledné množství CSF, které lze rozdělit do skupin dle typu chirálních selektorů. Příkladem mohou být Pirklovy, polysacharidové, ligandově-výměnné, cyklofruktanové, cyklodextrinové CSF či CSF na bázi makrocyclických antibiotik [2, 20, 23].

4.2 CSF na bázi makrocyclických antibiotik

Makrocyclická antibiotika pro CSF byla objevena prof. Armstrongem. Vynikají schopností vytvářet komplexy s potencionálními analyty, podobně jako cyklodextriny, a proto jsou hojně využívány [2, 23]. Pro chirální separace se nejlépe osvědčily CSF s vázaným teikoplaninem nebo vankomycinem. Z aplikačního hlediska je lze použít v NP, PO a RP módu HPLC i ve SFC [1, 23, 24]. Na rozpoznávacím mechanismu, a tedy i na separaci enantiomerů, mají vliv různé typy interakcí jako H-vazby, π - π interakce či dipólové interakce [2].

Teikoplanin

Teikoplanin je přírodní látka produkována aktinomycetou *Actinoplanes teichomycetius*, která se používá jako antibiotikum proti aerobním i anaerobním grampozitivním bakteriím. Molekula teikoplaninu obsahuje 23 stereogenních center, 4 makrocykly, 7 aromatických kruhů, 3 cukerné zbytky a 1 hydrofobní řetězec, jak lze vidět na Obrázku 1 [25-27]. Poskytuje tedy řadu interakčních možností pro enantioseparaci strukturně odlišných analytů.



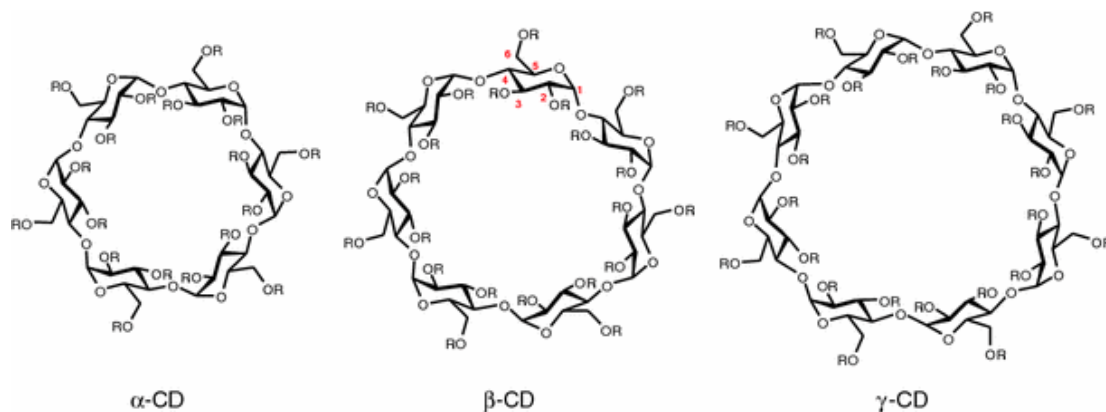
Obr. 1. Struktura teikoplaninu, upraveno dle citace [28].

Dostupné jsou i další CSF na bázi teikoplaninu, jmenovitě teikoplanin aglykon (oproti teikoplaninu neobsahuje sacharidové zbytky) nebo methylovaný teikoplanin aglykon (má derivatizované volné hydroxylové skupiny po chybějících cukerných zbytcích methylovou skupinou). Na základě odlišného pokrytí nosiče teikoplaninem jsou k dispozici T a T2 CSF. T2 má vyšší pokrytí silikagelu chirálním selektorem a odlišnou vazbu chirálního selektoru na silikagelový nosič. Další rozdíl tkví v porozitě silikagelu – pro CSF Chirobiotic[®] T je to 120 Å, v případě Chirobiotic[®] T2 je teikoplanin navázán na silikagel s porozitou 200 Å. Cílem je dosažení odlišné stereoselektivní interakce s analyty [23].

4.2.1 Cyklodextrinové CSF

Cyklodextriny a jejich deriváty, používané jako chirální selektory, stále představují významný nástroj pro analýzu strukturálně odlišných látek v moderní analytické chemii [2, 3, 23, 29-36]. Rozšířený aplikační potenciál CD a jejich derivátů, je způsoben zejména jejich přirozenou chirální povahou, a dále schopností tvořit inkluzní komplexy s molekulami analytů [32]. Základní strukturu cyklodextrinových CSF tvoří α -, β - či γ -cyklodextriny, oligosacharidy se 6, 7 či 8 glukopyranózovými jednotkami, které jsou spojeny α -1,4-glykozidickou vazbou. Průměr kavit α -, β - a γ -cyklodextrinu je 0,57, 0,78 a 0,95 nm [23, 37]. Struktura zmíněných cyklodextrinů je znázorněna na

Obrázku 2. Vnitřek kavity cyklodextrinu má hydrofobní povahu, která vyplývá z uhlíkového řetězce cukerných částí, zatímco horní a spodní okraj kavity je hydrofilní povahy díky přítomnosti hydroxylových skupin [23]. Vazba molekul cyklodextrinu na silikagel je u různých výrobců kolon různá (etherová či karbamátová spojka) [23].



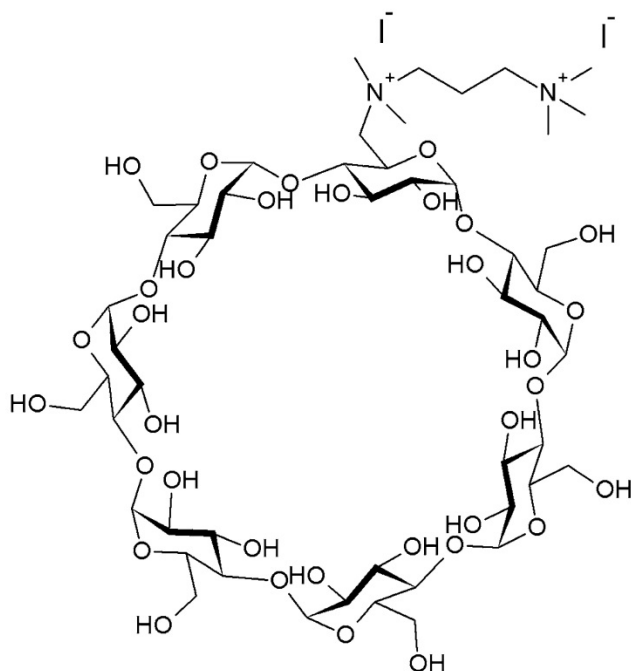
Obr. 2. Struktury nativních cyklodextrinů (α -cyklodextrin, β -cyklodextrin a γ -cyklodextrin), upraveno dle citace [2].

Ze tří výše uvedených nederivatizovaných cyklodextrinů je β -CD CSF nejužívanější. Velikost kavity totiž umožňuje nejlepší schopnost inkorporovat řadu analytů. Relativně nízký separační potenciál nativního cyklodextrinu vůči chirálním analytům je vylepšen derivatizací [3, 33, 38]. Derivatizace se neomezuje pouze na neutrální molekuly, ale i na cyklodextriny anionické či kationické povahy [39]. Literatura uvádí kationické i anionické cyklodextriny, náhodně multi-substituované a selektivně substituované deriváty pomocí modifikace na C6 pozici glukopyranózové jednotky [3, 40-42].

V této práci byly používány dva deriváty cyklodextrinu, které budou blíže popsány v následujících podkapitolách, jeden syntetizovaný na Katedře organické chemie PŘF UK a druhý komerčně dostupný.

PEMPDA- β -cyklodextrin

Relativně nově syntetizovaný monosubstituovaný tetralkylamoniový derivát cyklodextrinu, 6¹-deoxy-6¹-(dimethyl(3-(trimethylammonio)propyl)ammonio)- β -cyklodextrin dijodid (PEMPDA- β -CD), byl připraven skupinou Doc. Jindřicha (Katedra organické chemie, PŘF UK) jako nadějný derivát se dvěma permanentními pozitivními náboji. Obrázek 3 uvádí strukturu PEMPDA- β -CD. Podrobný popis syntézy byl publikován v roce 2014 [43].

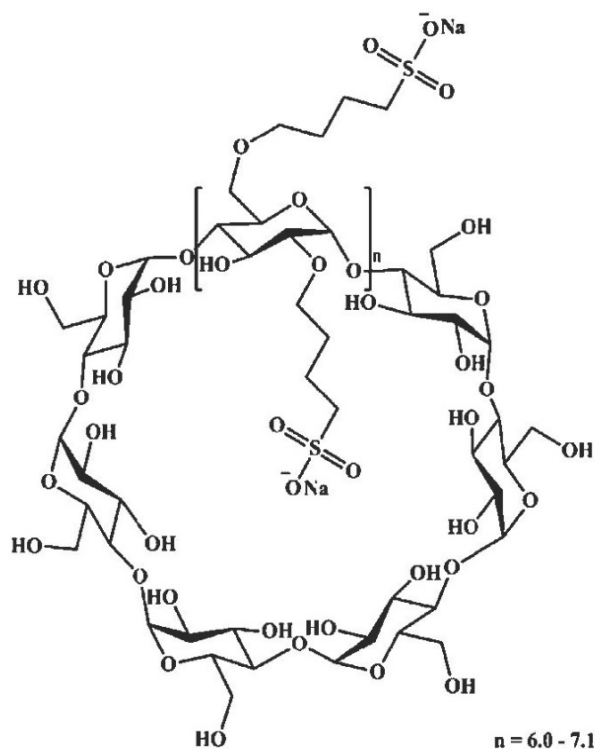


Obr. 3. Struktura PEMPDA- β -CD [44].

PEMPDA- β -CD může být použit v kapilární elektroforéze (CE) jako chirální selektor, avšak přítomnost dvou permanentních pozitivních nábojů nabízí využití selektoru jako pokrývací agens na vhodný nosič pro přípravu CSF a její následné využití v HPLC. Samotný popis procesu dynamického pokrývání včetně podrobného popisu přípravy PEMPDA- β -CD CSF je uveden v kapitole 4.3.1.

Sulfobutylether- β -cyklodextrin

Sulfobutylether- β -cyklodextrin (SBE- β -CD) je komerčně rozšířený polyanionický derivát cyklodextrinu, s obchodním názvem Captisol[®] (Obrázek 4). Sulfobutyletherový substituent může být zaveden na 2, 3 a 6 pozici na jedné či více glukopyranózových jednotkách [45]. Captisol[®] je patentem chráněný, hepta-substituovaný preparát, který má díky unikátní modifikaci vylepšenou stabilitu, solubilitu, biodostupnost a dávkování aktivní farmaceutické složky [45]. Umožňuje tedy tvorbu komplexu s farmakem vedoucí ke zvýšení rozpustnosti, čímž zaručí snadnější doručení daného farmaka k cílovému místu v lidském těle [45]. Captisol[®] je využíván zejména farmaceutickým průmyslem, avšak v literatuře lze najít jeho využití i jako chirálního selektoru v CE či jako aditivum MF v HPLC [46-49]. Právě polyanionická povaha preparátu Captisol[®] umožňuje přípravu SBE- β -CD pokryté CSF, o níž pojednává kapitola 4.3.1.



Obr. 4. Struktura SBE- β -CD, upraveno dle citace [50].

4.2.2 Polysacharidové CSF

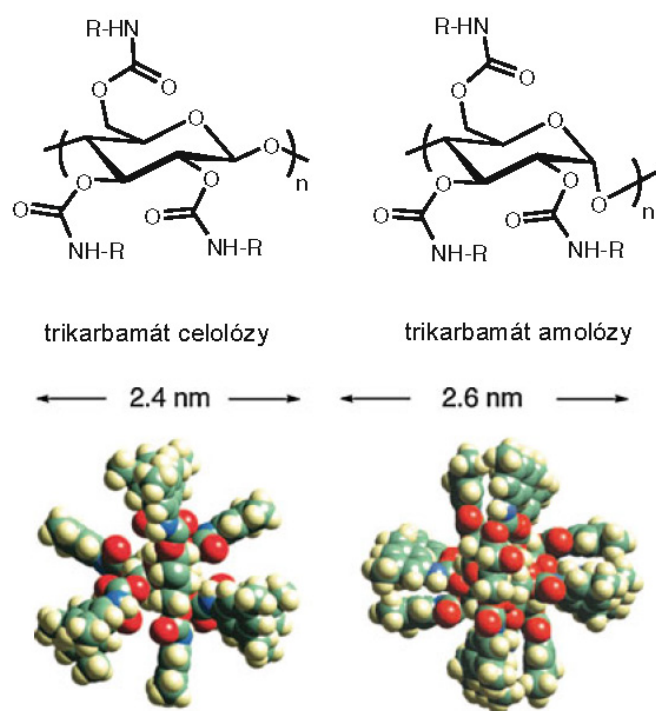
Polysacharidy a především jejich deriváty, jsou dlouholetými reprezentanty SF vhodných pro chirální separace v kapalinové chromatografii [23]. Dnešní trh nabízí buď pokrývané, nebo imobilizované polysacharidové CSF [51]. Rozdíl mezi pokrytou a imobilizovanou SF je následující:

Imobilizované SF mají navázaný chirální selektor kovalentní vazbou na vhodný nosič, kdežto u pokrývaných je selektor vázán pouze fyzikální interakcí. Imobilizované fáze jsou multimodální, lze je tedy použít v NP, RP či PO módu HPLC. Pokrývané SP multimodální nejsou a lze je použít pouze buď pro RP, nebo NP mód. Dalším důležitým rozdílem je použitelnost CSF spolu s rozpouštědly – imobilizované fáze lze použít zároveň s nestandardními rozpouštědly (THF, CHCl_3) a neplatí zde téměř žádné omezení vzhledem k použitým solventům, což není možné u pokrývaných fází [23]. I přes tato fakta, pokrývané fáze vykazují často lepší separační účinky pro některé analyty než imobilizované CSF [52, 53].

Na Obrázku 5 je znázorněna struktura derivátů polysacharidových chirálních selektorů společně s molekulárním modelem. Trikarbamát celulózy či amylozy tvoří hlavní páteř polymeru jak u pokrytých, tak u imobilizovaných CSF [23]. Celulózový řetězec

je tvořen 1,4- β -D-glukózovými jednotkami, kdežto amyložový řetězec 1,4- α -D-glukózovými jednotkami. Lineární glukopyranózový řetězec je lehce šroubovitě zavinutý, přičemž spirálovitý zákrut je menší pro celulózné deriváty než pro amyložové. Ve spojení s polysacharidovými CSF literatura uvádí pojmy substituční vzorec a aromatická substituce. Tyto substituční vzorce vytvářejí a regulují uspořádání žlábků podél uhlíkového řetězce, který slouží jako tzv. enantioselektivní vazebná kapsa [23].

Na helikální strukturu polymeru má vliv nejen podoba hlavní páteře (amyloža x celulóza), ale i postranní řetězce, typ derivátu (ester či karbamát) či rezidua. Všechny tyto strukturální prvky hrají velmi důležitou roli pro enantiodiskriminační profil polysacharidových CSF.



Obr. 5. Struktura a molekulární model tris(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulózy a amyložy, upraveno dle citace [2].

4.3 Příprava chirálních stacionárních fází

Tato kapitola je věnována přípravě nových cyklodextrinových SF. Vychází z uvedených dílčích cílů dizertační práce. Konkrétně se jedná o publikace II a III, které pojednávají o nových cyklodextrinových SF připravených tzv. dynamickým pokrýváním.

Obecně lze říci, že přípravě nové SF (kolony) předchází syntéza určitého selektoru a následuje jeho ukotvení na vhodnou fázi (nosič). Tedy vhodný selektor je buď chemickou vazbou navázán na silikagelovém nosiči pomocí tzv. ramének, či je připravený polymer sorbován na silikagelový nosič [33, 54]. Výše uvedené způsoby nejsou ale jedinou možností, jak lze CSF připravit [3, 54-57]. Lze využít dalšího přístupu jako je tzv. klik chemie [33, 57].

4.3.1 Dynamické pokrývání

Pojem dynamické pokrývání se objevil v literatuře ve spojení s chirální ligandově-výměnnou chromatografií [58-60]. Dynamické pokrývání nechirální SF chirálním selektorem pro použití v HPLC bylo považováno za jednoduchou alternativu přípravy CSF k chemicky vázaným, zejména cyklodextrinovým fázím. Vůbec první dynamicky pokrytá chirální ligandově-výměnná SF byla připravena a popsána Davankovem [60]. Příprava fáze spočívala v přivádění roztoku, který obsahoval dlouhé řetězce derivátu N-alkyl-L-4-hydroxyprolinu, na achirální kolonu. Takhle připravená kolona dosahovala délky 10 cm a byla vhodná pro chirální separace až sedmi aminokyselin [58, 60]. Princip Davankovovy přípravy SF byl dále využit pro monolitickou či běžnou reverzní SF C-18, jež byla vhodná pro chirální separace aminokyselin, dipeptidů či tripeptidů [61]. Následně byl analogický postup využit k imobilizaci teikoplaninu na reverzní C-8 a C-18 SF, která byla vhodná pro separaci aromatických aminokyselin [62].

Princip přípravy CSF pomocí dynamického pokrývání je možné využít pro nabitě cyklodextriny ve spojení s iontově-výměnnou SF [3, 63]. Byly například připraveny SF navázáním kationických CD derivátů na silikagelový nosič. Tyto CSF jsou vhodné pro separace celé řady strukturně odlišných analytů [3, 55].

Obecně platí, za předpokladu, že derivát cyklodextrinu obsahuje ve své molekule kladný či záporný náboj, lze tohoto náboje využít k navázání (tvorbě iontové interakce) cyklodextrinu na vhodný nosič, v případě, že nosič disponuje nábojem opačným než cyklodextrinový derivát. K tomuto účelu mohou sloužit iontově-

výměnné SF. V této dizertační práci byly připraveny dvě dynamicky pokryté CSF na bázi cyklodextrinu, PEPMDA- β -CD a SBE- β -CD pokryté SF (publikace II a III).

Pro přípravu první CSF pokryté chirálním selektorem PEMPDA- β -CD byla použita kolona Luna 5 μ SCX, která obsahuje benzesulfonátové skupiny. Přičemž se předpokládala tvorba iontové interakce mezi kladně nabitým derivátem CD a záporně nabitou fází Luna. Procedura tzv. dynamického pokrývání byla optimalizována a nově připravená CSF byla testována a charakterizována, jak je komentováno u publikace II. SBE- β -CD nese záporný náboj, proto bylo třeba najít vhodnou SF nesoucí kladný náboj. Tuto podmínku splňovala komerčně dostupná iontově-výměnná kolona Spherisorb[®]. Postup pokrývání byl taktéž optimalizován a nově připravená CSF byla dále testována. Detaily jsou uvedeny v publikaci III.

Obě dvě připravené CSF jsou vhodné pro chirální či achirální separace. Dynamické pokrývání představuje relativně snadný proces přípravy nové CSF za použití achirální SF a chirálního selektoru. Výhoda výše popsané přípravy CSF dynamickým pokrytím dále spočívá v možnosti výměny navázaného chirálního selektoru za jiný, avšak po zapojení vhodné vymývací procedury. Vymývací proces ani dynamické pokrývání neznehodnotí původní achirální iontově-výměnnou SF, kolonu lze tedy dále modifikovat dalšími chirálními selektory (nejen na bázi cyklodextrinů), čímž vzniká široká aplikační škála pro chirální i achirální separace strukturně velmi odlišných analytů.

5. Charakterizace separačních systémů

V chromatografických separačních systémech jako jsou ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie (UHPLC), HPLC či SFC, je retenční a tedy i separační ovlivněna nejen SF ale i MF, přičemž obě dvě fáze mohou být optimalizovány [2, 4]. Srovnání separačních mechanismů HPLC a SFC ukazuje, že v obou případech dochází k ovlivnění analogickými silami. Existují různé termodynamické přístupy, které se používají pro charakterizaci chromatografických separačních systémů. Literatura uvádí například tyto možnosti. První je prediktivní matematický model na termodynamickém základě. Umožňuje predikci retenčních časů a rozlišení analytů na základě minimálního počtu předběžných experimentů. Druhým přístupem je vzájemné porovnávání jednotlivých SF za použití předvolených kritérií pro jejich klasifikaci. Primárně tedy nejde o objasnění retenčního mechanismu, ale dochází k odhalení podobností a odlišností mezi jednotlivými SF [4]. Třetí přístup reprezentují počítačové simulace retenčního procesu. Zde přicházejí do úvahy dvě možnosti: molekulová dynamika a metoda Monte Carlo. Posledním přístupem jsou termodynamické studie významně přispívající k objasnění separačního procesu v chromatografii, příkladem je HS-model (HS z angl. hydrophobic subtraction) či model lineárních vztahů volných energií (LFER), o kterém je podrobněji pojednáno níže.

5.1 LFER

Metoda LFER (z angl. linear free energy relationship method) je jedna z často používaných metod k charakterizaci separačních systémů. Je nástrojem, který umožňuje určení retenční analytu v odlišných separačních systémech, jako jsou např. plynová chromatografie, micelární CE či HPLC a SFC. Jedna z výhod metody LFER je schopnost nezávisle popsat příspěvek individuálních molekulárních interakcí na retenci analytů [64]. LFER metoda je založena na korelaci přenosu analytu mezi dvěma fázemi se změnou Gibbsovy energie daného systému [64]. Vychází ze známého vztahu pro rovnováhu systému:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

rovnice 1

Kde ΔG° je změna standardní Gibbsovy energie systému, R je univerzální plynová konstanta, T je termodynamická teplota a K je rovnovážná konstanta.

V HPLC a SFC se nejčastěji používá níže uvedený tvar LFER rovnice:

$$\log k = eE + sS + aA + bB + vV + c \quad \text{rovnice 2}$$

Kde k je retenční faktor solutu, E , S , A , B a V jsou nezávisle proměnné deskriptory, které charakterizují jednotlivé soluty. E je rozsah molární refrakce, S je dipolarita/polarizabilita, A reprezentuje efektivní či celkovou aciditu vodíkové vazby, B je efektivní či celková bazicita vodíkové vazby a V odpovídá charakteristickému McGowanovu objemu a má souvislost s hydrofobicitou solutu. V případě, že jsou výše uvedené deskriptory známy, je možné vypočítat komplementární regresní koeficienty e , s , a , b a v . Pokud jde o popis dvoufázového separačního systému (tvořeného SF a MF) udávají jednotlivé regresní koeficienty právě rozdíl dané vlastnosti mezi SF a MF. Regresní koeficient e reflektuje rozdíl ve schopnosti SF a MF interagovat s n - a π -elektronovými páry solutu, s značí rozdíl v dipolaritě/polarizabilitě, a a b značí rozdíly v bazicitě, respektive aciditě vodíkové vazby a regresní koeficient v reprezentuje rozdíl v disperzních interakcích mezi dvěma fázemi. Průsečík c v rovnici 2 je charakteristikou daného systému a nereflektuje žádnou interakci [64-68].

LFER model charakterizuje chromatografický separační systém jako celek a jako tento nástroj je často používán [4, 64, 69]. Existuje řada modifikací rovnice 2 zahrnujících další faktory, které ovlivňují interakce v separačních systémech. Řadí se mezi ně např. tzv. globularita a flexibilita reflektující tvar molekuly solutu, či deskriptory popisující možnosti iontové interakce [70, 71].

6. Výsledky a diskuze

6.1 Publikace I

Enantioselektivní separace nekódovaných aminokyselin v HPLC

V publikaci I byly studovány možnosti chirální separace nově syntetizovaných nekódovaných aminokyselin na dvou různých typech CSF. Pro studium byly vybrány dvě teikoplaninové SF – Chirobiotic[®] T a Chirobiotic[®] T2 lišící se pokrytím silikagelového nosiče teikoplaninem, a čtyři derivatizované polysacharidové SF – Chiralpak[®] IA, IB, IC a ID, jenž se liší v obsažené cukerné složce (amylóza či celulóza) a typem derivatizační skupiny. Byly vyšetřeny tři separační módy HPLC - RP, HILIC a PO.

Analyty, tedy nekódované aminokyseliny, lze rozdělit do dvou skupin:

1. Neblokované aminokyseliny
2. *N*-blokované aminokyseliny (*N*-blokující skupina Z: benzyloxykarbonyl)

Byly nalezeny vhodné enantiodiskriminační podmínky pro všechny analyty kromě α -methyl-D,L-tyrosinu, u kterého došlo pouze k částečné enantioseparaci na koloně Chirobiotic[®] T2. Souhrnné výsledky jsou uvedeny níže v Tabulce 2.

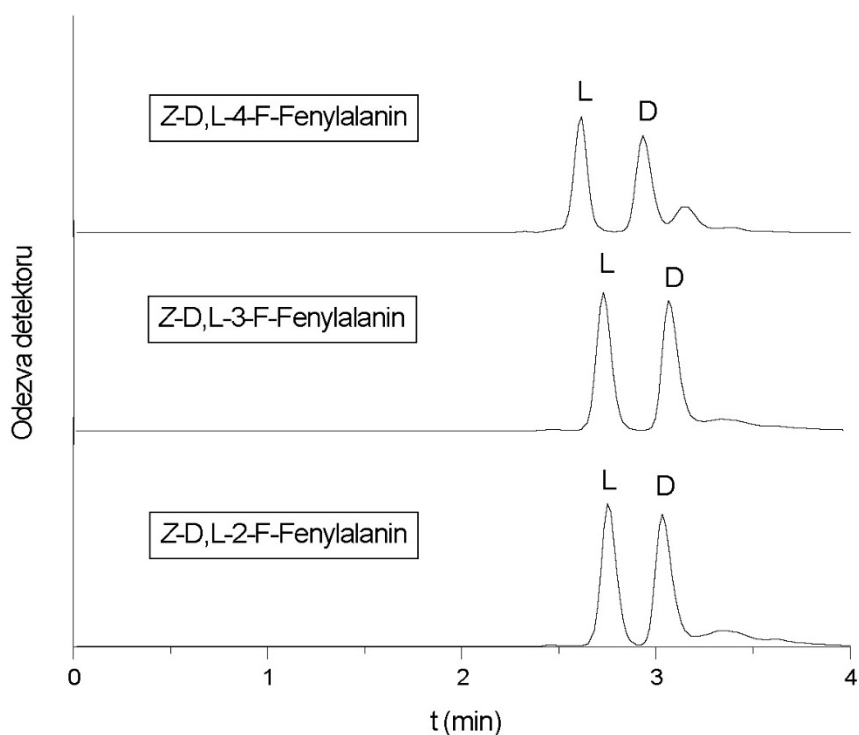
Tabulka 2. Optimalizovaná chromatografická data separovaných enantiomerů aminokyselin.

Analyt	CSF	k_1	<i>R</i>	Mobilní fáze (<i>v/v/v</i>)
D,L-4-F-fenylalanin	T	1,17	4,44	MEOH/voda (70/30)
Z-D,L-4-F-fenylalanin	T	0,43	2,46	MEOH/HOAc/TEA (100/0,1/0,5)
Z-D,L-4-F-fenylalanin - ethyl ester	IC	6,22	4,19	ACN/voda (45/55)
Z-D,L-3-F-fenylalanin	T	0,18	2,31	MEOH/20 mM octanový pufr, pH 4,00 (70/30)
D,L-2-F-fenylalanin	T	1,18	4,80	MEOH/voda (70/30)
Z-D,L-2-F-fenylalanin	T	0,19	1,88	MEOH/20 mM octanový pufr, pH 4,00 (70/30)
D,L-4-Cl-fenylalanine	T	1,36	4,14	MEOH/voda (70/30)
D,L-fenylalanine	T	1,24	4,24	MEOH/20 mM octanový pufr, pH 4,00 (70/30)
D,L-tyrosin	T	1,07	4,99	MEOH/voda (70/30)
α -methyl-D,L-tyrosin	T2	1,34	1,29	MEOH/HOAc/TEA (100/0,3/0,3)

CSF-chirální stacionární fáze, T-teikoplanin, T2-teikoplanin s vyšším pokrytím nosiče, IC-tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulózy, k_1 -retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru, *R*-rozlišení, MEOH-methanol, ACN-acetonitril, HOAc-kyselina octová, TEA-triethylamin.

Bylo ukázáno, že teikoplaninové CSF fungují při enantioseparaci nekódovaných aminokyselin na bázi tzv. smíšeného módu (HILIC/RP mód). Na základě získaných

výsledků je možné konstatovat, že nejvhodnější kolona, pro dosažení enantioseparace blokových i neblokových aminokyselin na základní linii, je SP na bázi teikoplaninu, především Chirobiotic[®] T v RP módu. Obrázek 6 uvádí enantioseparaci tří analytů obsahujících Z-blokující skupinu na koloně Chirobiotic[®] T. Pro *N*-blokové nekódované aminokyseliny se osvědčila i kolona Chiralpak[®] IC v RP módu. Zajímavý výsledek představuje změna elučního pořadí jednotlivých enantiomerů aminokyselin. Na teikoplaninových SF první eluovaly L-enantiomery. Imobilizované polysacharidové SF poskytovaly rozdílné eluční pořadí podle typu cukerné složky.



Obr. 6. Chromatogramy separace na koloně Chirobiotic[®] T, analyt Z-D,L-4-F-fenylalanin v MF MEOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (80/20) (v/v), analyty Z-D,L-3-F-fenylalanin a Z-D,L-2-F-fenylalanin v MF MEOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (70/30) (v/v), průtok MF 1 ml·min⁻¹, UV detekce $\lambda=254$ nm.

Enantioselective separation of unusual amino acids by high performance liquid chromatography

Kučerová, G., Vozka, J., Kalíková, K., Geryk, R., Plecítá, D., Pajpanova, T., Tesařová, E.

Separation and Purification Technology 2013, 119, 123-128

doi:10.1016/j.seppur.2013.09.010

Abstrakt

Unusual amino acids, i.e. amino acids not encoded by DNA, play fundamental roles in many scientific fields. Since the single enantiomeric form can cause different and often serious response of organisms, chiral separations of unusual amino acids are irreplaceable tools in their study and their employment. Two types of chiral stationary phases, two teicoplanin-based and four polysaccharide based columns, were used. Separation conditions of reversed phase mode, polar organic mode and hydrophilic interaction chromatography were evaluated and compared. All columns used exhibited significantly different enantioselectivities. Teicoplanin-based chiral stationary phases, especially Chirobiotic T column, were able to separate almost all enantiomers tested, with the exception of Z-D,L-4-F-phenylalanine ethyl ester. No partial enantioseparation of this analyte was obtained on teicoplanin-based chiral stationary phases, while baseline enantioresolution was achieved on polysaccharide-based columns. Change of elution order of L- and D-enantiomers was proved regarding the chiral stationary phase used.

Celá práce je uvedena v příložených publikacích.

6.2 Publikace II

Chromatografická charakterizace kationické β -cyklodextrinové stacionární fáze připravené metodou dynamického pokrývání

Dynamické pokrývání bylo použito při přípravě nové SF, kdy komerčně dostupná iontově-výměnná SF Luna 5u SCX 100 Å (benzensulfonová kyselina ukotvená na silikagelovém nosiči) byla modifikována derivátem β -cyklodextrinu se dvěma kladnými permanentními náboji, 6¹-deoxy-6¹-(dimethyl(3-trimethylamonio)propyl)amonio- β -cyklodextrin di-iodidem (PEMPDA- β -CD) syntetizovaném na Katedře organické chemie PřF UK. Hlavním cílem této práce byl popis interakčních schopností nově připravené SF. K tomuto účelu posloužila sada strukturálně odlišných achirálních analytů (celkem 7 skupin), na níž byla sledována zejména separační schopnost dané SF. Dále bylo využito metody LFER a studie charakterizující iontové interakce. Výsledky byly porovnány s výstupy získanými měřeními na komerčně dostupné nederivatizované β -cyklodextrinové SF.

MF pro studium separačních schopností a pro LFER byla složena z methanolu (MEOH) a octanového pufru (pH 4,00) v různých objemových poměrech (*v/v*). Pro iontově-interakční studii byly použity MF obsahující MEOH jako organický modifikátor a vždy jeden z níže uvedených pufrů jako vodnou složku:

- A. Octan amonný/kyselina octová 5/9,7 mM, pH 4,75, iontová síla = 5,0 mM
- B. Octan amonný/kyselina octová 10/19,1 mM, pH 4,75, iontová síla = 10,0 mM
- C. Octan amonný/kyselina octová 15/28,4 mM, pH 4,75, iontová síla = 15,0 mM
- D. Octan amonný/kyselina octová 20/37,6 mM, pH 4,75, iontová síla = 20,0 mM

Nově připravená SF dynamickým pokrytím poskytla separaci na základní linii pro celkem 6 skupin analytů ze 7 studovaných. Pouze u 5 skupin analytů došlo k separaci na základní linii na komerčně dostupné β -cyklodextrinové SF. Obecně lze říci, že PEMPDA- β -CD modifikovaná SF poskytuje kratší a tedy méně nákladné analýzy (platí pro látky bez bazických skupin) než komerční β -cyklodextrinová.

LFER studie pro charakterizaci a porovnání intermolekulárních interakcí (Tabulka 3), které dominují v daných dvou separačních systémech, tj. 2 různé kolony - PEMPDA- β -

CD a komerční β -CD (Astec Cyclobond™ I 2000) a stejná MF - MEOH/octanový pufr, pH 4,00 (40/60) (v/v), odhalila následující:

- Regresní koeficienty e , s a a jsou statisticky nevýznamné v obou separačních systémech.
- Regresní koeficient b je negativní, vyjadřuje preferenci interakce daného typu v MF. Hodnota pro systém se SF PEMPDA- β -CD je vyšší, než bylo dosaženo na komerční β -cyklodextrinové koloně, což značí vyšší schopnost nově připravené SF interagovat jako donor H-vazby, než je schopna komerční β -cyklodextrinová fáze.
- Regresní koeficient v vykazuje kladnou hodnotu v obou separačních systémech, a zároveň je nižší pro PEMPDA- β -cyklodextrinem pokrytou SF, která tedy vykazuje nižší hydrofobicitu než komerční kolona.

Tabulka 3. Regresní koeficienty LFER rovnice.

Kolona	Model	e	s	a	b	v	c	SE	F	R
PEMPDA- β -CD pokrytá SF	C.M.	x	x	x	-0,68	1,24	-1,13	0,56	29	0,91
	p -value	0,36	0,62	0,98	0,00	0,00	0,00			
	\pm CI				0,25	0,35	0,35			
Astec Cyclobond™ I 2000	C.M.	x	x	x	-1,22	1,56	-0,68	0,57	65	0,96
	p -value	0,13	0,25	0,87	0,00	0,00	0,00			
	\pm CI				0,25	0,36	0,35			

SE -standardní odchylka, F -testovací hodnoty, R -korelační koeficient, CI-reprezentuje $\pm 95\%$ interval spolehlivosti, x- statisticky nevýznamný rozdíl interakce solutu s MF a SF, p- statistická p-hodnota.

Pro studium iontových interakcí bylo vybráno pouze 7 analytů. Experiment byl proveden na následujících třech SF:

- A. Komerčně dostupná β -cyklodextrinová SF
- B. PEMPDA- β -cyklodextrinem pokrytá SF
- C. Iontově-výměnná SF (nepokrytá) použitá k přípravě PEMPDA- β -cyklodextrinem pokryté SF pro tuto studii

Získaná data potvrdila úspěšnost pokrytí a ukázala fakt, že komerční β -cyklodextrinová SF přispívá k iontovým interakcím nejméně. Naopak nejvýznamnější iontový příspěvek k interakci byl zaznamenán, podle očekávání, na nepokryté iontově-výměnné SF.

Velkou výhodou SF připravené dynamickým pokrýváním je možnost velmi jednoduché výměny selektoru na povrchu SF. Lze tedy jednoduše připravit další typ SF.

Chromatographic Characterization of a New Cationic β -CD Based Stationary Phase

Prepared by Dynamic Coating

Kučerová, G, Kalíková, K., Procházková, H., Popr, M., Jindřich, J., Coufal, P., Tesařová, E.

Chromatographia 2016, 79, 529-536

doi:10.1007/s10337-016-3050-z

Abstrakt

Cyclodextrin-based stationary phases are frequently used for separation of various isomers. The main reason for applying new cyclodextrin (CD) derivatives for HPLC stationary phases is the improvement of separation efficiency. This paper introduces a new stationary phase prepared by dynamic coating of ion-exchanger with a newly synthesized cationic derivative of β -cyclodextrin. This mono-substituted derivative of β -cyclodextrin contains two tetraalkylammonium groups in its side chain. Diverse sets of analytes were tested to reveal the separation potential of the derivatized stationary phase. This dynamically coated stationary phase exhibited mostly better selectivity and resolution than a commercial chemically bonded β -cyclodextrin stationary phase. Mixtures of analytes were baseline resolved in shorter analysis time. Furthermore, interactions participating in the retention mechanism were identified using a linear free energy relationship approach and ionic interaction study. Lower hydrophobicity and higher ability to interact as hydrogen bond donor affect retention on the coated stationary phase. Even though the ionic interaction study confirmed that the surface of the ion-exchanger was modified by dynamic coating, the ionic interactions still contributed to the retention mechanism on the coated stationary phase.

Celá práce je uvedena v přiložených publikacích.

6.3 Publikace III

Sulfobutylether- β -cyklodextrin v roli chirálního selektoru pro separaci aminokyselin a dipeptidů v HPLC

Chirální selektory cyklodextriny, o nichž je podrobněji pojednáno výše (kap. 4.2.1), stále velmi dobře slouží pro účely (enantio)separací nejen v HPLC. I toto je důvodem, proč se provádí derivatizace nativních cyklodextrinů a syntetizují se nové deriváty, které jsou účelně navrhovány pro další aplikace.

Jedním z derivátů cyklodextrinu se zajímavými vlastnostmi je SBE- β -CD, komerčním označením Captisol[®]. Captisol[®] je sedmkrát substituovaný preparát, umožňující tvorbu komplexu s léčivem, čímž je zajištěno cílené doručení léčiva v organismu. Pro použití v oblasti separačních metod lze kladně nabitý derivatizovaný cyklodextrin ukotvit na opačně nabitou SF dynamickým pokrytím, o kterém je pojednáno v kapitole 4.3.

Publikace III srovnává dva přístupy, kterými lze docílit vytvoření vhodného chirálního separačního systému:

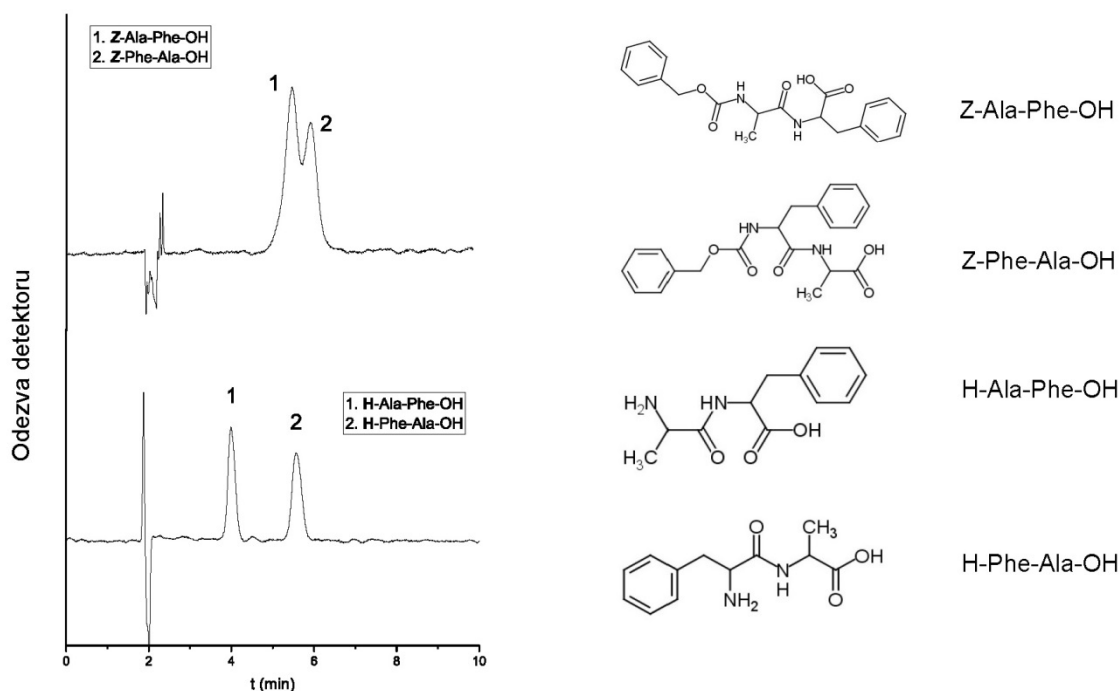
1. Dynamické pokrývání silné aniontově-výměnné SF SBE- β -CD
2. SBE- β -CD jako aditivum MF

Pro porovnání bylo testováno celkem 23 chirálních analytů (aminokyselin a jejich derivátů) a 9 směsí dipeptidů (achirální separace). MF byly tvořeny vždy organickým modifikátorem (MEOH) a jednou z níže uvedených vodných složek v různých objemových poměrech (v/v):

- A. deionizovaná voda
- B. vodný roztok kyseliny mravenčí, pH 2,1
- C. octanový pufr, pH 4,7
- D. octanový pufr, pH 8,8

SF připravená dynamickým pokrýváním byla vhodná pro celkem 9 chirálních analytů, u nichž bylo docíleno enantioseparace na základní linii. Doba analýzy nepřekročila 17 minut. Sedm chirálních analytů bylo možné separovat částečně, tedy s rozlišením 0,45 – 1,35. Nejvhodnější MF pro většinu analytů byla tvořena MEOH a vodným roztokem kyseliny mravenčí o pH 2,1. Většina analytů je za podmínek výše uvedené MF kladně nabitá, což významně přispívá k jejich separaci. Předpokladem je tvorba iontových

interakcí mezi kladně nabitým analytem a záporně nabitým chirálním selektorem ukotveným na SF. Captisol[®]em pokrytá SF je dále vhodná pro achirální separaci pěti směsí dipeptidů až na základní linii. Další čtyři směsi bylo možné separovat částečně s rozlišením do 0,93. Negativní efekt pro separaci této skupiny látek má hydrofobní *Z*-substituent, blokující amino skupinu v molekule dipeptidu. Tento efekt je znázorněn na Obrázku 7.



Obr. 7. Chromatogramy separace na SBE- β -CD pokryté SF, analyty *Z*-Ala-Phe-OH/*Z*-Phe-Ala-OH a H-Ala-Phe-OH/H-Phe-Ala-OH, MF MEOH/kyselina mravenčí pH 2,1 (10/90) (*v/v*), průtok MF 1 ml·min⁻¹, UV detekce.

V případě využití SBE- β -CD jako aditiva MF dochází ke snížení separační schopnosti systému pro daný soubor chirálních analytů. Důkazem je pouze jedna enantioseparace na základní linii a dvě částečné enantioseparace. Diametrálně odlišných výsledků bylo docíleno na souboru směsí dipeptidů – celkem sedm směsí bylo možné separovat na základní linii a jednu směs částečně.

Oba dva separační systémy se vzájemně doplňují, nicméně je třeba zdůraznit jistou výhodu pokrývací procedury před přidavkem selektoru do MF, kterou je bezesporu několikanásobně nižší spotřeba chirálního selektoru.

Sulfobutylether- β -cyclodextrin as a chiral selector for separation of amino acids and dipeptides in chromatography

Kučerová, G., Procházková, H., Kalíková, K., Tesařová, E.

Journal of Chromatography A 2016, 1467, 356-362

doi:10.1016/j.chroma.2016.07.061

Abstrakt

Various amino acids, dipeptides and their isomers were (enantio)separated using sulfobutylether- β -cyclodextrin as a chiral selector. Two different approaches were employed: first, dynamic coating of sulfobutylether- β -cyclodextrin onto a strong anion-exchange stationary phase and, second, use of sulfobutylether- β -cyclodextrin as a mobile phase additive in a separation system with a C18 column. Measurements were carried out using RP-HPLC and hydrophilic interaction liquid chromatography. Mobile phases composed of organic modifier (methanol) and four different aqueous parts: (i) deionized water, (ii) an aqueous solution of formic acid (pH 2.1), (iii) ammonium acetate buffer (pH 4.7), and (iv) ammonium acetate buffer (pH 8.8) in various volume ratios. Under these separation conditions, out of 23 chiral analytes, 9 were baseline enantio-resolved and 7 were partially separated. Of 9 mixtures of dipeptide isomers, 8 were baseline-separated. Sulfobutylether- β -cyclodextrin proved to be suitable for the separation of chiral and also achiral analytes. The use of sulfobutylether- β -cyclodextrin as a dynamic coating agent or as a mobile phase additive depends on the particular chromatographic system and analytes of interest.

Celá práce je uvedena v přiložených publikacích.

6.4 Publikace IV

Efekt složení mobilní fáze na retenci a separaci v achirálních a chirálních separačních systémech HPLC

Jak již bylo uvedeno výše, chování analytů v separačním systému HPLC je rovněž významně ovlivňováno MF. Vliv složení MF na retenci a (enantio)separaci látek v HPLC byl sledován na β -cyklodextrinové SF. Použité separační systémy byly charakterizovány metodou LFER, o níž je podrobněji pojednáno v kapitole 5.1.

Je obecně známo, že schopnost analytů interagovat s kavitou cyklodextrinu (vytvářet inkluzní komplex), bývá předpokladem jejich úspěšné separace. Nicméně schopnost komplexace analytu s kavitou cyklodextrinu může být velmi negativně ovlivněna nevhodně zvolenou složkou MF, vzhledem ke kompetici analytu se složkou MF o danou interakci se SF. V extrémním případě pak dochází ke znemožnění (enantio)separace. Publikace IV jasně dokazuje, jak různé komponenty MF ovlivňují separační systém.

Experimenty byly provedeny na koloně CYCLOBONDTM I 2000 v RP módu HPLC. MF byly složeny z organického modifikátoru MEOH a pufru:

- A. Hydroxid lithný/kyselina benzoová 10,0/24,5 mM, pH 4,00
- B. Hydroxid lithný/kyselina mravenčí 10,0/15,2 mM, pH 4,01
- C. Hydroxid lithný/kyselina octová 9,9/60,0 mM, pH 4,01

Pro vyšetření interakcí metodou LFER byly uvažovány pouze pufrы A a C. Složení MF MEOH/pufr (40/60) (v/v). Pro LFER studii bylo využito sady celkem 32 achirálních analytů.

Analyty, na nichž bylo demonstrováno ovlivnění separačního mechanismu, byly achirální povahy - toluen, naftalen a antracen, i chirální povahy - thioridazin, prometazin, oxazepam, lorazepam a atropoizomery 1,1'-binaftalen-2,2'-diyl hydrogen fosfátu.

Získaná chromatografická data pro vyšetření ovlivnění (enantio)separace různým typem pufru lze interpretovat následovně:

- Pufr obsahující kyselinu octovou či mravenčí se jeví jako velmi málo či nekomplexující s kavitou cyklodextrinu.
- Pufr s kyselinou benzoovou silně komplexuje s cyklodextrinovou kavitou.

Výsledky LFER jsou uvedeny v Tabulce 4 a lze je shrnout takto:

Tabulka 4. Regresní koeficienty LFER rovnice.

Vodná složka MF	Model	<i>e</i>	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>v</i>	<i>c</i>	<i>SE</i>	<i>F</i>	<i>R</i>
Benzoátový pufr	C.M.	0,42	x	x	-0,89	0,78	-0,67	0,18	64	0,96
	<i>p</i> -value	0,00	0,91	0,30	0,00	0,00	0,00			
	± CI	0,15			0,16	0,27	0,23			
Acetátový pufr	C.M.	0,40	x	x	-1,41	1,32	-0,62	0,52	44	0,95
	<i>p</i> -value	0,00	0,70	0,80	0,00	0,00	0,00			
	± CI	0,26			0,28	0,46	0,39			

SE-standardní odchylka, *F*-testovací hodnoty, *R*-korelační koeficient, CI-reprezentuje ±95% interval spolehlivosti, x- statisticky nevýznamný rozdíl interakce solutu s MF a SF, *p*-value-statistická *p*-hodnota.

- Regresní koeficient *e* (interakce s n- a π -elektrony) je pro oba separační systémy zanedbatelný.
- Regresní koeficienty *s* (polarizovatelnost) a *a* (bazicita H-vazby) jsou statisticky nevýznamné pro oba pufrы.
- Regresní koeficient *b* (acidita H-vazby) s negativní hodnotou v obou separačních systémech značí, že tento typ interakce je preferován v MF. Vyšší negativní hodnota pro benzoátový pufr ukazuje, že kyselina benzoová v důsledku omezuje komplexaci analytů s β -cyklodextrinovou CSF.
- Regresní koeficient *v* (disperzní interakce) měl pro oba separační systémy kladnou hodnotu, přičemž pro benzoátový pufr byl nižší, než při použití kyseliny octové jako složky pufru. Vzhledem k vyšší hydrofobicitě kyseliny benzoové, v porovnání s kyselinou octovou [72], dochází ke konkurenční inkorporaci kyseliny benzoové do kavity cyklodextrinu. Důsledkem je omezená možnost analytu interagovat s kavitou cyklodextrinu.

Výsledky potvrdily silnou komplexaci kyseliny benzoové s cyklodextrinem. Tento fakt se odrazil ve snížené retenci a zhoršené enantioseparační schopnosti separačního systému s kyselinou benzoovou v MF.

Tato studie potvrzuje fakt, že při vývoji metody je potřeba brát v úvahu nejen SF, ale i složení MF, respektive pufru s ohledem na povahu SF.

Effect of Buffer Constituents on Retention and Separation in Achiral and Chiral HPLC systems with β -Cyclodextrin-Based Stationary Phase

Kučerová, G., Kalíková, K., Riesová, M., Tesařová, E.

Chromatographia 2014, 78, 917-921

doi:10.1007/s10337-014-2834-2

Abstrakt

In HPLC, cyclodextrin-based stationary phases allow separation of both achiral and chiral analytes. Complexation of analytes into the cyclodextrin cavity is a very important part of the interaction mechanism. However, possible complexation of buffer constituents must be also considered. This fact should not be overlooked in method development procedures. In this study, β -cyclodextrinbased stationary phase (CYCLOBOND I 2000) was used, and two different buffers, namely aqueous solutions composed of lithium hydroxide/benzoic acid 10.0/24.5 mM, pH 4.00 and lithium hydroxide/acetic acid 9.9/60.0 mM, pH 4.01 of the same ionic strength were compared. Methanol was added as organic modifier in a methanol/buffer volume ratio 40/60. The linear free energy relationship method was used for evaluation of interactions contributing to chromatographic performance of the separation system. Strong complexation of benzoic acid with cyclodextrin was obvious from the results. This effect was clearly reflected in reduced retention and restricted (enantio) separation ability of the separation system containing benzoic acid in the buffer. On the other hand, complexing buffer constituents of mobile phases can offer a worthy alternative, to less “green”organic solvents, for reduction of the analysis time.

Celá práce je uvedena v příložených publikacích.

6.5 Publikace V

Enantioselektivní potenciál polysacharidových chirálních stacionárních fází v superkritické fluidní chromatografii

CSF používané v HPLC lze též uplatnit pro separace ve SFC. Soubor 52 biologicky aktivních látek byl použit k porovnání separačního potenciálu dvou polysacharidových SF ve SFC. SF byly tvořeny chirálními selektory imobilizovanými na 2,5 μm silikagelových částicích. Konkrétně se jednalo o tris-(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulózy či amyulózy. Byl vyšetřen vliv typu polysacharidu, rozdílného organického modifikátoru a aditiva MF na retenci a enantioseparaci.

MF byly složeny z CO_2 , organického modifikátoru (MEOH nebo propan-2-ol) a z aditiva (isopropylaminu a/nebo kyseliny trifluoroctové (TFA)). Na základě získaných výsledků lze říci, že SF obsahující derivát amyulózy je vhodnější pro enantioseparaci daného souboru 52 analytů než CSF s derivátem celulózy. Tabulka 5 zachycuje nalezené optimální separační podmínky.

Celkem bylo docíleno enantioseparace 45 analytů na základní linii a částečné separace 4 analytů, v podstatě bez další optimalizace zpětného tlaku a teploty ve SFC systému. Komplementární chování separačních systémů využívajících CSF s odlišnou základní polysacharidovou kostrou lze demonstrovat na separaci dvou léčiv ze skupiny profenů, flurbiprofenu a indoprofenu – viz Obrázek 8.

Z Obrázku 8 je patrné, že enantiomery flurbiprofenu byly rozděleny na koloně s amyulózovým derivátem (AMY1), zatímco celulózový derivát (CEL1) nebyl pro danou enantioseparaci vůbec vhodný. Opačná situace nastala při analýze indoprofenu, přestože se jednalo o derivát ze stejné skupiny analytů. V druhém případě bylo dosaženo enantioseparace na základní linii na CSF CEL1. Naopak CSF AMY1 se za daných podmínek jevila pro indoprofen méně vhodná. Všechny analýzy jsou srovnávány při stejném složení MF: $\text{CO}_2/\text{MEOH}/\text{TFA}$ (90/10/0,1) (v/v/v).

Tabulka 5. Optimalizované separační podmínky.

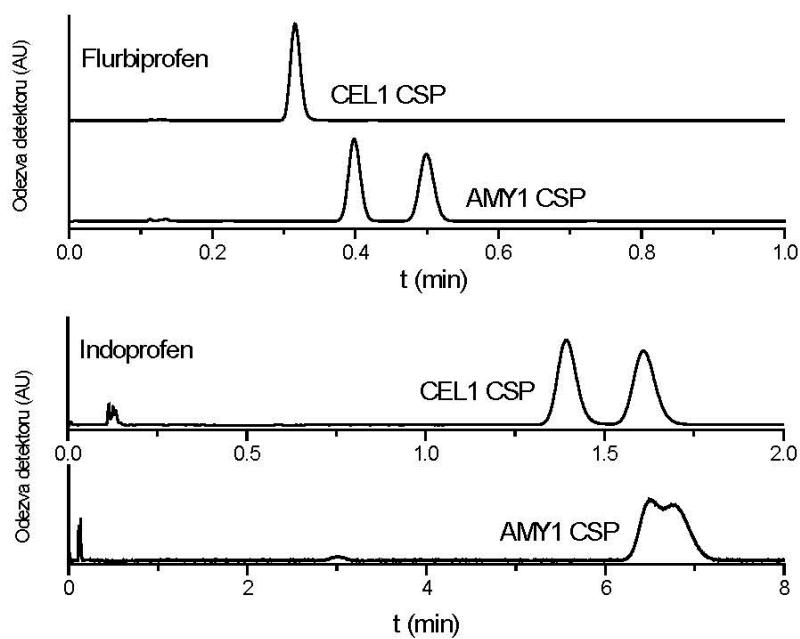
Skupina analytů/Analyt		$t_{R,1}$ (min)	k_1	α	R_s	Složení MF (v/v/v(v))	CSF
Deriváty profenu	Tiaprofenová kyselina	3,24	28,5	1,86	6,71	C/P/I/T (95/5/0,1/0,1)	AMY1
	Karprufen	5,42	47,0	1,20	2,34	C/M/I/T (90/10/0,1/0,1)	AMY1
	Suprofen	1,17	9,42	1,26	2,55	C/M/T (90/10/0,1)	AMY1
Flavanony	6-hydroxyflavanon	1,73	15,0	1,48	3,86	C/P/I/T (90/10/0,1/0,1)	AMY
	7-hydroxyflavanon	1,55	13,4	1,18	1,80	C/P/I/T (90/10/0,1/0,1)	AMY
Thiazidová diuretika	Butizid	2,69	19,4	1,52	4,73	C/M/I/T (90/10/0,1/0,1)	CEL1
	Mefrusid	2,63	22,9	1,70	3,85	C/M/I (90/10/0,1)	AMY1
Blokátory Ca ²⁺ kanálů	Amlodipin	7,16	52,8	1,24	1,70	C/P/I/T (95/5/0,1/0,1)	CEL1
	Verapamil	0,73	4,50	1,28	1,87	C/M/I/T (90/10/0,1/0,1)	CEL1
	Nisoldipin	8,00	58,8	1,09	1,23	C/P/I (98/2/0,1)	CEL1
Deriváty benzofuranu	5-(2-aminopropyl)benzofuran	1,45	9,99	1,24	1,80	C/P/I/T (95/5/0,1/0,1)	CEL1
	6-(2-aminopropyl)benzofuran	1,45	9,93	1,23	1,68	C/P/I/T (95/5/0,1/0,1)	CEL1
	5-(2-aminopropyl)-2,3-dihydrobenzofuran	2,71	19,7	1,92	7,33	C/M/I (98/2/0,1)	CEL1
	6-(2-aminopropyl)-2,3-digydrobenzofuran B4	0,54	3,05	1,50	2,42	C/P/I/T (90/10/0,1/0,1)	CEL1
	1-(benzofuran-5-yl)-N-ethylpropan-2-amin	1,99	16,0	1,24	2,38	C/P/I (95/5/0,1)	AMY1
	1-(benzofuran-5-yl)-N-methylpropan-2-amin	2,92	24,0	1,19	2,07	C/P/I (95/5/0,1)	AMY1
β-blokátory	Propranolol	0,80	5,09	2,00	6,36	C/M/I/T (90/10/0,1/0,1)	CEL1
	Oxprenolol	0,31	1,35	2,44	4,14	C/M/I/T (90/10/0,1/0,1)	CEL1
	Metoprolol	0,28	1,13	4,02	5,00	C/M/I/T (90/10/0,1/0,1)	CEL1
	Pindolol	2,01	14,3	4,46	14,2	C/M/I/T (90/10/0,1/0,1)	CEL1
	Bopindolol	1,76	12,3	1,72	5,66	C/M/I/T (90/10/0,1/0,1)	CEL1

C–CO₂, M–methanol, P–propan-2-ol, I–isopropylamin, T–trifluoroctová kyselina; $t_{R,1}$ –retenční čas prvního eluovaného enantiomeru, k_1 –retenční faktor prvního eluovaného enantiomeru, α –selektivita, R_s –rozlišení.

Na základě získaných výsledků lze zobecnit nejvhodnější složení separačních systémů:

- CEL1 CSF s propan-2-olem jako organickým modifikátorem a za použití obou aditiv, tedy isopropylaminu a TFA.
- AMY1 CSF s MEOH jako organickým modifikátorem a isopropylaminem jako aditivem.

Kombinace těchto dvou CSF může být považována za účinný nástroj vhodný pro enantioseparace strukturálně odlišných biologicky aktivních látek.



Obr. 8. Chromatogramy separace na dvou polysacharidových CSF CEL1 a AMY1 ve SFC, analyty: flurbiprofen a indoprofen, MF: CO₂/MEOH/TFA (90/10/0,1) (v/v/v), průtok MF 2,5 ml/min, zpětný tlak 2000 psi, teplota kolony 35°C, teplota vzorků 10°C, UV detekce.

**Enantioselective potential of polysaccharide-based chiral stationary phases in
supercritical fluid chromatography**

Kucerova, G., Kalikova, K., Tesarova, E.

Chirality 2017, 29, 239-246

doi:10.1002/chir.22701

Abstrakt

The enantioselective potential of two polysaccharide-based chiral stationary phases for analysis of chiral structurally diverse biologically active compounds was evaluated in supercritical fluid chromatography using a set of 52 analytes. The chiral selectors immobilized on 2.5 μm silica particles were tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) derivatives of cellulose or amylose. The influence of the polysaccharide backbone, different organic modifiers, and different mobile phase additives on retention and enantioseparation was monitored. Conditions for fast baseline enantioseparation were found for the majority of the compounds. The success rate of baseline and partial enantioseparation with cellulose-based chiral stationary phase was 51.9% and 15.4%, respectively. Using amylose-based chiral stationary phase we obtained 76.9% of baseline enantioseparations and 9.6% of partial enantioseparations of the tested compounds. The best results on cellulose-based chiral stationary phase were achieved particularly with propane-2-ol and a mixture of isopropylamine and trifluoroacetic acid as organic modifier and additive to CO_2 , respectively. Methanol and basic additive isopropylamine were preferred on amylose-based chiral stationary phase. The complementary enantioselectivity of the cellulose- and amylose-based chiral stationary phases allows separation of the majority of the tested structurally different compounds. Separation systems were found to be directly applicable for analyses of biologically active compounds of interest.

Celá práce je uvedena v příložených publikacích.

7. Závěr

Předkládaná dizertační práce se věnovala odlišným chirálním a achirálním chromatografickým separačním systémům, přípravě a testování nových CSF na bázi cyklodextrinů, a dále popisu interakcí, které se uplatňují v separačním mechanismu výše zmíněných separačních systémů v HPLC a SFC.

Byly vyšetřeny CSF na bázi makrocyclických antibiotik a derivatizované polysacharidové fáze pro dělení enantiomerů aminokyselin v HPLC, přičemž byly nalezeny vhodné podmínky pro separaci téměř všech analytů ze zkoumané sady. Z optimalizovaných chromatografických systémů se pro separaci skupiny nederivatizovaných aminokyselin jevila jako nejvhodnější CSF na bázi makrocyclických antibiotik, konkrétně teikoplaninová CSF, kolona Chirobitoic T[®]. Obtížnější bylo dělení enantiomerů v případech, kdy amino-skupina aminokyseliny byla blokována.

Polysacharidové CSF byly testovány pro soubor 52 biologicky aktivních látek ve SFC. Celkem 45 analytů bylo úspěšně rozděleno na základní linii, přičemž byl dále vyšetřen vliv typu polysacharidové kostry, rozdílného organického modifikátoru a aditiva MF na retenci a enantioseparaci.

Testování nové SBE- β -CD CSF připravené pomocí dynamického pokrývání bylo provedeno na sadě 23 chirálních analytů a 9 achirálních směsí dipeptidů. Enantioseparační schopnost nově připravené CSF byla porovnána se separačním systémem, kde bylo použito SBE- β -CD jako aditiva MF. Podle získaných výsledků lze považovat nově připravenou SF vhodnější pro separaci chirálních analytů, zatímco využití chirálního selektoru jako aditiva MF má výhodu v případě achirálních separací směsí dipeptidů.

Společně s přípravou nových SF je vhodné provádět charakterizaci těchto fází, neboť znalost separačního mechanismu významně usnadňuje optimalizaci separace. Ve spolupráci

s organickými syntetiky, byla připravena metodou dynamického pokrývání nová SF. Komerčně dostupná iontově-výměnná SF byla modifikována připraveným derivátem β -cyklodextrinu se dvěma kladnými náboji. Nová fáze byla testována pro separace celkem sedmi směsí achirálních analytů. Separační schopnost nově připravené SF byla porovnána s komerčně dostupnou β -cyklodextrinovou SF. Pro charakterizaci a porovnání intermolekulárních interakcí, které jsou dominující pro oba separační systémy, byla použita metoda LFER a studie iontových interakcí. Srovnání ukázalo úspěšnost procedury dynamického pokrývání, jejímž výsledkem byla lepší separační schopnost nově připravené fáze. V neposlední řadě je třeba zmínit výhodu dynamického pokrývání, která spočívá v možnosti jednoduché výměny chirálního selektoru na povrchu nosiče za jiný.

Problematika vlivu složení MF na retenci a separaci pro chirální i achirální chromatografické systémy s β -cyklodextrinovými SF byla rovněž vyšetřena pomocí metody LFER. Výsledky studie potvrdily silnou komplexaci některých složek MF s cyklodextrinem, která negativně ovlivnila enantioseparaci. Ze získaných výsledků tedy vyplývá, že je třeba při vývoji a optimalizaci metody uvažovat nejen povahu SF, ale i složení MF.

Použitá literatura

- [1] K. Kalikova, T. Slechtova, J. Vozka, E. Tesarova, Supercritical fluid chromatography as a tool for enantioselective separation; A review, *Analytica Chimica Acta*, 821 (2014) 1-33.
- [2] G.K.E. Scriba, Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences, *Chromatographia*, 75 (2012) 815-838.
- [3] J. Zhou, J. Tang, W.H. Tang, Recent development of cationic cyclodextrins for chiral separation, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 65 (2015) 22-29.
- [4] D. Sykora, J. Vozka, E. Tesarova, Chromatographic methods enabling the characterization of stationary phases and retention prediction in high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography, *Journal of Separation Science*, 39 (2016) 115-131.
- [5] Y. Zhang, D.R. Wu, D.B. Wang-Iverson, A.A. Tymiak, Enantioselective chromatography in drug discovery, *Drug Discovery Today*, 10 (2005) 571-577.
- [6] G. Kucerova, K. Kalikova, E. Tesarova, Enantioselective potential of polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography, *Chirality*, 29 (2017) 239-246.
- [7] R. Geryk, K. Kalikova, M.G. Schmid, E. Tesarova, Enantioselective separation of biologically active basic compounds in ultra-performance supercritical fluid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 932 (2016) 98-105.
- [8] V. Desfontaine, D. Guillaume, E. Francotte, L. Novakova, Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113 (2015) 56-71.
- [9] K. De Klerck, D. Mangelings, Y.V. Heyden, Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69 (2012) 77-92.
- [10] C. West, M. Cieslikiewicz-Bouet, K. Lewinski, I. Gillaizeau, Enantiomeric Separation of Original Heterocyclic Organophosphorus Compounds in Supercritical Fluid Chromatography, *Chirality*, 25 (2013) 230-237.
- [11] L. Novakova, M. Dousa, General screening and optimization strategy for fast chiral separations in modern supercritical fluid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 950 (2017) 199-210.
- [12] E. Lemasson, S. Bertin, C. West, Use and practice of achiral and chiral supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis and purification, *Journal of Separation Science*, 39 (2016) 212-233.
- [13] D. Wolrab, M. Kohout, M. Boras, W. Lindner, Strong cation exchange-type chiral stationary phase for enantioseparation of chiral amines in subcritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1289 (2013) 94-104.
- [14] D. Wolrab, P. Macíková, M. Boras, M. Kohout, W. Lindner, Strong cation exchange chiral stationary phase—A comparative study in high-performance liquid chromatography and subcritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1317 (2013) 59-66.
- [15] A.G.G. Perrenoud, C. Hamman, M. Goel, J.L. Veuthey, D. Guillaume, S. Fekete, Maximizing kinetic performance in supercritical fluid chromatography using state-of-the-art instruments, *Journal of Chromatography A*, 1314 (2013) 288-297.
- [16] C. West, Enantioselective Separations with Supercritical Fluids - Review, *Current Analytical Chemistry*, 10 (2014) 99-120.

- [17] T.J. Ward, K.D. Ward, Chiral Separations: A Review of Current Topics and Trends, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 626-635.
- [18] M. Dolezalova, M. Tkaczykova, HPLC enantioselective separation of aromatic amino and hydrazino acids on a teicoplanin stationary phase and the enantiomeric purity determination of L-isomers used as drugs, *Chirality*, 11 (1999) 394-403.
- [19] M. Schlauch, O. Kos, A.W. Frahm, Comparison of three chiral stationary phases with respect to their enantio- and diastereoselectivity for cyclic beta-substituted alpha-amino acids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27 (2002) 409-419.
- [20] I. Ali, K. Kumerer, H.Y. Aboul-Enein, Mechanistic principles in chiral separations using liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Chromatographia*, 63 (2006) 295-307.
- [21] I. Ilisz, A. Aranyi, Z. Pataj, A. Peter, Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69 (2012) 28-41.
- [22] M. Honetschlagerova-Vadinska, S. Srkalova, Z. Bosakova, P. Coufal, E. Tesarova, Comparison of enantioselective HPLC separation of structurally diverse compounds on chiral stationary phases with different teicoplanin coverage and distinct linkage chemistry, *Journal of Separation Science*, 32 (2009) 1704-1711.
- [23] M. Lammerhofer, Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 814-856.
- [24] J. Koidl, H. Hodl, M.G. Schmid, B. Neubauer, M. Konrad, S. Petschauer, G. Gubitz, Enantiorecognition of triiodothyronine and thyroxine enantiomers using different chiral selectors by HPLC and micro-HPLC, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (2008) 1254-1260.
- [25] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Peter, HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: A review, *Journal of Separation Science*, 29 (2006) 1305-1321.
- [26] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Peter, Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 1845-1860.
- [27] T.L. Xiao, E. Tesarova, J.L. Anderson, M. Egger, D.W. Armstrong, Evaluation and comparison of a methylated teicoplanin aglycone to teicoplanin aglycone and natural teicoplanin chiral stationary phases, *Journal of Separation Science*, 29 (2006) 429-445.
- [28] Z. Deakova, Z. Durackova, J. Lehotay, Separation of Enantiomers of Proteinogenic Amino Acids on Teicoplanin Stationary Phases, *Chemické Listy*, 108 (2014) 436-441.
- [29] D.W. Armstrong, W. Demond, CYCLODEXTRIN BONDED PHASES FOR THE LIQUID-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF OPTICAL, GEOMETRICAL, AND STRUCTURAL ISOMERS, *Journal of Chromatographic Science*, 22 (1984) 411-415.
- [30] J. Debowski, J. Jurczak, D. Sybilska, RESOLUTION OF SOME CHIRAL MANDELIC-ACID DERIVATIVES INTO ENANTIOMERS BY REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHY VIA ALPHA-CYCLODEXTRIN AND BETA-CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES, *Journal of Chromatography*, 282 (1983) 83-88.
- [31] P.K. Owens, A.F. Fell, M.W. Coleman, J.C. Berridge, Chiral recognition in liquid chromatography utilising chargeable cyclodextrins for resolution of doxazosin enantiomers, *Chirality*, 9 (1997) 184-190.

- [32] X.H. Lai, W.H. Tang, S.C. Ng, Novel cyclodextrin chiral stationary phases for high performance liquid chromatography enantioseparation: Effect of cyclodextrin type, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5597-5601.
- [33] Y. Xiao, S.C. Ng, T.T.Y. Tan, Y. Wang, Recent development of cyclodextrin chiral stationary phases and their applications in chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1269 (2012) 52-68.
- [34] B.Y. Hui, M. Raoov, N.N.M. Zain, S. Mohamad, H. Osman, Combination of Cyclodextrin and Ionic Liquid in Analytical Chemistry: Current and Future Perspectives, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 47 (2017) 454-467.
- [35] K. Kalikova, T. Slechtova, E. Tesarova, Cyclic Oligosaccharide-Based Chiral Stationary Phases Applicable to Drug Purity Control; A Review, *Current Medicinal Chemistry*, 24 (2017) 829-848.
- [36] G.K.E. Scriba, Chiral recognition in separation science - an update, *Journal of Chromatography A*, 1467 (2016) 56-78.
- [37] J. Szejtli, Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chemical Reviews*, 98 (1998) 1743-1753.
- [38] G. Kucerova, K. Kalikova, M. Riesova, E. Tesarova, Effect of Buffer Constituents on Retention and Separation in Achiral and Chiral HPLC Systems with beta-Cyclodextrin-Based Stationary Phase, *Chromatographia*, 78 (2015) 917-921.
- [39] K. Kalikova, M. Riesova, E. Tesarova, Recent chiral selectors for separation in HPLC and CE, *Central European Journal of Chemistry*, 10 (2012) 450-471.
- [40] H. Tabani, M. Mahyari, A. Sahragard, A.R. Fakhari, A. Shaabani, Evaluation of sulfated maltodextrin as a novel anionic chiral selector for the enantioseparation of basic chiral drugs by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 36 (2015) 305-311.
- [41] G. Pedehontaa-Hiaa, M. Guerrouache, B. Carbonnier, F. Le Derf, C.J. Morin, Layer-by-Layer Assemblies Based on a Cationic beta-Cyclodextrin Polymer: Chiral Stationary Phases for Open-Tubular Electrochromatography, *Chromatographia*, 78 (2015) 533-541.
- [42] M. Malanga, I. Fejos, E. Varga, G. Benkovics, A. Darcsi, J. Szeman, S. Beni, Synthesis, analytical characterization and capillary electrophoretic use of the single-isomer heptakis-(6-O-sulfobutyl)-beta-cyclodextrin, *Journal of Chromatography A*, 1514 (2017) 127-133.
- [43] M. Popr, S. Hybelbauerova, J. Jindrich, A complete series of 6-deoxy-monosubstituted tetraalkylammonium derivatives of alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrin with 1, 2, and 3 permanent positive charges, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 10 (2014) 1390-1396.
- [44] G. Kucerova, K. Kalikova, H. Prochazkova, M. Popr, J. Jindrich, P. Coufal, E. Tesarova, Chromatographic Characterization of a New Cationic beta-CD Based Stationary Phase Prepared by Dynamic Coating, *Chromatographia*, 79 (2016) 529-536.
- [45] G. Kucerova, H. Prochazkova, K. Kalikova, E. Tesarova, Sulfobutylether-beta-cyclodextrin as a chiral selector for separation of amino acids and dipeptides in chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1467 (2016) 356-362.
- [46] F. Suss, W. Poppitz, C.E. Sanger-van de Griend, G.K.E. Scriba, Influence of the amino acid sequence and nature of the cyclodextrin on the separation of small peptide enantiomers by capillary electrophoresis using randomly substituted and single isomer sulfated and sulfonated cyclodextrins, *Electrophoresis*, 22 (2001) 2416-2423.

- [47] B. Chankvetadze, G. Endresz, G. Blaschke, ABOUT SOME ASPECTS OF THE USE OF CHARGED CYCLODEXTRINS FOR CAPILLARY ELECTROPHORESIS ENANTIOSEPARATION, *Electrophoresis*, 15 (1994) 804-807.
- [48] C. Perrin, M.G. Vargas, Y. Vander Heyden, M. Maftouh, D.L. Massart, Fast development of separation methods for the chiral analysis of amino acid derivatives using capillary electrophoresis and experimental designs, *Journal of Chromatography A*, 883 (2000) 249-265.
- [49] J. Guan, J. Yang, Y.J. Bi, S. Shi, F. Yan, F. Li, Determination of the enantiomeric impurity in S-(-)pantoprazole using high performance liquid chromatography with sulfobutylether-beta-cyclodextrin as chiral additive, *Journal of Separation Science*, 31 (2008) 288-293.
- [50] A.D. Kulkarni, V.S. Belgamwar, Inclusion complex of chrysin with sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin (Captisol (R)): Preparation, characterization, molecular modelling and in vitro anticancer activity, *J. Mol. Struct.*, 1128 (2017) 563-571.
- [51] R. Geryk, K. Kalikova, J. Vozka, E. Tesarova, Immobilized Polysaccharide-Based Stationary Phases for Enantioseparation in Normal Versus Reversed Phase HPLC, *Chromatographia*, 78 (2015) 909-915.
- [52] B. Chankvetadze, Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers, *Journal of Chromatography A*, 1269 (2012) 26-51.
- [53] R. Geryk, J. Vozka, K. Kalikova, E. Tesarova, HPLC Method for Chiral Separation and Quantification of Antidepressant Citalopram and Its Precursor Citadiol, *Chromatographia*, 76 (2013) 483-489.
- [54] F. Bressolle, M. Audran, T.N. Pham, J.J. Vallon, Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: Basic principles and new developments, *Journal of Chromatography B*, 687 (1996) 303-336.
- [55] R.Q. Wang, T.T. Ong, W.H. Tang, S.C. Ng, Cationic cyclodextrins chemically-bonded chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 718 (2012) 121-129.
- [56] A. Cavazzini, L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti, F. Dondi, Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review, *Analytica Chimica Acta*, 706 (2011) 205-222.
- [57] J.L. Guo, Q.X. Zhang, Z. Yao, X.L. Zhao, D.N. Ran, J. Crommen, Z.J. Jiang, One-step strategy for the synthesis of a derivatized cyclodextrin-based monolithic column, *Journal of Separation Science*, 37 (2014) 1720-1727.
- [58] M.G. Schmid, K. Schreiner, D. Reisinger, G. Gubitz, Fast chiral separation by ligand-exchange HPLC using a dynamically coated monolithic column, *Journal of Separation Science*, 29 (2006) 1470-1475.
- [59] Z.L. Chen, K. Uchiyama, T. Hobo, Chemically modified chiral monolithic silica column prepared by a sol-gel process for enantiomeric separation by micro high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 942 (2002) 83-91.
- [60] V.A. Davankov, A.S. Bochkov, A.A. Kurganov, P. Roumeliotis, K.K. Unger, DEALING WITH THE LIGAND-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY .13. SEPARATION OF UNMODIFIED ALPHA-AMINO-ACID ENANTIOMERS BY REVERSE PHASE HPLC, *Chromatographia*, 13 (1980) 677-685.
- [61] M. Remelli, G. Pozzati, C. Conato, Direct chiral resolution of underivatized amino acids on a stationary phase dynamically modified with the ion-exchanger N'-decyl-L-spinacine, *Journal of Separation Science*, 38 (2015) 894-900.

- [62] M. Haroun, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, Reversal of the enantiomeric elution order of some aromatic amino acids using reversed-phase chromatographic supports coated with the teicoplanin chiral selector, *Talanta*, 68 (2006) 1032-1036.
- [63] Q.X. Zhang, J.L. Guo, Y. Xiao, J. Crommen, Z.J. Jiang, Comparative evaluation of a one-pot strategy for the preparation of beta-cyclodextrin-functionalized monoliths: Effect of the degree of amino substitution of beta-cyclodextrin on the column performance, *Journal of Separation Science*, 38 (2015) 1813-1821.
- [64] K. Kalikova, J. Lokajova, E. Tesarova, Linear free energy relationship as a tool for characterization of three teicoplanin-based chiral stationary phases under various mobile phase compositions, *Journal of Separation Science*, 29 (2006) 1476-1485.
- [65] M.H. Abraham, J.C. McGowan, THE USE OF CHARACTERISTIC VOLUMES TO MEASURE CAVITY TERMS IN REVERSED PHASE LIQUID-CHROMATOGRAPHY, *Chromatographia*, 23 (1987) 243-246.
- [66] M.H. Abraham, G.S. Whiting, R.M. Doherty, W.J. Shuely, HYDROGEN-BONDING .16. A NEW SOLUTE SOLVATION PARAMETER, π -2(H), FROM GAS-CHROMATOGRAPHIC DATA, *Journal of Chromatography*, 587 (1991) 213-228.
- [67] J. Ahn, J. Bones, Y.Q. Yu, P.M. Rudd, M. Gilar, Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 μ m sorbent, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878 (2010) 403-408.
- [68] K. Kalikova, P. Kozlik, M. Gilar, E. Tesarova, Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns, *Journal of Separation Science*, 36 (2013) 2421-2429.
- [69] L. Janeckova, K. Kalikova, J. Vozka, D.W. Armstrong, Z. Bosakova, E. Tesarova, Characterization of cyclofructan-based chiral stationary phases by linear free energy relationship, *Journal of Separation Science*, 34 (2011) 2639-2644.
- [70] A. Sievers-Engler, W. Lindner, M. Lammerhofer, Ligand-receptor binding increments in enantioselective liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1363 (2014) 79-88.
- [71] C. West, G. Guenegou, Y.R. Zhang, L. Morin-Allory, Insights into chiral recognition mechanisms in supercritical fluid chromatography. II. Factors contributing to enantiomer separation on tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) of amylose and cellulose stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 2033-2057.
- [72] G. Klopman, J.Y. Li, S.M. Wang, M. Dimayuga, COMPUTER AUTOMATED LOG P CALCULATIONS BASED ON AN EXTENDED GROUP-CONTRIBUTION APPROACH, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 34 (1994) 752-781.

Seznam publikací

Publikace I: Kučerová, G., Vozka, J., Kalíková, K., Geryk, R., Plecítá, D., Pajpanova, T., Tesařová, E., Enantioselective separation of unusual amino acids by high performance liquid chromatography, *Separation and Purification Technology* **2013**, 119, 123-128 (IF 3,359).

Publikace II: Kučerová, G., Kalíková, K., Procházková, H., Popr, M., Jindřich, J., Coufal, P., Tesařová, E., Chromatographic Characterization of a New Cationic β -CD Based Stationary Phase Prepared by Dynamic Coating, *Chromatographia* **2016**, 79, 529-536 (IF 1,402).

Publikace III: Kučerová, G., Procházková, H., Kalíková, K., Tesařová, E., Sulfobutylether- β -cyclodextrin as a chiral selector for separation of amino acids and dipeptides in chromatography, *Journal of Chromatography A* **2016**, 1467, 356-362 (IF 3,981).

Publikace IV: Kučerová, G., Kalíková, K., Riesová, M., Tesařová, E., Effect of Buffer Constituents on Retention and Separation in Achiral and Chiral HPLC systems with β -Cyclodextrin-Based Stationary Phase, *Chromatographia* **2014**, 78, 917-921 (IF 1,402).

Publikace V: Kucerova, G., Kalikova, K., Tesarova, E., Enantioselective potential of polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography, *Chirality* **2017**, 29, 239-246 (IF 1,956).

Publikace VI – nezahrnuta do práce: Kalíková, K., Boublík, M., Kučerová, G., Kozlík, P., The effect of buffer concentration and cation type in the mobile phase on retention of amino acids and dipeptides in hydrophilic interaction liquid chromatography, *Chemical Papers* **2017**, 72, 139-147 (IF 1,258).

Seznam konferenčních příspěvků - přednášky

Novel PEMPDA β -cyclodextrin stationary phase, Study of its separation potential

Gabriela Kučerová, Květa Kalíková, Jindřich Jindřich, Eva Tesařová

12th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, Brno, Česká republika, 2015

Jak ovlivnit (enantio)separaci v HPLC? Stacionární fáze *versus* mobilní fáze

Radim Geryk, Gabriela Kučerová, Květa Kalíková, Eva Tesařová

Česká chromatografická škola – HPLC 2015, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika, 2015

Amino acids and dipeptides (enantio)separations by sulfobutylether- β -cyclodextrin in HPLC

Gabriela Kučerová, Hana Procházková, Květa Kalíková, Eva Tesařová

Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiral 2016, Olomouc, Česká republika, 2016

Sulfobutylether- β -CD as a coating agent and mobile phase additive in chromatography

Gabriela Kučerová, Hana Procházková, Květa Kalíková, Eva Tesařová

16th CEEPUS Symposium and Summer School on Bioanalysis, Varšava, Polsko, 2016

Enantioselective potential of polysaccharide-based chiral stationary phases in SFC

Hana Procházková, Gabriela Kučerová, Květa Kalíková, Eva Tesařová

Česká chromatografická škola – HPLC 2017, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika, 2017

Seznam konferenčních příspěvků - plakátová sdělení

Effect of Buffer Constituents on Retention and Enantioseparation Properties of β -Cyclodextrin Stationary Phase

Gabriela Kučerová, Květa Kalíková, Martina Riesová, Eva Tesařová

14th CEEPUS Symposium and Summer School on Bioanalysis, Bratislava-Smolenice, Slovensko, 2014

Can buffer constituents affect retention and separation properties of separation systems with β -cyclodextrin?

Gabriela Kučerová, Květa Kalíková, Martina Riesová, Eva Tesařová

20th International Symposium on Separation Sciences, Praha, Česká republika, 2014

Buffer selection for CE measurements with neutral chiral selectors – cyclodextrins, cyclofructans and crown ethers

Martina Riesová, Milan Boublík, **Gabriela Kučerová**, Květa Kalíková, Eva Tesařová

30th International Symposium on Chromatography, Salzburg, Rakousko, 2014

Enantioseparation ability of β -cyclodextrin column with different buffer constituents

Gabriela Kučerová, Květa Kalíková, Martina Riesová, Eva Tesařová

30th International Symposium on Chromatography, Salzburg, Rakousko, 2014

The effect of buffer composition on LFER parameters for HPLC systems with β -cyclodextrin column

Květa Kalíková, **Gabriela Kučerová**, Martina Riesová, Eva Tesařová

30th International Symposium on Chromatography, Salzburg, Rakousko, 2014

Separation potential of novel PEMPDA- β -cyclodextrin stationary phase, comparison with commercially available β -cyclodextrin column

Gabriela Kučerová, Květa Kalíková, Eva Tesařová

42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Ženeva, Švýcarsko, 2015

Sulfobutylether- β -cyclodextrin as a chiral selector for HPLC separation

Gabriela Kučerová, Hana Procházková, Květa Kalíková, Eva Tesařová

44nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, San Francisco, CA, USA, 2016

Sulfobutylether- β -cyclodextrin as mobile phase additive for amino acids and dipeptides separation

Gabriela Kučerová, Hana Procházková, Květa Kalíková, Eva Tesařová

31st International Symposium on Chromatography, Cork, Irsko, 2016

Separation potential of novel sulfobutylether- β -cyclodextrin stationary phase

Hana Procházková, **Gabriela Kučerová**, Květa Kalíková, Eva Tesařová

31st International Symposium on Chromatography, Cork, Irsko, 2016

HPLC separation of amino acids and dipeptides by sulfobutylether- β -cyclodextrin as chiral selector

Hana Procházková, **Gabriela Kučerová**, Květa Kalíková, Eva Tesařová

16th CEEPUS Symposium and Summer School on Bioanalysis, Varšava, Polsko, 2016

Chiral Separations of Biologically Active Compounds in SFC

Gabriela Kučerová, Radim Geryk, Květa Kalíková

10th International Conference on Packed Column SFC, Vídeň, Rakousko, 2016

Enantioselective potential of polysaccharide-based chiral stationary phases in SFC

Gabriela Kučerová, Květa Kalíková, Eva Tesařová

Česká chromatografická škola – HPLC 2017, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika, 2017

Příložené publikace