

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



Využití HPLC v chirálních separacích IV.

Diplomová práce

Alois Daněk

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.
Hradec Králové, 2019

Prohlášení autora:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Všechna literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce **doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D.** za trpělivost, odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této diplomové práce.

Tato diplomová práce byla vytvořena za podpory projektu SVV 260 401.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Úvod do chiraloty.....	9
2.2. Izomerie a příslušné názvosloví.....	9
2.3. Význam chiraloty a chirálních separací.....	12
2.4. Metody používané k separaci enantiomerů.....	15
2.4.1. Krystalizace.....	15
2.4.2. Membrány.....	16
2.4.3. Liquid-liquid extrakce.....	17
2.3.4. Enzymaticko-kinetické rozlišení.....	17
2.4.5. Chromatografické metody.....	18
2.4.6. Kapilární elektroforéza.....	20
2.4.7. Superkritická fluidní chromatografie.....	20
2.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	21
2.6. Instrumentace.....	21
2.6.1. Zásobníky mobilní fáze.....	22
2.6.2. Vysokotlaké čerpadlo.....	23
2.6.3. Dávkovač vzorku.....	23
2.6.4. Kolona.....	24
2.6.5. Detektor.....	25
2.7. Základní chromatografické charakteristiky.....	26
2.7.1. Retenční čas, mrtvý retenční čas, redukováný retenční čas.....	26
2.7.2. Distribuční konstanta.....	26
2.7.3. Retenční faktor.....	26
2.7.4. Selektivita.....	27
2.7.5. Rozlišení.....	27
2.7.6. Účinnost.....	27
2.8. Chirální stacionární fáze.....	29
2.8.1. Polysacharidové CSP.....	30
2.8.2. Cyklofruktany.....	31
2.8.3. Makrocyclické glykopeptidy.....	32
2.8.4. Donor-akceptorové selektory (Pirklovy fáze).....	33
2.8.5. Crown-ethery.....	33
2.8.6. Proteiny.....	34

2.8.7. Iontově-výměnné a ligand-výměnné CSP	35
2.8.8. Syntetické polymery a molekulárně vtištěné polymery.....	36
2.9. Cyklodextriny	37
2.9.1. Struktura a vlastnosti	37
2.9.2. Syntéza.....	38
2.9.3. Tvorba inkluzních komplexů.....	39
3. Cíl práce.....	40
4. Experimentální část.....	41
4.1. Přístroje, kolona, pomůcky a chemikálie.....	41
4.2. Příprava vzorků a mobilní fáze.....	42
4.3. Chromatografické podmínky	43
4.4. Seznam analytů	44
4.5. Výsledky a diskuze	46
4.5.1. Bazické analyty.....	47
4.5.2. Kyselé analyty.....	54
4.5.3. Neutrální látky	61
5. Závěr	64
6. Seznam použitých zkratk	65
7. Seznam použité literatury	67

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Alois Daněk

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití HPLC v chirálních separacích IV.

V současnosti neustále rostou požadavky na kvalitu a bezpečnost léčiv. Léčiva jsou často chirálními látkami, a proto roste i význam chirálních separací. Nejvyužívanější jsou v této oblasti přímé separace s využitím chirálních stacionárních fází. Silikagel sloužící nejčastěji jako nosič pro chirální selektory může obsahovat na svém povrchu kovové nečistoty, které mohou negativně ovlivňovat separační proces. Tato diplomová práce se zaměřuje na testování vlivu chromatografických podmínek na chirální a achirální interakce devíti vybraných analytů se stacionární fází. K testování byla použita kolona s β -cyklodextrinem jako chirálním selektorem.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Alois Daněk

Supervisor: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Title of thesis: The employment of HPLC in the field of chiral separations IV.

The requirements for the quality and safety of medicines are constantly growing at present. Drugs are often chiral substances. Therefore, the importance of chiral separations is increasing. Direct separations using chiral stationary phases are the most used in this field. Silica gel, which is most often used as a carrier for chiral selectors, may contain metal impurities on its surface, which may negatively affect the separation process. This thesis focuses on testing the influence of chromatographic conditions on chiral and achiral interactions of nine selected analytes with the stationary phase. A column with β -cyclodextrin as chiral selector was used for the testing.

1. Úvod

Chiralita hraje důležitou roli v biologických procesech, protože lidské tělo obsahuje mnoho chirálních struktur (proteiny, polysacharidy, lipidy). Lidské tělo dokáže rozeznat enantiomery jako rozdílné molekuly. Jednotlivé enantiomery mohou mít rozdílné farmakologické účinky, a proto se v dnešní době klade důraz na vývoj opticky čistých izomerů. S rostoucím požadavkem na kvalitu a bezpečnost léčiv roste i význam chirálních separací a je kladen důraz na vývoj vhodných separačních metod. [1,2]

Existuje mnoho metod sloužících pro chirální separace, ale v dnešní době je nepoužívanější metodou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Jedná se o jednu z nejprogresivnějších a nepoužívanější analytických metod, která nachází stále větší uplatnění v oblasti analýzy léčiv. Tato metoda umožňuje současné kvalitativní a kvantitativní hodnocení separovaných analytů, a to v krátkém čase a s vysokou selektivitou. V chirálních separacích za použití HPLC se využívá chirálních selektorů, zejména chirálních stacionárních fází, např. cyklodextrinů. [1,2,3]

Nejčastěji používanou stacionární fází v HPLC je modifikovaný silikagel. V chirálních separacích slouží jako nosič, na který je vázán chirální selektor. Povrch toho anorganického sorbentu může být kontaminován nečistotami kovu, nejčastěji se jedná o železité a hlinité kationty. [4] Tyto kontaminanty mohou mít negativní vliv na kvalitu separace. Tato práce se zaměřuje na testování vlivu chromatografických podmínek na chirální a achirální interakce se stacionární fází.

2. Teoretická část

2.1. Úvod do chiralidy

Chiralita molekul byla objevena v roce 1848 francouzským chemikem a biologem Louiſem Pasteurem, který jako první ručně separoval dva enantiomery vínanu amono-sodného. [1,2,5] Ve své práci pozoroval, že plíseň *Penicillium glaucum* fermentuje D-formu této soli, kdežto L-forma nebyla touto plísní ovlivněna. [5] O čtvrt století později byla objevena další základní charakteristika chiralidy, a sice asymetrický uhlík jako základ molekulové chiralidy. [2] Celé další století bylo třeba k tomu, aby se zjistila klíčová role chiralidy, a to nejen pro lidský organismus, ale i chemický průmysl. [6]

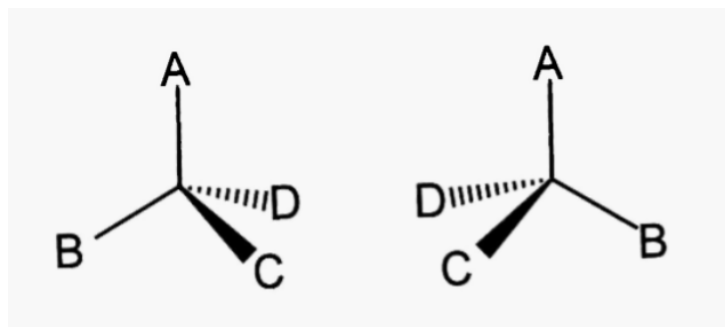
Chiralita (výraz pochází z řeckého výrazu pro ruku) je prostorovou vlastností objektu, který je vzájemně neztotožnitelný se svým zrcadlovým obrazem. [7] Chiralita má velký význam jak v přírodě, tak v průmyslu. Všechny aminokyseliny, proteiny, enzymy, sacharidy, ale i některé alkaloidy a hormony, jsou chirálními sloučeninami. Například molekuly nezbytné pro náš život, aminokyseliny a sacharidy, se vykytují pouze v jedné enantiomerní formě, aminokyseliny v L-formě a sacharidy v D-formě. Proto biologické a farmakologické vlastnosti mohou být specifické pro jednotlivé enantiomery a způsobovat rozdílné účinky v organismu, ať už na úrovni farmakokinetiky (absorpce, distribuce, metabolismu, eliminace), tak farmakodynamiky. Proto chiralita hraje důležitou roli i ve farmaceutickém odvětví. Při výzkumu nových léčiv se sleduje vliv jednotlivých enantiomerů na organismus, aby se zabránilo případným nežádoucím účinkům. Velký význam má chiralita v zemědělství, kde se zjišťuje vliv enantiomerů agrochemikálií (pesticidů, insekticidů) na environmentální bezpečnost. Dále hraje podstatnou roli i v jiných odvětvích, např. v potravinářství. [6,8]

2.2. Izomerie a příslušné názvosloví

Izomery jsou molekuly s identickým atomovým složením (mají stejný sumární vzorec), ale liší se v odlišném uspořádání atomů v prostoru (prostorové izomerie) nebo v rozdílném uspořádání atomů v molekule (konstituční izomerie). Jako příklad konstituční izomerie může posloužit látka butanol se sumárním vzorcem $C_4H_{10}O$, kde konstitučními izomery pak jsou butan-1-ol a butan-2-ol. Obě látky mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. [7,9] Prostorové izomery neboli stereoizomery mají stejně jako izomery konstituční shodný sumární vzorec, ale liší se v prostorovém uspořádání

atomů v molekule (konfiguraci). Toto uspořádání se liší na tzv. chirálních centrech, kde chirální molekula obsahuje jedno nebo více těchto center. Nejčastěji se jedná o uhlík, ale i dusík, fosfor nebo síra mohou v molekule zastupovat roli stereogenního centra. Základní rozdělení stereoizomerů je na **enantiomery** a **diastereomery**. [4,7,9]

Enantiomery jsou molekuly, které jsou v literatuře popsány jako vzájemně neztotožnitelné zrcadlové obrazy (Obrázek č. 1). Často se tato skutečnost demonstruje na příkladu levé a pravé ruky.

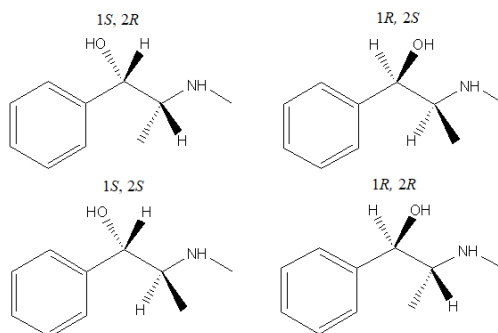


Obrázek č. 1: Zrcadlové zobrazení páru enantiomerů [10]

Enantiomery mají v achirálním prostředí stejné fyzikální i chemické vlastnosti kromě směru stáčení polarizovaného světla, kdy každý z enantiomerů stačí rovinu světla na opačnou stranu. [4,7,9] Proto jsou někdy nazývány optickými izomery. [6] Směs dvou enantiomerů v poměru 1:1 se nazývá racemická směs.

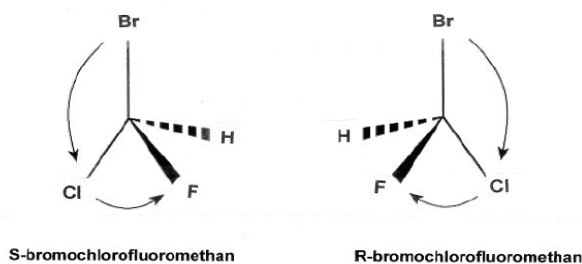
Diastereomery jsou stereoizomery, které mají více než jedno stereogenní centrum a nejsou svými zrcadlovými obrazy. Svou konfigurací se liší na jednom nebo více centrech chiralit. Diastereomery mají různé fyzikální a chemické vlastnosti, proto je možné je separovat při použití achirálního systému.

Pokud látka obsahuje centrum chiralit, počet stereoizomerů odpovídá 2^n , kde n odpovídá počtu chirálních center. Dále můžeme stanovit 2^{n-1} možných párů enantiomerů a 2^{n-1} racemátů. [4] Jako příklad můžeme uvést efedrin, který obsahuje dvě centra chiralit, a tedy existují čtyři možné stereoizomery: $(1S,2R)$, $(1R,2S)$, $(1S,2S)$, $(1R,2R)$. Páry $(1S,2R)$ a $(1R,2S)$, $(1S,2S)$ a $(1R,2R)$ vůči sobě představují enantiomery, ostatní možné páry jsou diastereomery. [4,7] Struktura izomerů efedrinu a pseudoefedrinu je uvedena na Obrázku č. 2.



Obrázek č. 2: Struktura izomerů efedrinu a pseudoefedrinu [11]

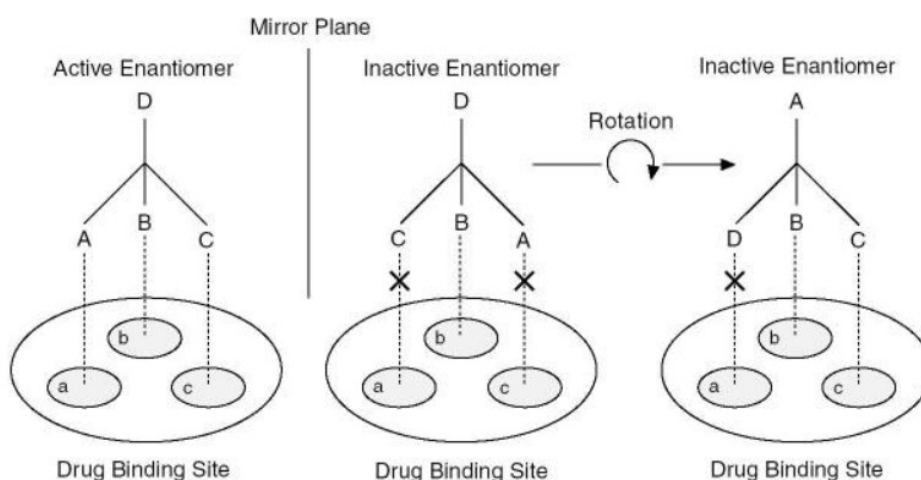
Pro názvosloví stereoizomerů se nejčastěji používají tři systémy. První systém je založený na vlastnostech stereoizomerů stáčet rovinu polarizovaného světla. Enantiomer, který stáčí rovinu polarizovaného světla ve směru hodinových ručiček, je označován jako (+) nebo také jako d-izomer (pravotočivý). Enantiomer, který ji stáčí proti směru hodinových ručiček, má označení (–), l-izomer (levotočivý). Pro označení absolutní konfigurace se používá Cahn-Ingold-Prelogova systému, kdy se chirální uhlík označuje *R* (rectus, pravý) nebo *S* (sinister, levý). Pravidla jsou založena na určení priorit substituentů připojených k asymetrickému uhlíku podle protonového čísla. Díváme se ve směru vazby s připojeným substituentem s nejnižší prioritou (nejčastěji vodík) a poté se podle klesajících priorit substituentů určí konfigurace chirálního centra. Pokud je pokles priorit ve směru hodinových ručiček, označíme konfiguraci jako *R*, proti směru jako *S*. [4,6,9,12] Jako poslední se využívá Fisherovy projekce, která se používá pro označení aminokyselin a sacharidů. Centra chiralit se značí D a L. Tento systém má své nedostatky, protože se tato malá písmena používají pro označení stáčení roviny polarizovaného světla, a proto nejvíce preferovaný je Cahn-Ingold-Prelogův systém. [7,8,13] Jako dobrý příklad může posloužit struktura bromochlorofluoromethanu (Obrázek č. 3).



Obrázek č. 3: Určení konfigurace bromochlorofluoromethanu podle Cahn-Ingold-Prelogova systému, převzato a upraveno [6]

2.3. Význam chiralidy a chirálních separací

Lidský organismus obsahuje velké množství stereoizomerních molekul jako jsou receptory nebo enzymy, a proto je jedním velkým chirálním selektorem. Organismus je schopný rozeznat dva enantiomery jako dvě rozdílné molekuly, tudíž interakce jednotlivých enantiomerů léčiv může vést k rozdílným odpovědím organismu na úrovni farmakodynamiky nebo farmakokinetiky. Obrázek č. 4 odkazuje na mechanismus, který je založen na tříbodové interakci mezi enantiomerem a cílovou strukturou, nejčastěji receptorem. [6,14]



Obrázek č. 4: Schéma tříbodové interakce mezi enantiomerem a cílovou strukturou [16]

Enantiomer, který vyvolá daný účinek se označuje jako **eutomer**. Druhý enantiomer se nazývá **distomer** a může vůči eutomeru vyvolávat různé odpovědi organismu mezi které patří: nižší aktivita, žádná aktivita, antagonistická aktivita nebo kvalitativně rozdílný účinek, který může být žádoucí nebo nežádoucí (toxický). [6,13,14] Poměr farmakologické účinnosti dvou enantiomerů lze vyjádřit jako **eudismický index**. [13,15] Interakce enantiomerů s organismem lze dále rozdělit z hlediska farmakodynamiky, farmakokinetiky a toxicity.

Z pohledu farmakodynamiky (účinek léčiva na organismus) lze aktivitu enantiomerů rozdělit do tří základních skupin, kde může být a) jeden biologicky aktivní enantiomer (eutomer); b) oba enantiomery se stejnou aktivitu; c) jeden biologicky aktivní enantiomer (eutomer), ale distomer je v organismu přeměněn na aktivní enantiomer. Tato přeměna může probíhat v jednom směru (S-izomer \rightarrow R-izomer) nebo obousměrně (S-izomer \leftrightarrow R-izomer). Procesy absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace jsou důležitými parametry léčiva ovlivňující jeho osud v organismu (farmakokinetiku) a i zde

chiralita hraje důležitou roli. Proto je podstatné rozlišit ovlivnění těchto parametrů jednotlivými enantiomery na každé z výše uvedených úrovní. Stereoizomery mohou vykazovat rozdíly i v toxicitě. Toxické účinky mohou být vyvolány jedním (eutomer nebo distomer) nebo oběma enantiomery. Pokud je toxicita spojena právě s oběma enantiomery, může být u obou stejná nebo rozdílná. [6,9,10,13,14,16] Mezi jednotlivé příklady patří: [6,9,10,13,14]

- Farmakodynamika
 - a) jeden biologicky aktivní enantiomer (eutomer)
 - β -blokátory, citalopram
 - b) enantiomery se shodnou aktivitou
 - cyklofosfamid, fluoxetin
 - c) jeden biologicky aktivní enantiomer (eutomer), ale distomer je v organismu přeměněn na aktivní enantiomer
 - NSAID, thalidomid
- Farmakokinetika
 - verapamil – 2x zvýšená biodostupnost R-izomeru (snížený first-pass efekt)
 - fluoxetin – renální clearance R-izomeru je o 25% vyšší než S-izomeru
- Toxicita
 - DOPA – D-izomer způsobuje agranulocytózu
 - ketamin, penicilamin – toxicita vztažena na jejich distomer

FDA (Food and Drug Administration) neboli Úřad pro kontrolu potravin a léčiv vydal v roce 1992 prohlášení o vývoji nových stereoizomerních léčiv. Tímto prohlášením se chiralita aktivních látek dostala do popředí celého procesu vývoje nových chirálních léčiv. Podle tohoto prohlášení musí výrobci dokládat dokumentaci o bezpečnosti a účinnosti, stejně jako protokoly o testování stability a označení léčiva. [17,18] Na základě výše zmíněného prohlášení se většina firem začala soustředit na tzv. chiral-switching. Příklady jsou uvedeny v Tabulce č. 1. Je to proces, ve kterém farmaceutické firmy uvádějí na trh enantiomerně čisté látky namísto léčiv, které byly zavedeny jako racemáty. Cílem je zlepšení terapie, tedy zvýšení účinnosti a bezpečnosti. [6,16,17]

Mezi potenciální přínosy pro chiral-switching patří: [13,14,15]

- zvýšení terapeutického indexu
 - zvýšení receptorové selektivity
 - snížení nežádoucích účinků
- snížení potenciálu interakcí s jinými léčivy
- jednodušší farmakokinetický a farmakodynamický profil

Tabulka č. 1: Příklady chiral-switchingu [9,15,19,20]

Léčivo	Enantiomer	Farmaceutická skupina	Komentář
Cetirizin	Levocetirizin	H ₁ -antihistaminikum	2,5mg čistého enantiomeru má ekvivalentní účinek jako 5mg racemátu
Citalopram	Escitalopram	SSRI	100x silnější inhibitor zpětného vychytávání serotoninu než R-forma
Ketamin	(S)-ketamin	Intravenózní anestetikum	účinnější anestetikum a méně NÚ než R-forma
Omeprazol	Esomeprazol	PPI	zvýšená biologická dostupnost než u R-formy – snížený first-pass efekt

Chiralita hraje důležitou roli zejména ve farmacii v oblasti výroby a výzkumu nových léčiv. Protože jednotlivé stereoizomery mohou lidský organismus ovlivňovat různým způsobem, je důležité, aby docházelo k neustálému vývoji separačních metod, analytických nebo preparativních. Po upřesnění farmakodynamických a farmakokinetických vlastností jednotlivých enantiomerů z klinických studií se může aplikovat eutomer před distomerem. Tak může být dosaženo cíle farmaceutické péče, tedy maximalizace účinku a minimalizace rizik. [6,18,21]

Další oblastí, která se zaměřuje na chiralitu je agrochemie. S nárůstem inovativních agrochemikálií (insekticidy, pesticidy, fungicidy) se také zvětšil podíl látek, které jsou chirálního charakteru. Většina chirálních agrochemikálií jsou na trhu vyráběna jako racemáty, kdy přítomnost neaktivního nebo méně aktivního enantiomeru může zvyšovat riziko přítomnosti polutantů. Proto se tento průmysl zaměřuje na výrobu čistých

enantiomerů, aby bylo dosaženo optimální účinnosti, environmentální a toxikologické bezpečnosti. [21,22]

2.4. Metody používané k separaci enantiomerů

Enantiomery mají stejné fyzikální a chemické vlastnosti, a proto pro jejich úspěšnou separaci je třeba jejich chemická konverze na **permanентní diastereomery** u nepřímé separace nebo **dočasné diastereomerní komplexy** u separace přímé. Ty mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti a lze je tedy úspěšně separovat. Úspěšná separace se projeví v momentě, kdy chirální selektor reaguje silněji s jedním enantiomerem než druhým. Chirální separace mohou probíhat jak v preparativním, tak analytickém měřítku. Preparativní metody umožňují izolaci analytů, zatímco ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení se používají analytické metody, kde je obvykle k dispozici velmi malé množství vzorku. [4,7]

Metody používané v chirálních separacích: [9]

- Krystalizace
- Membrány
- Liquid-liquid extrakce
- Enzymaticko-kinetické rozlišení
- Kapilární elektroforéza
- Chromatografie

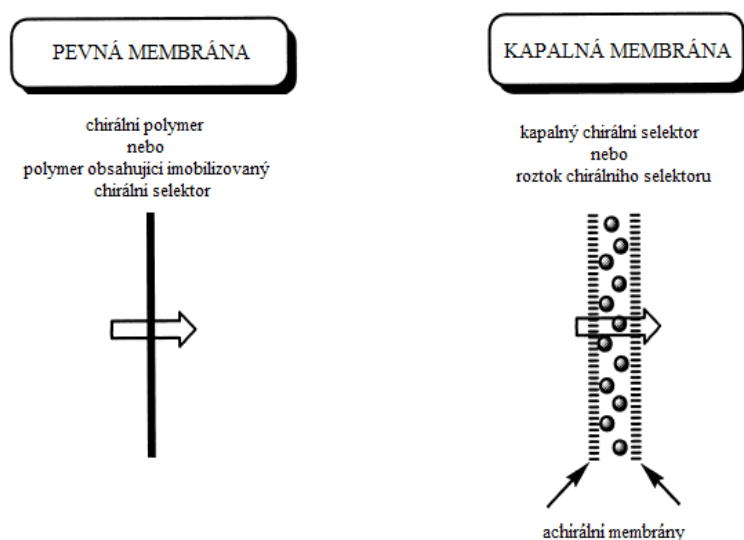
2.4.1. Krystalizace

Až do vývoje chirální chromatografie byla krystalizace jedna z mála možných technik umožňující separaci enantiomerů. Tato metoda je vhodná pouze pro sloučeniny chovající se jako konglomeráty, tedy sloučeniny, pro které jsou přítomny rozdílné krystaly pro každý z enantiomerů. Konglomeráty poté mohou být separovány z jejich racemických směsí, a to naočkováním roztoku krystaly jednoho z enantiomerů. Tento postup je charakterizován jako preferenční krystalizace a její limitací je dostupnost krystalů daného enantiomeru. Protože přítomnost konglomerátů v přírodě není běžná, další možností je přeměna na diastereomerické soli, které jsou formovány mezi kyselinami/zásadami enantiomerů a chirální zásadou/kyselinou. Tyto soli poté mají rozdílnou rozpustnost, a tento rozdíl rozpustnosti umožňuje separaci na základě krystalizace. Krystalizaci lze uskutečnit i přidáním chirálního rozpouštědla, které je většinou organického charakteru, a proto není vhodné pro vysoce polární sloučeniny.

Tato metoda se často využívá v kombinaci s jinou technikou určenou pro chirální separaci jako například simulated moving bed (SMB) nebo enzymaticko-kinetické rozlišení. [9,23,24]

2.4.2. Membrány

Separace může být dosaženo při použití enantioselektivních nebo non-enantioselektivních membrán. Selektivní membrány slouží přímo jako chirální selektory, kdežto neselektivní membrány napomáhají enantioselektivnímu procesu. Neselektivní membrány slouží jako bariéra nebo filtrační médium k separaci enantiomerů. Existují dva mechanismy selektivního transportu: facilitovaný a retardovaný transport. Separace enantiomerů kapalnými membránami je obvykle založena na facilitovaném transportu, zatímco separace pevnými membránami je na transportu usnadněném i retardovaném. [25] Membrány mohou být pevné (syntetické a semisyntetické polymery) nebo kapalné látky (Obrázek č. 5). Pevné membrány mohou sloužit přímo jako chirální selektory nebo jsou na ni imobilizovány sloučeniny, které fungují jako chirální selektory, např. polysacharidy. Kapalné membrány jsou konstruovány tak, že chirální selektor nebo jeho roztok je zakomponován mezi dvě porózní membrány, které zde slouží jako nosiče. [23,25]



Obrázek č. 5: Pevná a kapalná enantioselektivní membrána, převzato a upraveno [22]

Mezi výhody technologie membrán patří vysoká účinnost, nízká spotřeba energie, jednoduchost a kontinuální separace. Proto separační metody na bázi membrán představují v dnešní době zavedený postup v průmyslu ve výrobě opticky čistých látek.

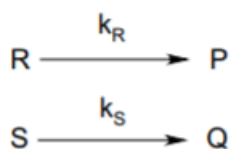
Uplatnění nalézají i v achirální oblasti, a to ve zpracování kapalin (příprava pitné vody), nebo ve zdravotnictví, kde se membrány používají při hemodialýze nebo plazmaferéze. [23,25]

2.4.3. Liquid-liquid extrakce

Princip této separace je založen na přítomnosti dvou vzájemně nemísitelných kapalných fází, vodné a organické. Chirální selektor je přidán do jedné z kapalných fází a následná separace enantiomerů probíhá podle odlišné afinity k chirálnímu selektoru v dané fázi. Liquid-liquid extrakce kombinuje dva mechanismy: chirální diskriminaci a kapalnou extrakci. Tato metoda je zajímavou alternativou ke chromatografii a krystalizaci. Další výhodou je, že není vyžadována vysoce sofistikované zařízení. Hlavní nevýhodou této techniky je další úprava po extrakci příslušného enantiomeru, tedy oddělení enantiomeru od chirálního selektoru. [23,27]

2.3.4. Enzymaticko-kinetické rozlišení

Kinetické rozlišení (Obrázek č. 6) je založeno na separaci dvou enantiomerů v racemické směsi na základě rozdílu mezi reakčními rychlostmi enantiomerů racemické směsi v přítomnosti enzymu jako chirálního katalyzátoru. Enzym rozlišuje mezi dvěma enantiomery, takže jeden enantiomer je převeden na produkt rychleji než druhý. Mezi nejčastěji používané chirální katalyzátory patří enzymy lipázy a esterázy. [9,27]



Obrázek č. 6: Schéma enzymaticko-kinetického rozlišení [27]

Kinetické rozlišení nastává, když rychlostní konstanta k_R není rovna rychlostní konstantě k_S , a reakce je zastavena mezi 0-100 % konverze racemické směsi. V ideálním případě jeden enantiomer reaguje mnohem rychleji než druhý. Pokud reaguje pouze reaktant R ($k_S = 0$), vede konverze racemické směsi k finální směsi 50 % reaktivního činidla S a 50 % produktu P. Výhodou je snadné oddělení obou enantiomerů pomocí jednoho enzymu. [27]

2.4.5. Chromatografické metody

Chromatografické metody spadají do skupiny separačních metod a patří mezi nejpoužívanější techniky pro separaci enantiomerů. Princip separace je založen na rozdílné interakci analytů mezi dvě navzájem nemísitelné fáze: pohyblivou mobilní fází (MF) a stacionární fází (SF), která je nepohyblivá. Dle skupenství MF můžeme tyto metody dělit na plynovou chromatografii (GC – gas chromatography) nebo kapalinovou chromatografii (LC – liquid chromatography). [4] Metody kapalinové chromatografie můžeme dále dělit na tenkovrstvou kapalinovou chromatografii (thin layer chromatography – TLC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (high pressure liquid chromatography – HPLC), simulated moving bed – SMB nebo superkritickou fluidní chromatografii (supercritical fluid chromatography – SFC). [9]

K separaci enantiomerů lze využít **přímé a nepřímé metody**. Při přímé separaci dochází k interakci mezi analytem a chirálním selektorem. Dochází ke vzniku dočasných diastereomerních komplexů. Lze použít chirální stacionární fáze (CSP) nebo přídavek chirálního selektoru do mobilní fáze. V současné době je využití CSP metodou volby pro analytické i preparativní použití. Nepřímá separace (chirální derivatizace) je založena na vzniku diastereomerů, které vznikají reakcí mezi chirálním derivatizačním činidlem a racemátem. [4,7,9] Vzniklé diastereomery poté mohou být separovány na achirálních kolonách při normálním módu (NP mód) i reverzním módu (RP mód). Používá se pro separaci diastereomerních amidů, karbamátů a derivátů močoviny. Nevýhodou je časová náročnost přípravy a možnost racemizace. [4]

V dnešní době je metodou volby **vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)** a **superkritická fluidní chromatografie (SFC)**. [7] Jak bylo zmíněno výše, nejčastěji je používáno přímé metody za použití chirální stacionární fáze. Chirální selektor je kovalentně vázán nebo fyzikálně vázán na achirálním nosiči, nejčastěji se jedná o silikagel nebo aminopropylsilikagel. Mechanismus rozlišení dvou enantiomerů je vysvětlen modelem tříbodové interakce mezi analytem a CSP. Typy, síla a charakter interakcí jsou uvedeny v Tabulce č. 2. [4,7]

Tabulka č. 2: Typ, síla a charakter interakcí podílejících se na chirální separaci [4,7]

Typ interakce	Síla interakce	Charakter interakce
coulombické síly	velmi silné	přitažlivý/odpudivý
vodíková vazba	velmi silné	přitažlivý
sterické stínění	velmi silné	repulzní
interakce π - π	silné	přitažlivý
ion-dipól	silné	přitažlivý
dipól-dipól	střední	přitažlivý
dipól-indukovaný dipól	slabé	přitažlivý
Van der Waalsovy síly	slabé	přitažlivý

Separace chirálních látek může probíhat ve třech separačních módech: **normálním módu** (NP mód; normal-phase), **reverzním módu** (RP mód; reversed-phase) a **polárně organickém módu** (PO mód). U chromatografie na *normálních fázích* se používá polární stacionární fáze (SF). Nejčastěji používaným materiálem je silikagel, modifikovaný chirálním selektorem. Mobilní fáze (MF) je tvořena nepolárním organickým rozpouštědlem (např. hexan, heptan) spolu ve směsi s modifikátory mobilní fáze (např. propan-2-ol, ethanol, acetonitril). V tomto módu mají na mechanismu retence vliv π - π a dipólové interakce. U *polárně organického módu* je MF složena z polárního organického rozpouštědla (methanol, acetonitril) v kombinaci s organickou kyselinou (kyselina octová, TFA) a zásadou (trimethylamin, diethylamin). Na mechanismus chirální diskriminace se u PO módu podílejí iontové interakce, vodíkové vazby, π - π interakce, ale i sterické vlivy. Nejčastěji využívaným separačním módem je chromatografie na *reverzních fázích*. SF je nejčastěji také tvořena silikagelem modifikovaným chirálním selektorem jako v případě NP módu, ale může se významně lišit způsob navázání/ukotvení na povrch silikagelu. MF je polární a nejčastěji tvořena binární směsí organické (nejčastěji používaný je acetonitril nebo methanol) a vodné složky. V případě vodné složky se používají roztoky pufrů, které mohou upravovat pH MF. Používají se jak anorganické (např. fosforečnany), tak organické pufrů (např.

octany). Mechanismus retence zajišťují hydrofobní interakce, zejména van der Waalsovy síly, ale na mechanismu retence se podílí i vodíkové vazby nebo iontové interakce. [4]

2.4.6. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis – CE) patří mezi elektromigrační metody. Princip separace analytů je založen na rozdílném pohybu elektricky nabitých částic v kapiláře. Kapilára je zapojená v elektrickém poli, které je vkládáno do kapaliny nebo gelu vyplňující kapiláru. Nabité analyty se pohybují na základě vlastní pohyblivosti v elektrickém poli. [7,28,29] Nejčastěji používaným selektorem je cyklodextrin (CD), ale uplatnění našly také polysacharidy, crown-ethery nebo makrocyclická antibiotika. [28] Výhodou CE oproti HPLC je vyšší separační účinnost, nízká spotřeba rozpouštědel i vzorku a kratší čas analýzy. [29]

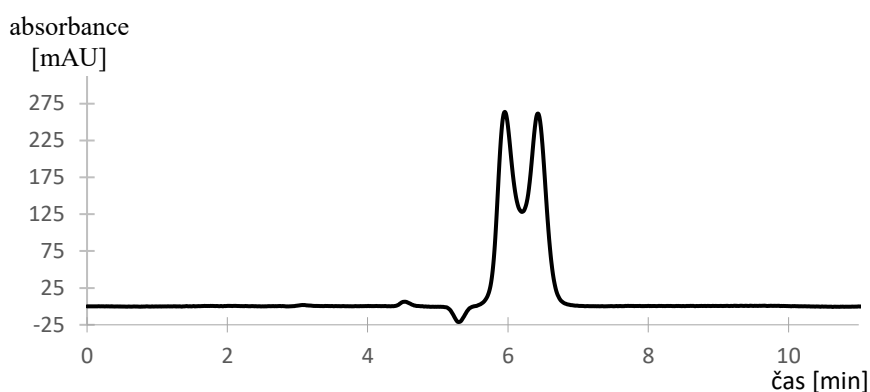
2.4.7. Superkritická fluidní chromatografie

Princip superkritické fluidní chromatografie (supercritical fluid chromatography – SFC) spočívá v použití mobilní fáze při teplotách a tlacích nad kritickým (superkritická fluidní chromatografie) nebo pod kritickým (subkritická fluidní chromatografie) bodem. Výhodou oproti chirální kapalinové chromatografii je vysoká rychlost, krátká doba analýzy, omezený dopad na životní prostředí, vysoká účinnost a nižší spotřeba rozpouštědel. Vysoká účinnost a kratší čas analýzy oproti HPLC je dána kombinací nízké viskozity použitého rozpouštědla a vysokého difuzního koeficientu rozpuštěné látky. [23,30]

SFC je obvykle lepší metodou než HPLC s ohledem na enantioselektivitu, účinnost a čas analýzy, ale použití je omezeno na sloučeniny, které jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (oxid uhličitý v superkritickém stavu). Proto tato metoda není vhodná pro vysoce polární látky. [23,30]

2.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) neboli vysokoučinná kapalinová chromatografie je významnou separační metodou. Princip separace je založen na interakcích směsi látek s mobilní fází (MF) a stacionární fází (SF), kdy dochází k ustálení rozdělení látky mezi MF a SF. Kvantitativně lze tento děj popsat distribuční konstantou (K_D). Distribuční konstanta určuje poměr koncentrace analytu v MF a SF, a tedy určuje, do jaké míry bude analyt zadržován na SF nebo eluován MF. Látka interagující více se SF, bude mít delší retenční čas než látka interagující více s MF. Grafický záznam se nazývá chromatogram, který je charakterizován jako závislost odezvy detektoru na čase. Chromatogram (Obrázek č. 7) je tvořen jednotlivými křivkami Gaussovského typu (píky). [4,31,32]



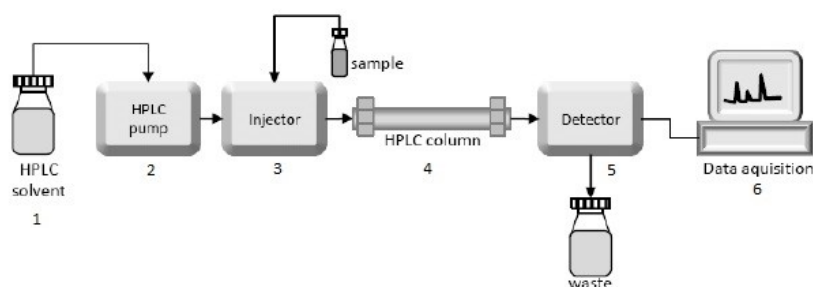
Obrázek č. 7: HPLC chromatogram

2.6. Instrumentace

Samotný kapalinový chromatograf se skládá z několika částí, které mají následující funkce:

- uchování a transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze a vysokotlaké čerpadlo)
- dávkování vzorku (autosampler)
- separace (kolona, kolonový termostat)
- detekce (detektor)
- záznam dat a řízení přístroje (počítač s příslušným chromatografickým softwarem (SW))

Schéma kapalinového chromatografu je zobrazeno na Obrázku č. 8. Mobilní fáze je vedena ze zásobníků mobilní fáze (1), která za pomoci vysokotlakového čerpadla (2) je pumpována dál do systému. Dávkovačem (3) jsou nastříkovány vzorky, které jsou unášeny mobilní fází na kolonu (4), kde dochází k samotné separaci. Po separaci jsou jednotlivé látky detekovány pomocí vhodného detektoru (5). K řízení celého systému a vyhodnocování získaných dat se využívá počítač s příslušným chromatografickým softwarem. (6) [4,31,33]



Obrázek č. 8: Schéma kapalinového chromatografu, převzato a upraveno dle [34]

2.6.1. Zásobníky mobilní fáze

K uchování mobilní fáze (MF) slouží zásobníky mobilní fáze, které jsou nejčastěji vyrobeny ze skla. Počet zásobníku závisí na typu analýzy. V případě *isokratické eluce*, kdy je složení mobilní fáze konstantní, je pro analýzu nutný pouze jeden zásobník. Isokratické eluce se použije v případě, kdy složky analyzovaného vzorku mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. V dnešních dnech je více běžně užívanou metodou tzv. *gradientová eluce*, při které se eluční síla mobilní fáze mění v průběhu analýzy. V tomto případě se použije dvou nebo více zásobníků. [7,31]

Zásobník mobilní fáze by měl být dobře uzavřen, aby nedošlo ke kontaminaci MF nečistotami a bylo zabráněno vypařování MF. V zásobníku je dále umístěn filtr, který zabraňuje zanesení nečistot dál do systému HPLC. Pórovitost filtru je např. 0,2 μm a obvyklým materiálem je kov nebo teflon. [4,7,31]

Mobilní fáze umístěná v zásobnících může obsahovat malé množství rozpuštěných plynů a ve formě bublinek se uvolňovat do HPLC systému. Tyto bublinky mohou mít vliv na kvalitu analýzy, kde může docházet ke kolísání základní linie (baseline) nebo ovlivnění signálu detektoru (zvýšení šumu). Odplynění mobilní fáze může být dosaženo dvěma způsoby, a to probubláním mobilní fáze heliem nebo za použití odplynovače (degasser), který je umístěný před pumpou. [4,7,31]

2.6.2. Vysokotlaké čerpadlo

Funkcí vysokotlakových čerpadel je zajištění kontinuálního průtoku mobilní fáze systémem. Je mnoho požadavků, které by mělo vysokotlaké čerpadlo splňovat, aby bylo dosaženo kontinuálního průtoku a nedošlo k negativnímu ovlivnění kvality analýzy. Mezi tyto požadavky patří: [4,7]

- široké rozmezí průtokového objemu: 0,1 až 10 ml
- možnost výstupního tlaku 400 bar u klasických systému, až 1300 bar u UHPLC
- materiály čerpadel chemicky inertní vůči mobilní fázi a odolné proti korozi
- vysoká přesnost a reprodukovatelnost průtoku
- minimum tlakových pulsů

Nejběžnějšími materiály čerpadel jsou teflon a nerezová ocel. Při intoleranci nerezové oceli jsou pak používána čerpadla vyráběna pouze z teflonu a skla, ale hranice výstupního tlaku je omezena. [7] V praxi je používáno mnoho typů čerpadel: pneumatická, injekčního typu, pístová, membránová. Mezi nejpoužívanější čerpadla patří reciproční pumpy skládající se z pístové hlavy. [4,7,30] Tyto pumpy mohou být konstruovány buď s jednou nebo dvěma pístovými hlavami. [7] Míchání MF může probíhat za nízkého nebo vysokého tlaku. Při tvorbě nízkotlakého gradientu dochází k míchání před pumpou, za vysokotlakého gradientu za pumpou. [4]

2.6.3. Dávkovač vzorku

Správné dávkování vzorku je uskutečněno dávkovačem, který by měl být schopen nastříknout přesně nastavené množství vzorku. Běžné HPLC instrumentace jsou schopné nadávkovat vzorky o objemu od 0,1 μ l do 100 μ l. Nástřiky musí být reprodukovatelné a přesné. Vzorky dále musí být nastříknuty ve formě úzkých zón (narrow plug), aby se zabránilo rozmývání píku. [4,7,31,33]

V dnešní době jsou používány dva typy dávkovačů: manuální smyčkové dávkovače a automatické dávkovače (autosamplery). Autosamplery jsou používány ve větší míře, kde hlavní důvod je možnost dávkování více vzorků v sérii bez přítomnosti operátora. [4] Automatické dávkovače jsou spojené se zásobníkem vzorků, které jsou umístěny ve speciálních nádobkách – vialkách. Vialky mají různé objemy a materiály, ale nejčastěji používanými jsou vialky o objemu 1-2 ml vyrobené z borokřemičitého skla.

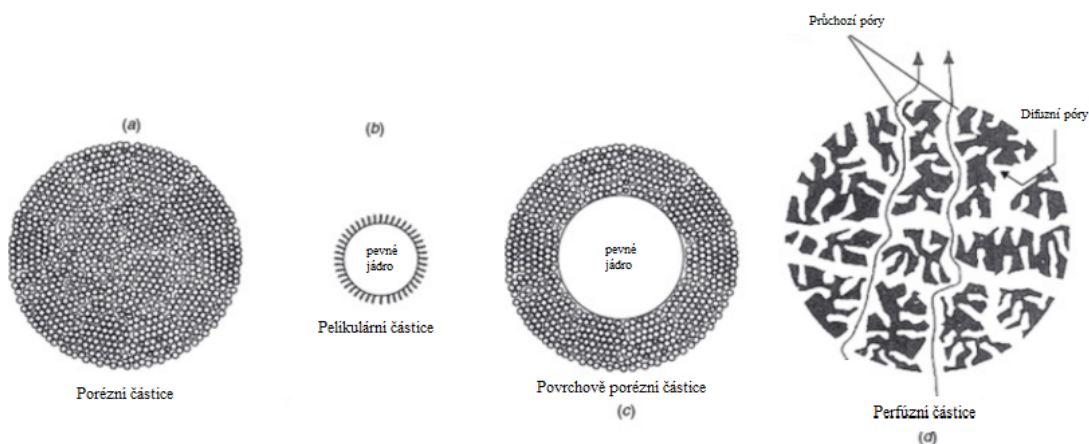
Z těch je pak pomocí injekčních stříkaček dávkovače nabráno požadované množství vzorku. [4,7,31,33]

2.6.4. Kolona

Kolona je srdcem HPLC systému, na které dochází k separaci. Kolony mají tvar trubice a dnes nejvíce využívané kolony bývají vyrobeny z nerezové oceli. Materiál musí vykazovat vysokou tlakovou odolnost, chemickou inertnost vůči působení mobilní fáze a hladký vnitřní povrch. Kolony jsou vyráběny pro analytické účely obvykle o délce 30 až 250 mm, vnitřním průměru od 2,1 mm do 4,6 mm a velikosti částic sorbentu 1,3-5 μm . [4,7,31,33,35] Na obou koncích kolony jsou frity, které zabraňují pohybu stacionární fáze. V některých případech může být využito předkolony, která je velikostí mnohem menší než samotná kolona. Předkolona slouží k ochraně kolony před nečistotami a prodlužuje její životnost. [30] Kolona je umístěna v kolonovém prostoru obsahující termostat, který udržuje požadovanou konstantní teplotu během analýzy. [4,7,31,33,35]

Jednotlivé kolony jsou naplněny různými typy sorbentů (stacionární fáze) obsahující pevné částice, které se rozdělují na čtyři skupiny: **porézní**, **povrchově porózní**, **pelikulární** a **perfúzní** (Obrázek č. 9). Nejpoužívanějšími jsou porézní částice, které jsou nejčastěji vyrobeny ze silikagelu. Důvodem, proč je tento typ nejvíce využívaný je vysoká kapacita kolony umožňující nástřik velkého množství vzorku. Další výhodou je dobrá dostupnost, účinnost a odolnost kolony. [7,35] Tyto částice jsou vyráběny v různých velikostech, obvykle v rozsahu 1,5-5 μm a vyrábí se agregací menších částic [7]. Pelikulární částice se sestávají z pevných kulových částic, které jsou obalené tenkou vrstvou stacionární fáze. Jedná se o částice na bázi polymeru nebo silikagelu s průměrem 1,5-2,5 μm . Tyto částice vykazují vysokou účinnost pro separaci makromolekul. Protože mají malý povrch, jejich omezení spočívá v omezeném množství nastříknutého vzorku, a proto jsou vhodné pro analytické účely. Povrchově porézní částice mají pevné jádro, které je obalené tenkou vrstvou porézních částic. Tyto částice mají průměr od 1,3 do 5 μm a vrstva bývá tenká 0,25-0,5 μm . Mají větší povrch než částice pelikulární a poskytují delší retenci a větší množství nastříknutého vzorku. Perfúzní částice obsahují velké póry (400-800 μm) spojené se sítí menších (30-100 μm) pórů. Kombinací průtoku a difúze jsou vzorky v roztoku nesený dovnitř pórovité struktury (poté ven). Vše probíhá za vysokého průtoku MF a tento efekt snižuje rozmývání elučních zón. Tento typ částic je vhodný pro preparativní účely, separaci makromolekul jako jsou například proteiny. Méně vhodné jsou pro analytické separace

malých molekul. [7,35] Mezi další materiály pro výrobu patří oxidy kovů (oxid hlinitý, oxid titaničitý) a polymery (polystyren). [4,7,31,33,35]



Obrázek č. 9: Konfigurace pevných částic sorbentů, převzato a upraveno dle [7]

Jako stacionární fáze může být využit samotný silikagel nebo jiný sorbent. V závislosti na požadovaném typu analýzy může být silikagel vhodně modifikován určitou chemickou skupinou. Skupiny jsou ukotveny k nosiči fyzikálně nebo kovalentně. Např. u chromatografie na reverzních fázích je silikagel modifikován uhlovodíkovým řetězcem o určité délce (C18, C8). Takto modifikovaná stacionární fáze vzniká reakcí volných silanových skupin silikagelu s organosilanem. [7,31,35]

2.6.5. Detektor

Princip detekce je založen na přeměně fyzikálně-chemických vlastností analytu na elektrický signál, kde detektor zaznamenává rozdíl signálu mobilní fáze (MF) samotné a signálu MF s analytem. Jednotlivé signály jsou poté zaznamenány v chromatogramu. Rozdělení detektorů je možné z více hledisek. Detektory mohou být *univerzální* (refraktometrický) nebo *specifické*, které jsou určeny pouze pro určité typy látek (elektrochemický). Další rozdělení detektorů je na *destrukční* a *nedestrukční*. První zmiňovaný pro své měření vzorek chemicky mění, látku jako takovou destrukční detektor zničí. Ideální detektor by měl splňovat tyto vlastnosti: [4,7,33]

- vysoká citlivost a reprodukovatelnost odezvy
- široký lineární dynamický rozsah koncentrací analytu
- specifická, univerzálnost
- spolehlivost, snadná ovladatelnost, odolnost

V dnešní době je široká škála detektorů, které pracují na různých principech. Mezi používané detektory patří např. spektrofotometrický (UV-VIS), fluorimetrický (FD), elektrochemický (ECD), refraktometrický (RID), hmotnostní (MS). [4,7]

2.7. Základní chromatografické charakteristiky

2.7.1. Retenční čas, mrtvý retenční čas, redukovaný retenční čas

Retenční čas (t_R) je definován jako doba od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky, vrcholu píku daného analytu. Tato charakteristika patří mezi kvalitativní parametry, která slouží pro identifikaci jednotlivých látek za použití standardů. [4,30]

Čas, za který nezadržovaná látka stacionární fázi projde kolonou, je nazýván jako mrtvý retenční čas (t_0). [4,31]

Redukovaný retenční čas (t'_R) lze získat odečtením mrtvého retenčního času od retenčního času (Vzorec č. 1). Tento parametr charakterizuje dobu, za kterou analyt interaguje se stacionární fází. [4,31]

$$t'_R = t_R - t_0$$

Vzorec č. 1: Vzorec pro výpočet redukovaného retenčního času

2.7.2. Distribuční konstanta

Distribuční nebo také rozdělovací konstanta (K_D) je definována jako poměr koncentrací analytu ve stacionární c_S a mobilní fázi c_M (Vzorec č. 2). Distribuční konstanta popisuje distribuci analytu mezi jednotlivými fázemi. Čím je hodnota distribuční konstanty vyšší, tím je i koncentrace analytu ve stacionární fázi větší a je déle zadržován v koloně. [4]

$$K_D = \frac{c_S}{c_M}$$

Vzorec č. 2: Vzorec pro výpočet distribuční konstanty

2.7.3. Retenční faktor

Retenční faktor (k) určuje míru retence (afinity) analytu ke stacionární fázi (SF). Jedná se o bezrozměrnou veličinu, která je nezávislá na průtoku mobilní fáze (MF) a parametrech kolony. [1,30] Pokud by bylo provedeno měření analytu na dvou kolonách, které mají různé parametry, ale stejný typ SF a bylo použito stejného typu MF, retenční

faktor by měl být stejný. [1] Pomocí retenčního faktoru lze porovnat kolony s různou geometrií. [4] Výpočet retenčního faktoru je podle Vzorce č. 3.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}$$

Vzorec č. 3: Vzorec pro výpočet retenčního faktoru

2.7.4. Selektivita

Selektivita (α) popisuje schopnost chromatografického systému rozdělit dvě látky. Podle Vzorce č.4 je popisována jako poměr retenčních faktorů (k) nebo poměr redukovaných retenčních časů (t'_R). Primárním cílem je dosáhnout hodnot vyšších než 1. Selektivita je ovlivňována vlastnostmi analytu a jeho interakcemi se SF i MF. [1,31]

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0}$$

Vzorec č. 4: Vzorec pro výpočet selektivity

2.7.5. Rozlišení

Spolu se selektivitou popisuje míru separace dvou analytů také rozlišení. Vypočítá se podle Vzorce č. 5 jako podíl rozdílu retenčních časů (t_R) a součtu šířek píků v polovině jejich výšky (w_h). Aby došlo k separaci dvou píků na základní linii, musí být hodnota rozlišení alespoň 1,5. Protože rozlišení bere v úvahu i šířku píku, je tento parametr přesnější než selektivita. Zlepšení rozlišení je dosaženo buď zvýšením účinnosti nebo úpravou selektivity a retence. [1,31]

$$R = 1,18 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_{h_2} + w_{h_1}}$$

Vzorec č. 5: Vzorec pro výpočet rozlišení

2.7.6. Účinnost

Při analýze prochází vzorek kolonou v určité zóně a dochází k rozšíření této zóny, tzv. rozmývání eluční zóny. Míru rozšíření elučních zón lze definovat jako účinnost. V dnešní době je nejvíce používaná teorie počtu teoretických pater (N). Tato teorie předpokládá dva aspekty: že dochází k rovnováze analytu mezi MF a SP, a kolona je rozdělena do tzv. hypotetických pater. Každé patro má definovanou výšku (height equivalent to a theoretical plate, HETP) a je charakterizováno dobou, za kterou dojde

k rovnováze. Z výše uvedeného vyplývá, že čím je patro užší, tím je účinnost vyšší. [1]
Výpočet účinnosti je podle Vzorce č. 6.

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Vzorec č. 6: Vzorec pro výpočet účinnosti

Pro porovnání účinnosti dvou kolon o různé délce slouží parametr výškový ekvivalent teoretického patra (H). Podle Vzorce č. 7 se vypočítá jako podíl délky kolony (L) a počet teoretických pater (N). Jednotky jsou uvedeny v μm . [4] Čím menší je výškový ekvivalent teoretického patra, tím je kolona účinnější.

$$H = \frac{L}{N}$$

Vzorec č. 7: Vzorec pro výpočet ekvivalentu výškového patra

2.8. Chirální stacionární fáze

Základ úspěšné chirální separace závisí na správné volbě chirální stacionární fáze (CSP). Důležité je znát mechanismy (Tabulka č. 3) uplatňující se při separačním procesu a jaké analyty jsou tedy pro daný typ CSP vhodné. Separace chirálních látek na CSP v HPLC probíhá ve třech různých módech: NP, RP, P. Separací mód je tedy dalším kritériem pro volbu selektoru. [4,7,35]

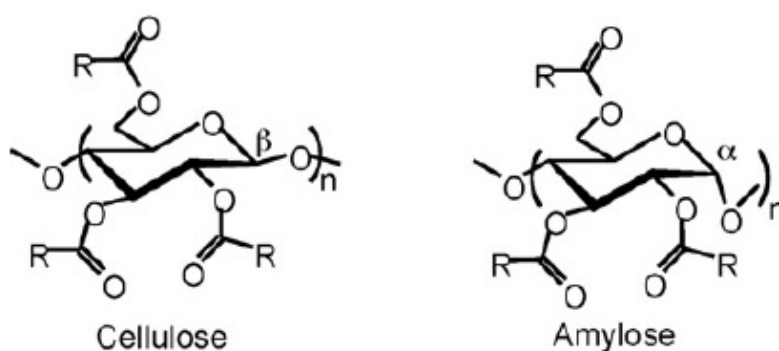
Tabulka č. 3: Přehled chirálních stacionárních fází, typy analytu, interakcí a separačních módů [4,7,35,36,37,38,39]

CSP	Typ analytu	Typ interakce	Separací mód
Polysacharidy	objemná skupina v blízkosti chirálního centra, skupina poskytující H-můstky	H-můstky, π - π interakce, dipól-dipól, inkluzní komplexy, Van der Waalovy síly, sterické efekty	NP, RP, PO
Cyklofruktany	primární aminoskupina, aromatická skupina	iont-dipól, dipól-dipól, H-můstky, sterické efekty	NP, RP, PO
Makrocyclické glykopeptidy	objemná skupina v blízkosti chirálního centra, skupina poskytující H-můstky	H-můstky, π - π interakce, iontové interakce, dipól-dipól, iont-dipól, hydrofobní vazby, sterické efekty	NP, RP, PO
Pirklovy fáze	aromatická skupina, skupina poskytující H-můstky, objemná skupina v blízkosti chirálního centra	H-můstky, π - π interakcí a vazeb dipól-dipól	NP
Crown-ethery	látky obsahující primární aminoskupinu	inkluzní komplexy, H-můstky	NP, RP, PO
Proteiny	kyselé, bazické, neutrální látky (ionizovatelná skupina)	hydrofobní a elektrostatické interakce	RP
Iontově-výměnné	látky obsahující ionizovatelné skupiny	H-můstky, π - π interakce	RP, PO
Ligand-výměnné	látky obsahující dvě nebo tři elektron donorové funkční skupiny	koordinační vazby	NP, RP, PO
Syntetické polymery	objemná skupina v blízkosti chirálního centra, skupina poskytující H-můstky	H-můstky, π - π interakce, sterické efekty	NP a PO
Cyklodextriny	aromatická a planární skupina	inkluzní komplexy, H-můstky	NP, RP, PO

2.8.1. Polysacharidové CSP

Přírodní polysacharidy (celulóza, amyulóza) se staly základem pro výrobu chirálních selektorů. Protože jejich chirální selektivita v nativní formě není vysoká, bylo připraveno velké množství jejich derivátů (zejména estery a karbamáty). Největší výhodou těchto CSP je široké spektrum látek, které lze na těchto stacionárních fázích úspěšně separovat. [4,7,35,36]

Chirální selektivita těchto selektorů je závislá zejména na struktuře jednotlivých polysacharidů, která je zobrazena na Obrázku č. 10. Celulóza a amyulóza jsou tvořené glukózovými jednotkami vzájemně spojenými glykosidickými vazbami (celulóza: β -1,4; amyulóza: α -1,4). Proto má celulóza lineární a amyulóza helikální strukturu. Volné hydroxylové skupiny glukózy jsou substituovány vhodnými substituenty, zejména ze skupiny benzoátů a fenyلكarbamátů. Lepší enantioselektivita je prokázána u amyulózy. Nejlepší selektivita byla pozorována u derivátů 3,5-dimethylfenyلكarbamátu. [4,7,35,37] Interakce podílející se na chirální diskriminaci vzniklých komplexů analyt-selektor jsou vodíkové vazby, π - π interakce, vazby dipól-dipól nebo Van der Waalsovy síly. [35,36,37]



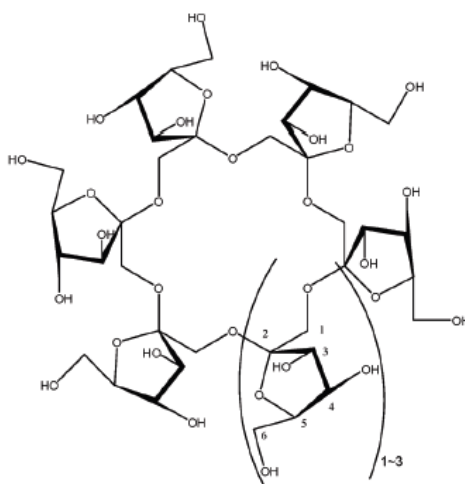
Obrázek č. 10 Struktura derivátů celulózy a amyulózy [38]

Polysacharidové chirální selektory jsou připravené způsobem, kdy je silikagel nebo jiný nosič potažen tenkou vrstvou polymeru (tzv. coating). Nevýhodou těchto selektorů je nekompatibilita s určitými rozpouštědly (např. toluen, chloroform, aceton), protože dochází k rozpuštění polymerní vrstvy. Proto další možností přípravy kolony a zamezení tomuto jevu je kovalentní imobilizace polymeru na silikagelový nosič. [4,7]

2.8.2. Cyklofruktany

Cyklofruktany (CFs) jsou cyklické oligosacharidy. Jsou produktem působení enzymu cykloinulino-oligosacharidové fruktanotransferázy, vyskytující se v bakteriích rozkládající inulin. Skládají se z D-fruktofuranózových jednotek spojených β -1,2 vazbami, kde v praxi používané cyklofruktany obsahují 6, 7 nebo 8 fruktofuranózových jednotek a jsou označeny zkratkami: CF6, CF7, CF8. Struktura těchto selektorů (Obrázek č. 11) je popisována jako tvar disku. Vnitřní část je tvořena kruhem stejným jako je struktura crown-etherů, na který jsou připojeny sacharidové jednotky do spirálovitého tvaru. Každá tato jednotka obsahuje čtyři chirální centra a tři hydroxylové skupiny. [37,39,40]

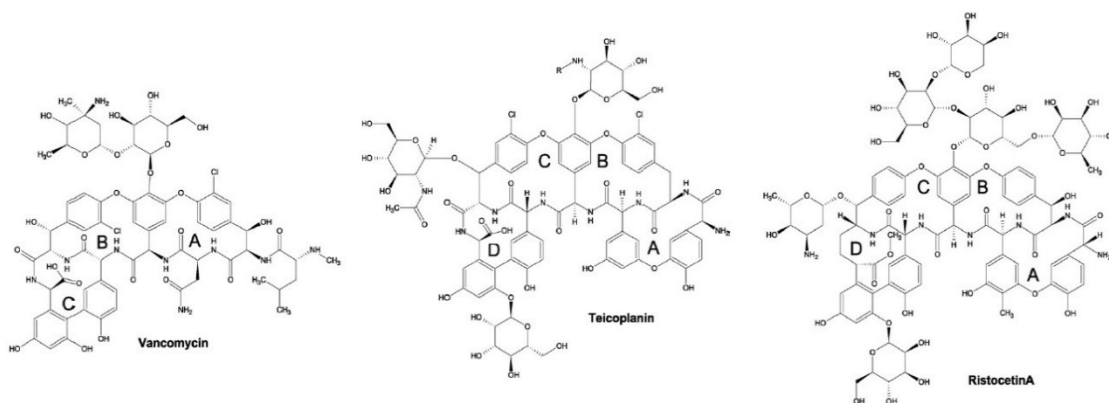
V závislosti na derivatizaci CFs lze tyto selektory použít při NP, RP a PO módu a mezi hlavní typy interakcí charakteristické pro tyto selektory jsou vazby iont-dipól, dipól-dipól, π - π interakce a vodíkové vazby. V důsledku sterického bránění hydroxylových skupin, které směřují do vnitřní části selektoru, je selektivita chirální separace snížena. Pro zvýšení selektivity byly připraveny deriváty, a to zejména alifatické nebo aromatické karbamáty. Jako nejvýhodnější selektor ze skupiny cyklofruktanů se prokázal CF6. Substituce OH-skupin alifatickými deriváty (isopropylkarbamát) se ukázala jako výhodná pro separaci primárních aminů, kdežto aromatické deriváty (R-naftylethylkarbamát) našly uplatnění pro analýzu široké škály aromatických látek. [37,39,40]



Obrázek č. 11 Struktura cyklofruktanu [40]

2.8.3. Makrocyklické glykopeptidy

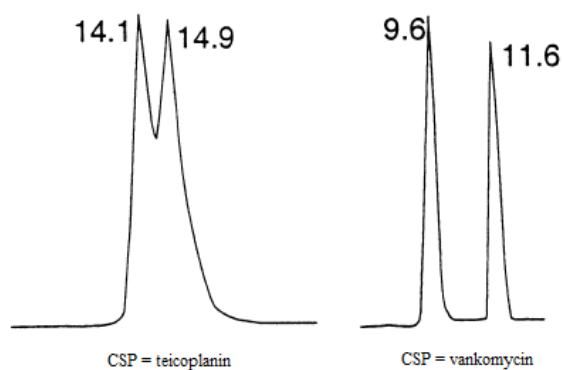
Jako další chirální selektory našly uplatnění látky ze skupiny makrocyklických antibiotik, a to makrocyklické glykopeptidy. Pro využití v chirálních separacích se z této skupiny nejčastěji používá vankomycin, teicoplanin, ristocetin A, a aglykon teicoplaninu. [7,37,39] Strukturu antibiotických selektorů (Obrázek č. 12) lze popsat jako koš ve tvaru písmene C, jehož základ (aglykon) je tvořen heptapeptidem, který vzájemně propojuje makrocykly, na které je připojený sacharidová skupina. [39] Vankomycin ve své struktuře obsahuje 3 makrocykly, teicoplanin a ristocetin obsahují každý po čtyřech makrocyklech.



Obrázek č. 12 Struktura vankomycinu, teicoplaninu a ristocetinu A [38]

Všechny výše zmíněné selektory jsou kovalentně připojené k silikagelu a mohou být využity v těchto separačních módech: normální, reverzní, polárně-organický. [7,37,39]

Struktura, početné množství chirálních center a rozmanitá přítomnost funkčních skupin těchto CSP, jako např. karboxylové nebo aminové skupiny, umožňují širokou řadu interakcí mezi analytem a selektorem. Mezi tyto interakce patří vodíkové vazby, π - π interakce, iontové interakce, vazby dipól-dipól nebo iont-dipól a hydrofobní vazby, a proto jsou tyto CSP vysoce selektivní. Selektivita je ovlivněna složením mobilní fáze (MF), pH nebo teplotou. [4,7,37,39,41] Unikátní výhodou těchto CSP je komplementarita fází. Princip komplementarity umožňuje záměnu dvou selektorů při zachování MF. Na Obrázku č. 13 je uveden příklad warfarinu, který je pouze částečně separován při použití teicoplaninu, ale při výměně za vankomycin je dosaženo rozdělení až na základní linii, a to v kratším čase. [23] Dále lze zapojit více kolon do série, a tím maximalizovat selektivitu. [23,41]



Obrázek č. 13: Příklad komplementarity u warfarinu, převzato a upraveno [23]

2.8.4. Donor-akceptorové selektory (Pirklovy fáze)

Donor-akceptorové SF, někdy také zvané Pirklova typu nebo brush-type, jsou neutrální nízkomolekulární látky syntetického nebo semisyntetického původu. Tyto selektory mohou ve své struktuře obsahovat π -akceptorové skupiny (např. 3,5-dinitrofenyl), π -donorové skupiny (např. tetrahydrofenanthren) nebo je mohou kombinovat. Proto jsou schopné donor-akceptorových vazeb včetně vodíkových vazeb, π - π interakcí a vazeb dipól-dipól. Z důvodu důležitosti těchto interakcí pro vytvoření a stabilizaci vzniklých komplexů analyt-selektor jsou tyto SF méně efektivní při použití RP a PO módů, kde je použito polárních rozpouštědel. Přítomnost objemných skupin slouží jako sterické bariéry a mohou zvyšovat enantioselektivní potenciál SF. Výhoda Pirklových fází spočívá v tom, že jsou dostupné v obou enantiomerních formách, kdy výměna selektoru vede k opačnému elučnímu pořadí enantiomerů. [7,35,39]

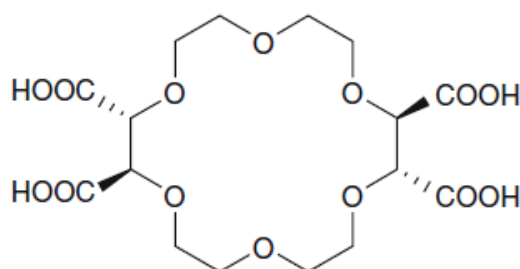
Jedním z aspektů pro tvorbu Pirklovy SF je princip reciprocity, který udává, že funkce analytu a selektoru jsou zaměnitelné. Pokud CSP A je schopná separovat enantiomery látky B, může být látka B použita jako CSP a separovat enantiomery látky A a její strukturálně podobné látky. Tento koncept byl využit pro tvorbu nových pokročilých CPS. Pirklovy fáze můžeme rozdělit na tři typy: [7,35]

- π -akceptorové
- π -donorové
- π -donor-akceptorové

2.8.5. Crown-ethery

Jedná se o makrocyclické polyethery, které ve své struktuře (Obrázek č. 14) obsahují ethylenoxidový můstek ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), kde počet těchto můstků určuje velikost

kavity. Tyto selektory získávají svou enantioselektivitu zavedením chirálních molekul do jejich struktury. Jedná se zejména o deriváty dvou typů látek: 1,1'-binaftyl a kyselina vinná. Separovat lze látky, které obsahují ve své struktuře primární NH₂ skupiny (aminokyseliny, aminoalkoholy). Princip separace je založen na vzniku diastereoizomerních komplexů mezi CSP a analytem, které jsou utvářeny prostřednictvím vodíkových vazeb mezi amoniovým kationtem a kyslíkem crown-etheru. Podmínkou je tedy, aby bylo pH MF v rozmezí 1-3,5. Tyto SF jsou buď dynamicky nebo kovalentně vázané na silikagelový nosič. [4,7,39,42]



Obrázek č.14 Struktura crown-etheru [39]

2.8.6. Proteiny

Proteiny jsou makromolekulární látky složené z aminokyselin a svými chirálními vlastnostmi jsou schopné separace malých molekul, např. léčiv, a to stereospecificky a reverzibilně. Mezi proteinové CSP patří lidský sérový albumin (HSA), bovinní sérový albumin (BSA), kyselý α 1-glykoprotein (AGP), celobiohydrolasa (CBH), ovomucoid (OVM), avidin (AVI) a pepsin. [9] Tyto chirální selektory jsou kovalentně vázané na široko-porézní silikagel nebo polymerní nosiče. Výhodou těchto CSP je jejich kompatibilita s pufovanými vodnými MF, proto se tyto selektory využívají výhradně v RP módu a jsou široce využívány v biologických výzkumech. Další výhodou je široké spektrum látek možné analyzovat na těchto selektorech, a to látky kyselé bazické i neutrální. Nevýhodou je nízká kapacita kolony, koncentrace vzorku nesmí být vysoká a dále pořizovací cena těchto kolon je poměrně vysoká. [4,7,35,43]

Stejně jako u všech chirálních selektorů, mechanismus interakce proteinových SF je komplexní a není plně pochopený. Mezi hlavní interakce podílející se na separaci patří hydrofobní a elektrostatické interakce, dále vodíkové vazby a vznik inkluzních komplexů. Retence a enantioselektivita je ovlivňována pH, teplotou, obsahem organické složky, aditivy (alkylaminy: *N,N*-dimethyloktylamin; karboxylové kyseliny: kyselina hexanová,

kyselina heptanová), iontovou silou pufru a tvorbou iontových párů. Hydrofobní interakce jsou ovlivněny procentuálním zastoupením organické složky v MF, kdy zvýšením koncentrace organického modifikátoru dochází ke snížení retence látek, tedy k oslabování hydrofobních interakcí. Elektrostatické interakce mezi látkou a proteinem SF zahrnuje primárně iontově výměnný proces. Imobilizovaná proteinová SF přijímá náboj nad i pod pI (izoelektrický bod) proteinu, proto hodnota pH MF je určující pro retenci a selektivitu. Při dominanci elektrostatických sil zvýšení pH MF sníží retenci kyselin a zvýší retenci bazických látek. Protein přijímá náboj nad hodnotu pI proteinové SF (přijímá záporný náboj). Pokud převládají hydrofobní interakce, je tomu naopak. Proteinové CSP lze použít v rozmezí pH 3-7, extrémní hodnoty mohou zapříčinit denaturaci SF, ke které může přispívat i teplota vyšší 40 °C. [4,7,35]

2.8.7. Iontově-výměnné a ligand-výměnné CSP

Iontově-výměnné CSP jsou někdy označovány jako podskupina Pirklových fází. Působením iontových interakcí, spolu reagují opačně nabitý analyt s chirálním selektorem. Vodíkové vazby a π - π interakce mají vliv na stabilitu vzniklého komplexu. Tyto chirální selektory rozdělujeme na aniontově-výměnné CSP založené na alkaloidech chinovníku, které slouží k separaci chirálních kyselin. Dále kation-výměnné CSP se základem v sulfonových a karboxylových kyselinách pro analýzu chirálních bazí a zwitterionové CSP kombinující strukturální prvky obou předchozích CPS, které jsou vhodné pro separaci kyselin, bazí a zwitteriony (látky obsahující kladný i záporný náboj). [7,37] Iontově-výměnné CSP se využívají při RP a PO módu a úprava jednotlivých experimentálních podmínek při použití určitého módu má vliv na enantioselektivitu: pH (RP mód), poměr kyselina:báze (PO mód), typ a množství organického rozpouštědla (RP a PO módy). [7]

Podstatou separace pro ligand-výměnné CSP je založen na vzniku reverzibilních koordinačních vazeb mezi analytem a centrálním atomem za vzniku ternárního komplexu, který se skládá z centrálního atomu (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}), dvou chirálních ligandů: selektoru a analyzovaného enantiomeru. Vzniklé komplexy jsou pak charakterizovány konstantami stability a chirální diskriminace enantiomerů probíhá u komplexů, jejichž konstanty jsou rozdílné. [4] Úspěšnost separace je založena na přítomnosti analytu s dvěma nebo třemi elektron donorovými funkčními skupinami jako jsou hydroxylové, aminové nebo karboxylové funkční skupiny (typicky přítomné u α -aminokyseliny, aminoalkoholy a α -hydroxykyseliny). Jako selektory se používají

cyklické aminokyseliny, např. prolin a hydroxyprolin. Tyto selektory mohou být na nosič připevněny dvěma způsoby, 1) kovalentně navázány na silikagel a organický polymer nebo 2) dynamicky vázané na RP materiály. [4,7,37]

2.8.8. Syntetické polymery a molekulárně vtištěné polymery

Syntetické polymery jako např. polyakrylamidy, polymetakryláty nebo polyacetyleny jsou získávány polymerizací chirálních monomerů za zisku polymeru s helikální strukturou. Proteiny s definovanou helikální strukturou mohou být připraveny pomocí nekovalentní tzv. „helicity induction and memory strategy“. Polymerizace může probíhat buď způsobem “grafting on”, kdy jsou polymery připevněny na nosič pomocí co-polymerizace. Druhý typ je “grafting from”, kdy je na povrch nosiče imobilizován radikál (iniciátor) a po přidavku monomerů a zahájení polymerizace zahřátím vzniká polymerní řetězec. Chirální diskriminace je uskutečňována vodíkovými vazbami, π - π interakcemi, ale i sterický vliv má svou úlohu. Syntetické polymerní CSP se používají pro analýzu širokého spektra látek, jako jsou benzodiazepiny, karboxylové kyseliny, kdy je použito NP a PO módu. [7,37,39]

Molekulárně vtištěné polymery jsou výsledkem polymerizace funkčních monomerů za přítomnosti předlohy, kterou je stereochemicky čistá molekula – enantiomer. Proto jsou tyto selektory použity pro analýzu konkrétních látek nebo látek strukturně podobných. Příprava těchto CSP může probíhat kovalentní nebo nekovalentní cestou. Princip chirální separace je založen na sterickém uspořádání interakčních skupin templátu a polymeru. [37,39]

2.9. Cyklodextriny

2.9.1. Struktura a vlastnosti

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy tvořené glukopyranozovými jednotkami, které jsou spojeny α -1,4 glykosidickými vazbami. Vznikají hydrolýzou škrobu za působení enzymu cyklodextrin-glykosyltransferázy (CGTasa). Jedná se o extracelulární enzym, který je produkován různými druhy bakterií, např. *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium* spp., *Bacillus macerans* nebo *Bacillus circulans*.

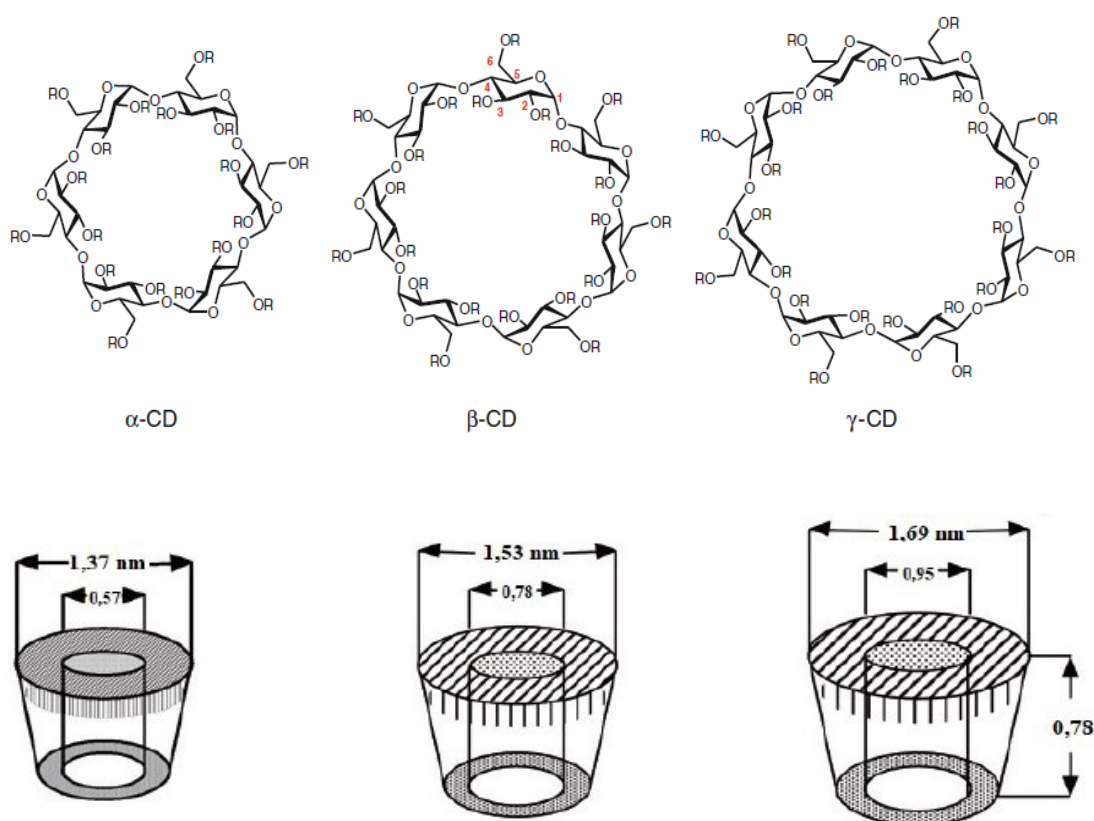
Dnes v chirálních separacích nejvýznamněji využívané jsou α , β , γ -cyklodextriny, které jsou tvořeny 6-8 glukózovými jednotkami: α -cyklodextrin (α -CD) je složen ze šesti, β -cyklodextrin (β -CD) sedmi a γ -cyklodextrin (γ -CD) osmi jednotek. [4,7,44,45,46] V závislosti na počtu glukózových jednotek se vnitřní průměr jednotlivých CD liší, z toho vyplývá využití jednotlivých CD v závislosti na velikosti analytu. [4,7,35] α -CD se uplatňuje pro separaci malých molekul (jeden cyklus), sloučeniny obsahující dva kruhy jsou separovány pomocí β -CD a pro separaci větších molekul obsahující tři a více kruhů (steroidy) slouží γ -CD. Největší uplatnění našel β -CD. [4,7,35,47] Vlastnosti jednotlivých typů CD jsou uvedeny v Tabulce č. 4. Cyklodextrin má tvar dutého kužele a orientace jednotlivých substituentů (hydroxylových skupin) určuje specifické vlastnosti cyklodextrinu: vnitřní část (kavita) je hydrofobní, vnější část je hydrofilní. Přítomnost uhlovodíkového řetězce a etherických kyslíků určují hydrofobní vlastnosti vnitřní části, zatímco sekundární hydroxylové skupiny na širším horním okraji a primární hydroxylové skupiny na užším okraji charakterizují hydrofilní vlastnosti vnější části. [4,7,35]

Tabulka č. 4: Vlastnosti jednotlivých typů cyklodextrinů [4,48]

	α -CD	β -CD	γ -CD
Počet glukosových jednotek	6	7	8
Molární hmotnost [g.mol ⁻¹]	973	1135	1297
Rozpustnost ve vodě při 25 °C [g/100 ml]	14,5	1,85	23,2
Průměr kavity (primární/sekundární okraj) [nm]	0,57-1,37	0,78-1,53	0,95-1,69
Hloubka kaviny (nm)	0,79-0,80	0,79-0,80	0,79-0,80

Mezi výhody CD patří nízká cena, univerzálnost, stabilní výkonnost a vysoký stupeň chirální diskriminace. [45,49] Derivatizací hydroxylových skupin CD lze měnit

jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Vzniklé deriváty mají lepší rozpustnost v organických rozpouštědlech a vodě. K chemické modifikaci může docházet na obou okrajích CD, jak hydrofobními (např. methyl, propyl), tak i hydrofilními skupinami (např. sulfátová, fosfátová nebo aminová skupina). [47] Chemickou modifikací lze zlepšit chirální diskriminaci, kdy se zvyšuje počet interakčních míst nebo se mění velikost kavity CD, a tím je ovlivněn přístup analytů do kavity. CD mohou být plně nebo částečně derivatizované a chemickou modifikací mohou vznikat např. estery, karbamáty nebo ethery. Chirální separace mohou probíhat v RP-módu, NP-módu i PO-módu. [4,7,35,49] Struktury jednotlivých CD jsou uvedeny na Obrázku č. 15.



Obrázek č. 15: Struktura jednotlivých CD [4,39]

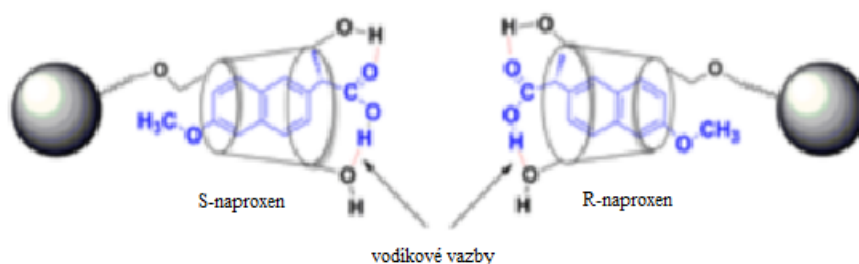
2.9.2. Syntéza

Výrobu CD lze provést dvěma postupy: proces s rozpouštědlem a proces bez rozpouštědla. Proces s rozpouštědlem zahrnuje organické komplexační činidlo, které selektivně pomocí precipitace získává pouze jeden typ CD. Např. přidáním toluenu nebo cyklohexanu je získán β -CD, pro selektivní tvorbu α -CD se používá ethanol nebo oktan-1-ol, γ -CD se získávají při přidání cyklotridekanonu. [50,51] V procesu bez rozpouštědla se žádné činidlo nepřidává a výsledkem je směs cyclodextrinů. Poměr

jednotlivých CD ve směsi je proto závislý na použité CGTase a reakčních podmínkách. [50]

2.9.3. Tvorba inkluzních komplexů

Mechanismus chirální diskriminace je založen na vzniku inkluzních komplexů (Obrázek č. 16) mezi cyklodextrinovým makrocylem a analytem. Tyto komplexy vznikají mezi kavitou CD a látkou, která má odpovídající strukturální vlastnosti, aby mohla vnikat do CD. Protože je kavita CD lipofilní, nepolární část analytu (např. aromatický kruh) může snadno vniknout dovnitř chirálního selektoru, hydrofilní část pak může reagovat s hydroxylovými skupinami na okrajích cyklodextrinu. Tyto reakce probíhají nejčastěji ve vodném prostředí nebo směsi vody a organického rozpouštědla. Vzniklé komplexy jsou stabilizovány především van der Waalsovými interakcemi, vodíkovými nebo disperzními vazbami. Vzniklé komplexy hostitel-host jsou charakterizovány konstantami stability. Zda dojde k tvorbě inkluzního komplexu, rozhoduje velikost kavity. Pokud je nepolární část analytu větší než kavita, inkluzní komplex je málo stabilní, vzniklá vazba je slabá a v některých případech vůbec nevzniká. [4,45,46,47,48]



Obrázek č. 16: Schéma inkluzních komplexů mezi enantiomery naproxenu a β -CD/SiO₂, převzato a upraveno [52]

3. Cíl práce

Cílem této práce bylo zkoumání vlivu chromatografických podmínek na chirální a nechirální interakce vybraných analytů se stacionární fází na bázi cyklodextrinu. Povrch silikagelu obsahuje kovové kontaminanty, které mohou díky sekundárním interakcím ovlivňovat retenci analytu a také mít vliv na chirální separaci. Příslušnou úpravou chromatografických podmínek byl otestován vliv na retenční chování látek bazického, kyselého a neutrálního charakteru.

4. Experimentální část

4.1. Přístroje, kolona, pomůcky a chemikálie

Přístroje:

kapalinový chromatograf LC 20 A Prominence (Schimadzu, Kyoto, Japonko):

- odplyňovač, typ DGU 20 A3
- dvě vysokotlaká čerpadla, typ LC 20 AD
- autosampler, typ SIL-20 AC
- řídicí jednotka, typ CBM-20 AC
- detektor, typ SPD-M20A
- kolonový prostor, typ CTO-20AC
- software LC Solution Version 1.22 SP1

acidimetr (Acidimetr 333, Druopta, Praha, Česká republika)

analytické váhy (Kern, Unipro-Alpha, Praha, Česká republika)

ultrazvuková koupel (Ecoson, Praha, Česká republika)

spektrofotometr (UV-2401, Shimadzu, Japonsko)

Chromatografická kolona:

YMC CHIRAL β -CD BR, 250 \times 4,6 mm, velikost částic 5 μ m (Chromservis, Praha, ČR)

Pomůcky:

laboratorní sklo – kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, pipety, automatické pipety, mikropipety, vialky

Chemikálie:

edetan disodný (EDTA), hydroxid sodný (NaOH) – Penta (Chrudim, Česká republika)

acetonitril (ACN), guaifenezin, hexobarbital, ibuprofen, ketoprofen, kyselina octová (AcA), metadon, methanol (MeOH), oxazepam, propranolol, triethylamin (TEA), warfarin – Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

čištěná voda – Merck Millipore (Merck-Darmstadt, Německo)

4.2. Příprava vzorků a mobilní fáze

Příprava vzorků

Vzorky byly připraveny rozpuštěním 0,5 mg vzorku v 0,5 ml metanolu a poté naředěny 0,5 ml vodou. K usnadnění rozpuštění bylo využito ultrazvukové lázně a vzorky byly uchovávány v lednici. Přehled vzorků s jejich strukturním vzorcem, systematickým názvem, UV-spektrém a pKa jsou uvedeny v Tabulce č. 6.

Příprava mobilní fáze

Byly připraveny čtyři typy mobilních fází:

1. organické rozpouštědlo (MeOH nebo ACN) + 0,1M AcA upravena TEA na pH 5,6
2. organické rozpouštědlo + H₂O
3. organické rozpouštědlo + H₂O s přídavkem EDTA
4. organické rozpouštědlo + 0,1M AcA upravena NaOH na pH 3,2

1. MF obsahující 0,1M AcA byla připravena rozpuštěním 1,50 g AcA. Hodnota pH byla následně upravena přidáním TEA a zkontrolována použitím acidimetru. MF byla poté vakuově přefiltrována a odplyněna pomocí ultrazvukové lázně.

2. MF složená z organického rozpouštědla a H₂O byla smíšená přístrojem v poměru podle zadaného experimentu.

3. Pro MF obsahující EDTA byl připraven zásobní roztok EDTA o koncentraci 200 mM. Poté podle požadované koncentrace bylo vzato příslušné množství zásobního roztoku EDTA a doplněno do 100 ml vodou a organickým rozpouštědlem podle požadovaného poměru. MF byla poté odplyněna pomocí ultrazvukové lázně.

4. MF obsahující 0,1M AcA byla připravena rozpuštěním 1,50 g AcA. Hodnota pH byla následně upravena přidáním 1M NaOH a zkontrolována použitím acidimetru. MF byla vakuově přefiltrována a odplyněna pomocí ultrazvukové lázně.

4.3. Chromatografické podmínky

Nastavení chromatografických podmínek je uvedeno v Tabulce č. 5

Tabulka č. 5: nastavení chromatografických podmínek

Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
Nastříknutý objem vzorků	3 μ l
Teplota termostatu	25 °C
Typ eluce	isokratická
Detekce	220 nm, 254 nm
Separáční mód	reverzní

Devět vybraných analytů (Tabulka č. 6) bylo rozděleno do tří skupin podle svých acidobazických vlastností. V každé skupině byl vybrán hlavní analyt (baze: propranolol, kyseliny: ketoprofen, neutrální látky: hexobarbital). Další látky skupiny sloužily pro porovnání a potvrzení výsledků. Procentuální ionizace analytů byla vypočítána podle Vzorce č. 8 (Henderson-Hasselbalchova rovnice).

$$pK_a = pH + \log \frac{c_{prot.}}{c_{deprot.}}$$

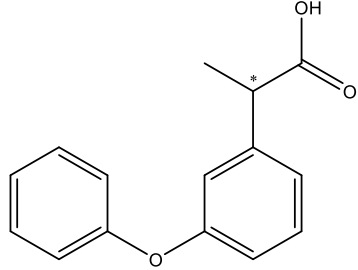
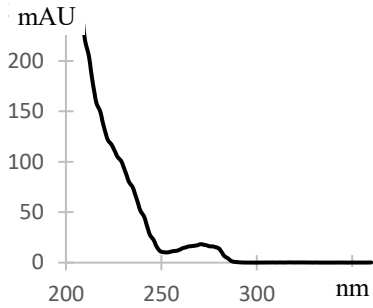
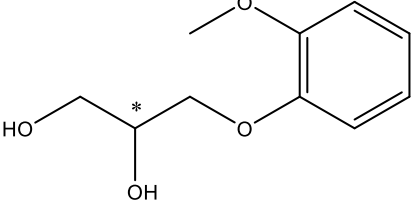
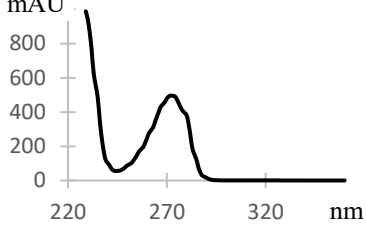
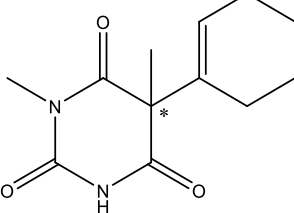
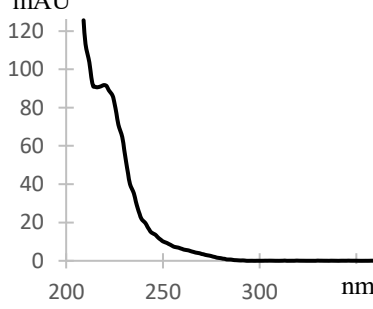
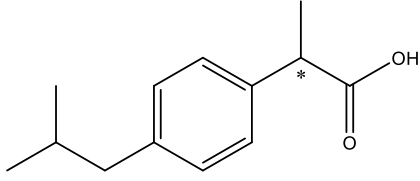
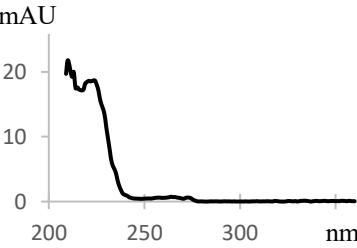
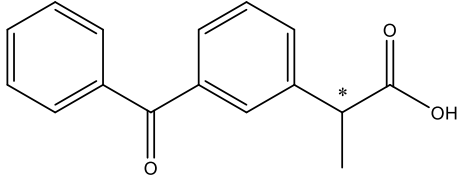
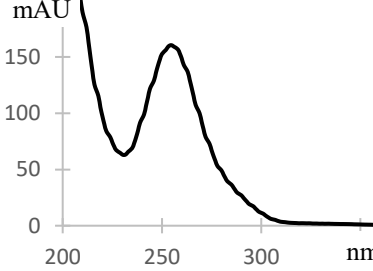
Vzorec č. 8: Henderson-Hasselbalchova rovnice

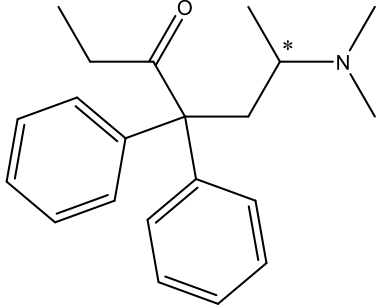
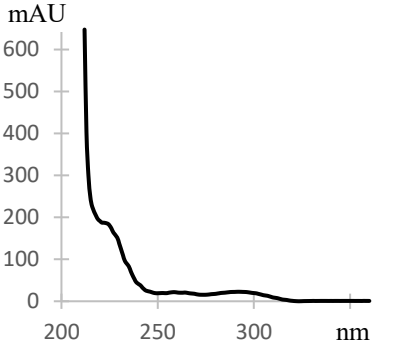
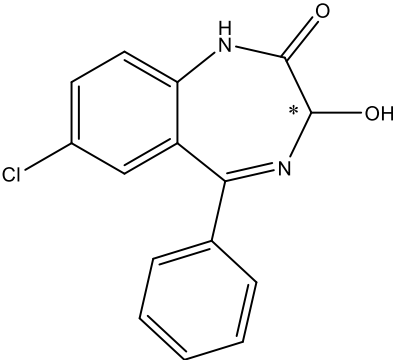
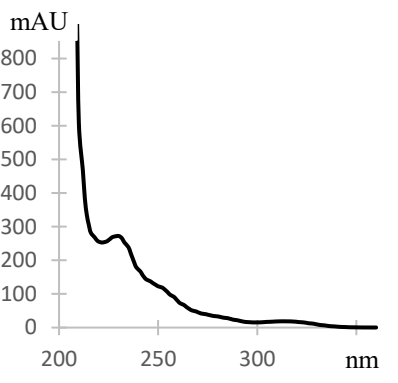
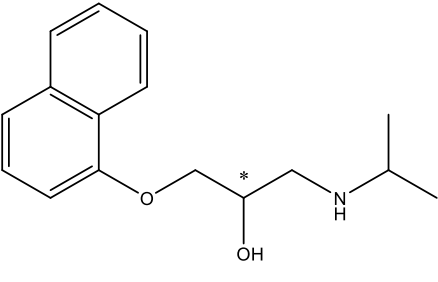
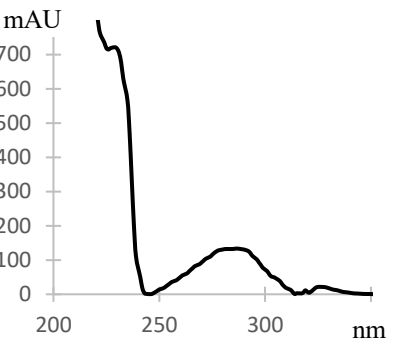
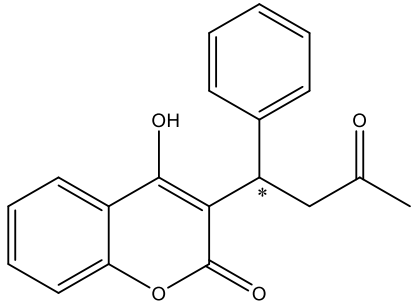
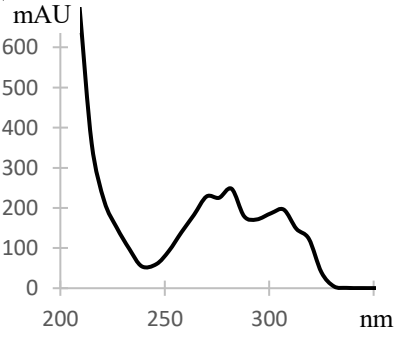
Rozlišení bylo počítáno dle Vzorce č. 9.

$$R = 2 \times \frac{t_R - t_{Rp}}{w + w_p}$$

Vzorec č. 9: Vzorec pro rozlišení

4.4. Seznam analytů

Název	Strukturní vzorec	UV-spektrum	pKa
	Systematický název		
Fenoprofen			4,25
	2-(3-fenoxyfenyl)propanová kyselina		
Guaifenezin			13,68
	3-(2-methoxyfenoxy)propan-1,2-diol		
Hexobarbital			7,99
	5-(cyclohex-1-en-1-yl)-1,5-dimethylpyrimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-trion		
Ibuprofen			4,37
	2-(4-isobutylfenyl)propanová kyselina		
Ketoprofen			4,14
	2-(3-benzoylfenyl)propanová kyselina		

Metadon			9,61
Oxazepam			11,65
Propranolol			14,04
Warfarin			8,69

Tabulka č. 6: Strukturní a systematické názvy analytů, jejich spektra a pKa
Hodnota pKa vypočtena podle programu ChemDraw 18.0. [11]

4.5. Výsledky a diskuze

Cílem mé diplomové práce bylo ověření vlivu achirálních interakcí na chirální separaci. Jedná se o elektrostatické interakce mezi povrchem silikagelu a nabitým analytem. Tyto interakce jsou silnější než hydrofobní interakce s chirálním selektorem (CD). Výše zmíněné nežádoucí sekundární interakce mohou být ovlivněny změnou iontového stavu molekuly analytu nebo maskováním povrchu silikagelu, např. chelatací edetanem disodným (EDTA). V experimentu byly použity čtyři typy mobilních fází:

1. organické rozpouštědlo + 0,1M AcA upravena TEA na pH 5,6 (**MF 1**)
2. organické rozpouštědlo + H₂O (**MF 2**)
3. organické rozpouštědlo + H₂O s přísávkem EDTA (**MF 3**)
4. organické rozpouštědlo + 0,1M AcA upravena NaOH na pH 3,2 (**MF 4**)

MF 1 obsahující triethylaminoacetát může tvořit iontový pár s kyselinou i zásadou. Předpokládáme, že vytvořením iontového páru dochází k ovlivnění achirálních interakcí a analyty interagují pouze s chirálním selektorem. Pro potvrzení tohoto předpokladu jsme použili MF 2, která neobsahuje iontově-párové činidlo. Předpokládala se repulzní interakce mezi kladnými náboji kovových nečistot na povrchu silikagelu a bazickými analyty. Naopak u kyselin se očekávala silná retence s povrchem silikagelu. Další možností ovlivnění achirálních interakcí je maskování povrchu silikagelu, a proto jsme použili MF 3 obsahující EDTA. Chelatací kovových nečistot by mělo docházet k blokaci sekundárních interakcí a bazické i kyselý analyty by měly reagovat pouze s chirálním selektorem. Posledním typem byla použita MF 4 obsahující 0,1M AcA upravená na pH 3,2. V tomto pH je AcA v nedisociované formě, a proto neočekáváme vznik iontového páru s analyty. U bazických analytů se předpokládá repulzní interakce stejně jako při použití MF 2. Kyseliny jsou v tomto pH také v neionizované formě a měly by interagovat s chirálním selektorem za detekce chirální separace.

Pro potvrzení naší teze byl použit hexobarbital. Jedná se o neutrální látku. Ve výše zmíněných chromatografických podmínkách by měla mít neutrální náboj. Proto jsme očekávali, že ve všech čtyřech MF dojde k chirální separaci.

4.5.1. Bazické analyty

Do této skupiny patří propranolol a metadon. Hlavním analytem byl zvolen propranolol. Metadon poté sloužil k porovnání a potvrzení naměřených výsledků. První mobilní fáze, která byla použita v tomto experimentu, byla zvolena podle aplikačního listu výrobce kolony (bromovaný β -cyklodextrin). Jednalo se o MF 1 ve složení methanol (MeOH) a 0,1M kyselina octová (AcA), která byla upravena přidávkem triethylaminu (TEA) na pH 5,6. Chirální separace byla pozorována u obou analytů při nižší koncentraci organického rozpouštědla. S rostoucí koncentrací organického rozpouštědla klesala míra retence a chirálního rozlišení. Záměnou MeOH za acetonitril (ACN), který má vyšší eluční sílu, došlo ke zkrácení retenčních časů a snížení rozlišení. U propranololu nebyla pozorována chirální separace při použití ACN. V Tabulce č. 7 jsou shrnuty dosažené výsledky.

Tabulka č. 7: Dosažené výsledky pro bazické látky – MF 1

Vzorek	Chirální separace	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Rozlišení
10 % MeOH + 90 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				
Propranolol	ano	12,13	12,66	0,83
Metadon	ano	8,19	8,66	1,04
10 % ACN + 90 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				
Propranolol	ne	7,29	-	-
Metadon	ano	6,04	6,19	0,19
20 % MeOH + 80 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				
Propranolol	ano	8,85	9,17	0,64
Metadon	ano	6,14	6,38	0,47
20 % ACN + 80 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				
Propranolol	ne	5,54	-	-
Metadon	ne	5,55	-	-
40 % MeOH + 60 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				
Propranolol	ne	5,33	-	-
Metadon	ne	4,43	-	-
40 % ACN + 60 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				
Propranolol	ne	4,02	-	-
Metadon	ne	3,99	-	-

V této mobilní fázi triethylaminoacetát slouží jako iontově-párové činidlo a může vytvářet iontový pár jak s kyselinou, tak zásadou. Propranolol je při pH 5,6 z 99,99 % v ionizované formě a vytváří iontový pár s acetátovým aniontem. Iontový pár je v elektroneutrálním stavu a propranolol může interagovat s chirálním selektorem.

Další mobilní fázi byla kombinace organického rozpouštědla a vody (MF 2). Tato mobilní fáze neobsahuje iontově-párové činidlo, se kterým by mohl kladně nabitý analyt interagovat. V Tabulce č. 8 jsou shrnuty dosažené výsledky pro vodnou MF.

Ani u jednoho analytu nedošlo k chirální separaci a retenční časy obou látek byly v porovnání s předchozí MF (AcA upravená TEA na pH 5,6) kratší. Analyty byly eluovány za použití ACN z kolony v blízkosti mrtvého času ($t_0 = 4,28$ minuty). V případě MeOH byla zadrž na koloně silnější.

Tabulka č. 8: Dosažené výsledky pro bazické látky – MF 2

Vzorek	Chirální separace	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	Rozlišení
10 % MeOH + 90 % H₂O v/v				
Propranolol	ne	2,86	-	-
Metadon	ne	6,28	-	-
10 % ACN + 90 % H₂O v/v				
Propranolol	ne	3,64	-	-
Metadon	ne	2,97	-	-
20 % MeOH + 80 % H₂O v/v				
Propranolol	ne	3,29	-	-
Metadon	ne	7,12	-	-
20 % ACN + 80 % H₂O v/v				
Propranolol	ne	3,75	-	-
Metadon	ne	2,55	-	-
40 % MeOH + 60 % H₂O v/v				
Propranolol	ne	8,30	-	-
Metadon	ne	6,09	-	-
40 % ACN + 60 % H₂O v/v				
Propranolol	ne	3,25	-	-
Metadon	ne	2,44	-	-

Nečistoty kovu na povrchu silikagelu mají kladný náboj. Stejně tak propranolol i metadon mají při stanovených chromatografických podmínkách kladný náboj. Dochází k repulzním interakcím, kvůli kterým analyt neinteraguje s chirálním selektorem. Proto jsou retenční časy kratší než u přítomnosti triethylaminoacetátu. Tím se potvrdil předpoklad, že ovlivněním chromatografických podmínek dochází k ovlivnění achirálních a chirálních interakcí.

Pro další potvrzení vlivu achirálních interakcí na chirální separaci byla použita MF 3 s přidavkem 1,25mM EDTA. EDTA chelatuje kovy na povrchu SF. Dochází k zablokování sekundárních interakcí mezi kladně nabitým analytem a kladně nabitým povrchem stacionární fáze (repulze) a analyt poté může interagovat s chirálním selektorem. U obou analytů došlo k chirální separaci. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 9. Záměnou MeOH za ACN došlo ke snížení retence a rozlišení, ale na rozdíl od MF ACN + AcA upravená TEA došlo k chirální separaci propranololu. Pro ověření vlivu EDTA byla připravena MF o složení 5 % ACN a 5mM EDTA. Byla pozorována

chirální separace propranololu, který byl eluován v $t_{R1} = 10,21$ minuty, $t_{R2} = 10,54$ minuty a rozlišení = 0,55.

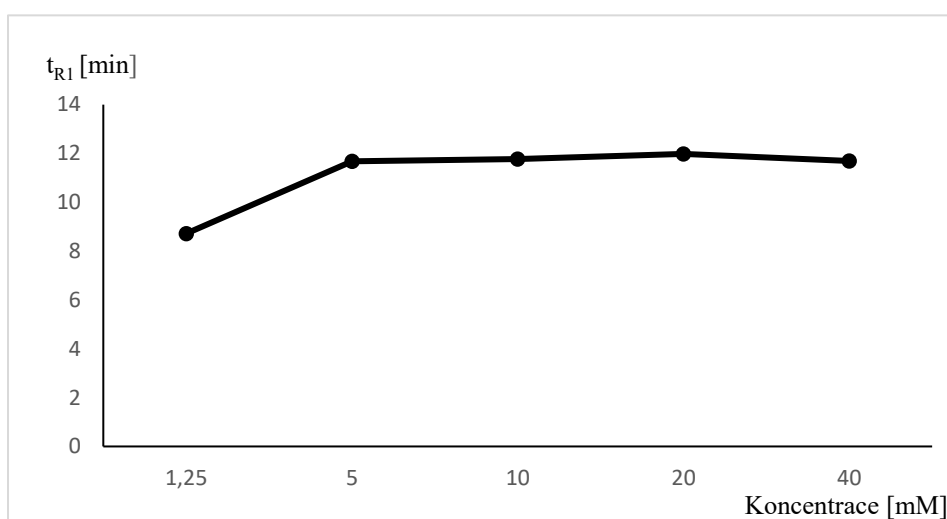
Tabulka č. 9: Dosažené výsledky pro bazické látky – MF 3

Vzorek	Chirální separace	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	Rozlišení
0,625 ml 200mM EDTA + 94,375 ml H ₂ O + 5 ml MeOH				
Metadon	ano	9,89	10,73	0,90
0,625 ml 200mM EDTA + 94,375 ml H ₂ O + 5 ml ACN				
Propranolol	ano	8,67	8,86	0,08
Metadon	ano	16,09	17,09	0,49
0,625 ml 200mM EDTA + 89,375 ml H ₂ O + 10 ml MeOH				
Propranolol	neeluováno	doba analýzy: 30 minut		
Metadon	ano	9,69	10,38	0,75
0,625 ml 200mM EDTA + 89,375 ml H ₂ O + 10 ml ACN				
Propranolol	ne	6,17	-	-
Metadon	ano	10,98	11,37	0,29
0,625 ml 200mM EDTA + 79,375 ml H ₂ O + 20 ml MeOH				
Propranolol	ano	12,75	13,27	0,53
Metadon	ano	6,37	6,68	0,60
0,625 ml 200mM EDTA + 79,375 ml H ₂ O + 20 ml ACN				
Propranolol	ne	4,18	-	-
Metadon	ne	5,71	-	-
0,625 ml 200mM EDTA + 59,375 ml H ₂ O + 40 ml MeOH				
Metadon	ne	4,68	-	-
0,625 ml 200mM EDTA + 59,375 ml H ₂ O + 40 ml ACN				
Propranolol	ne	3,61	-	-
Metadon	ne	4,28	-	-

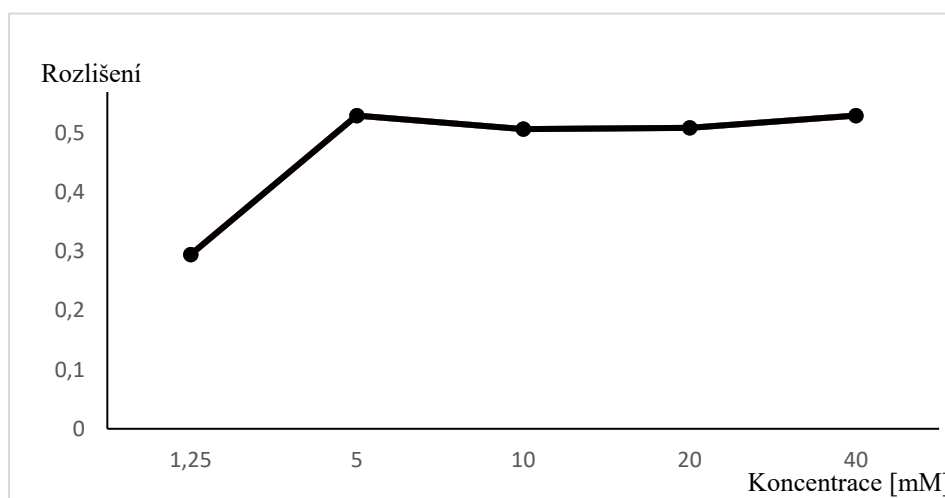
Následně byl zkoumán vliv koncentrace EDTA na chirální separaci. Na základě naměřených výsledků byl vybrán jako organické rozpouštědlo ACN (20 %). Koncentrace EDTA v MF byla: 1,25 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM a 40 mM (Tabulka č. 10). Vyšší koncentrace se nepřipravovala z důvodu rizika precipitace EDTA. U všech koncentrací byla zaznamenána chirální separace propranololu. Při zvýšení koncentrace EDTA z 1,25 mM na 5 mM došlo ke zvýšení retence a rozlišení. Další zvyšování koncentrace EDTA nemělo již zásadní vliv ani na retenci (Graf č. 1) ani na rozlišení (Graf č. 2). Stejný vliv měla zvyšující se koncentrace také na šířku píku, kdy při koncentraci EDTA 5 mM byly píky užší než při koncentraci 1,25 mM. Další změna koncentrace již nepřinesla v tomto ohledu zlepšení. Z naměřených dat plyne, že již při koncentraci 5 mM dojde k chelataci kovových nečistot na povrchu silikagelu. Předpokládáme, že retenci propranololu je za těchto podmínek zodpovědná interakce s chirálním selektorem a achirální složka byla minimalizována.

Tabulka č. 10: Vliv koncentrace EDTA na chromatografické chování propranololu

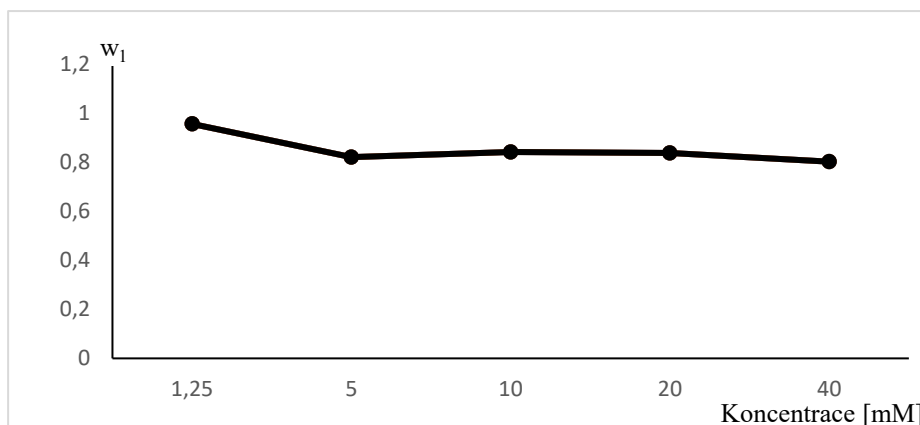
Koncentrace (mM)	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	Rozlišení	w_1	w_2
1,25	8,72	9,01	0,29	0,96	1,02
5	11,68	12,16	0,53	0,82	0,97
10	11,78	12,24	0,51	0,84	0,99
20	11,98	12,45	0,51	0,84	1,00
40	12,22	12,69	0,53	0,80	0,97



Graf č. 1: Závislost retenčního času na koncentraci EDTA u analýzy propranololu



Graf č. 2: Závislost rozlišení na koncentraci EDTA u analýzy propranololu



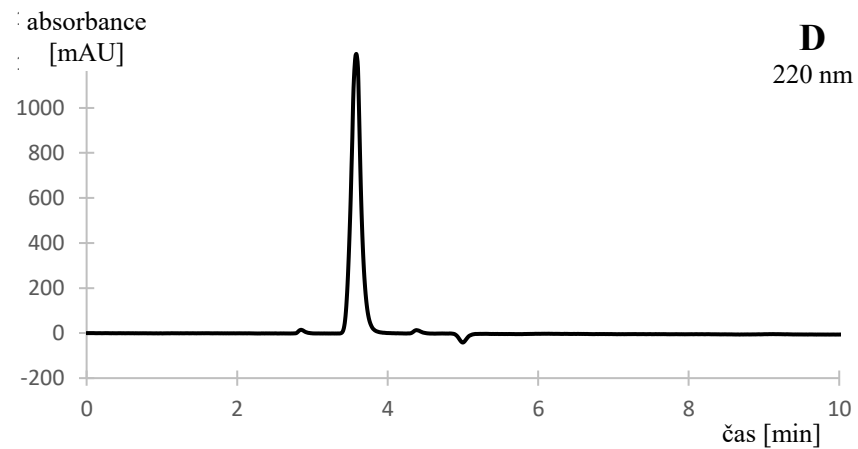
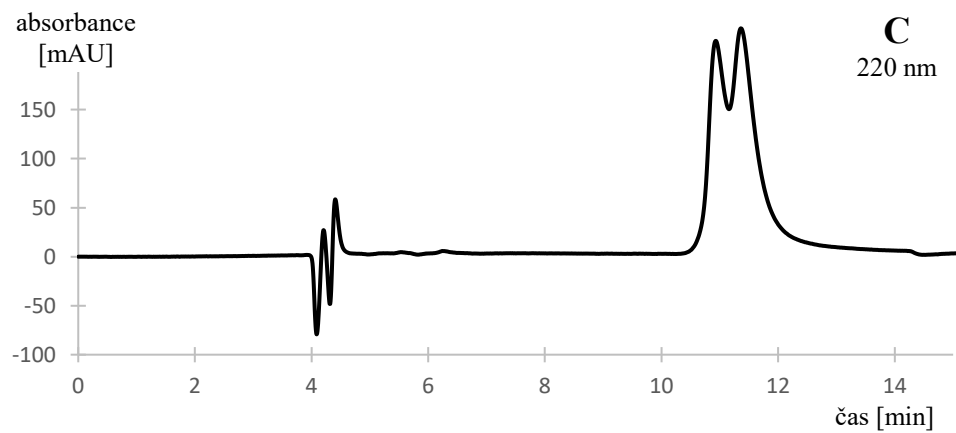
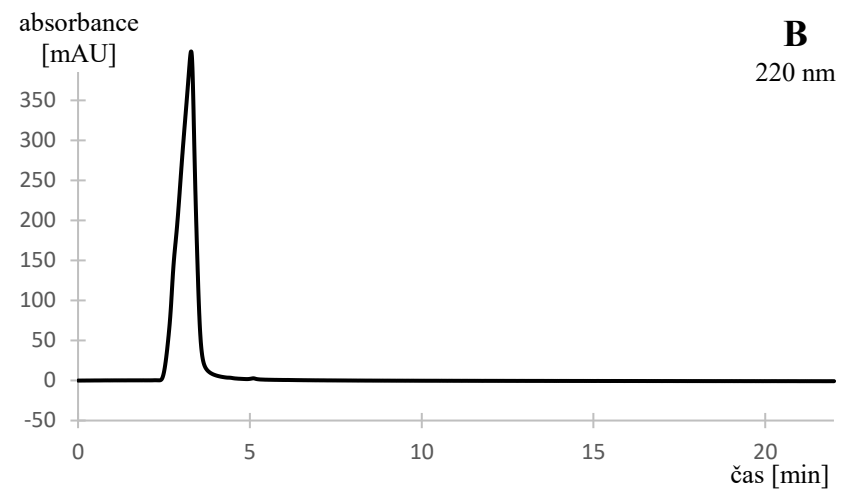
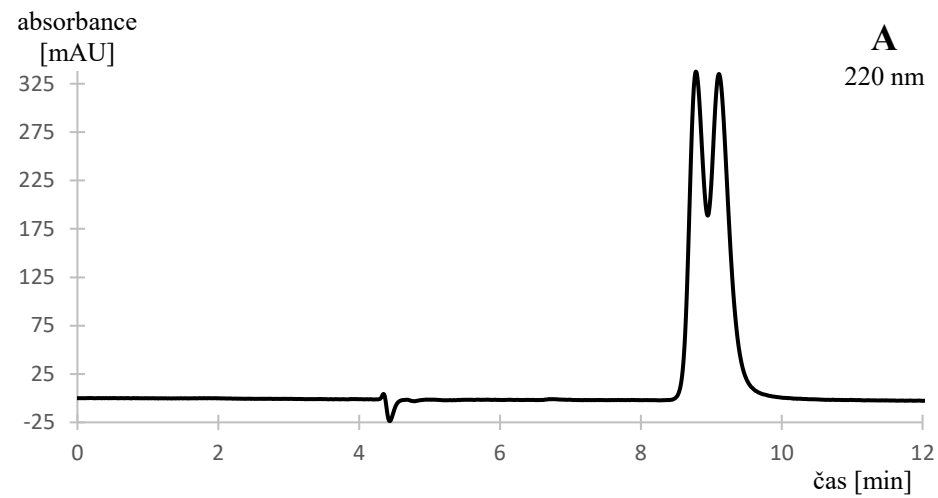
Graf č. 3: Závislost šířky píku na koncentraci EDTA u analýzy propranololu

V Tabulce č. 11 jsou uvedeny výsledky dosažené při použití MF 4: organické rozpouštědlo a 0,1M AcA upravená hydroxidem sodným (NaOH) na pH 3,2. Ani u jedné látky nedošlo k chirální separaci a eluce byla v blízkosti mrtvého času ($t_0 = 4,28$ minuty). Kyselina octová je při pH 3,2 z 97,32 % v nedisociované formě. Kladně nabitě analyty proto netvoří iontový pár a dochází k repulzním silám mezi povrchem silikagelu a analyty. Dále předpokládáme, že AcA nemaskuje kladný náboj pocházející z kovových nečistot, a proto jsou analyty detekovány v mrtvém čase ($t_0 = 4,28$ minuty).

Tabulka č. 11: Dosažené výsledky pro bazické látky – MF 4

Vzorek	Chirální separace	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	Rozlišení
10 % MeOH + 90 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				
Propranolol	ne	4,31	-	-
Metadon	ne	3,30	-	-
10 % ACN + 90 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				
Propranolol	ne	3,06	-	-
Metadon	ne	3,34	-	-
20 % MeOH + 80 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				
Propranolol	ne	3,58	-	-
Metadon	ne	2,93	-	-
20 % ACN + 80 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				
Propranolol	ne	2,85	-	-
Metadon	ne	2,78	-	-
40 % MeOH + 60 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				
Propranolol	ne	2,83	-	-
Metadon	ne	2,69	-	-
40 % ACN + 60 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				
Propranolol	ne	2,61	-	-
Metadon	ne	2,63	-	-

V Tabulce č. 12 je souhrn výsledků pro propranolol a metadon a na Obrázku č. 17 jsou chromatogramy propranololu pro čtyři základní mobilní fáze.



Obrázek č. 17: Chromatogramy propranololu – 20 % MeOH; **A** + 0,1M AcA upravena TEA (pH 5,6) **B** + H₂O, **C** + 1,25mM EDTA, **D** + 0,1M AcA upravena NaOH (pH 3,2)

Tabulka č. 12: Souhrn výsledků vybraných chromatografických podmínek: propranolol, metedon

Vzorek	Chirální separace	tr1 (min)	tr2 (min)	Rozlišení	Chirální separace	tr1 (min)	tr2 (min)	Rozlišení
	10 % MeOH + 90 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				10 % ACN + 90 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v			
Propranolol	ano	12,13	12,66	0,83	ne	7,29	-	-
Metadon	ano	8,19	8,66	1,04	ano	6,04	6,19	0,19
	20 % MeOH + 80 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				20 % ACN + 80 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v			
Propranolol	ano	8,85	9,17	0,64	ne	5,54	-	-
Metadon	ano	6,14	6,38	0,47	ne	5,55	-	-
	40 % MeOH + 60 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				40 % ACN + 60 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v			
Propranolol	ne	5,33	-	-	ne	4,02	-	-
Metadon	ne	4,43	-	-	ne	3,99	-	-
	20 % MeOH + 80 % H ₂ O v/v				20 % ACN + 80 % H ₂ O v/v			
Propranolol	ne	3,29	-	-	ne	3,75	-	-
Metadon	ne	7,12	-	-	ne	2,55	-	-
	40 % MeOH + 60 % H ₂ O v/v				40 % ACN + 60 % H ₂ O v/v			
Propranolol	ne	8,30	-	-	ne	3,25	-	-
Metadon	ne	6,09	-	-	ne	2,44	-	-
	0,625 ml 200 mM EDTA + 89,375 ml H ₂ O + 10 ml MeOH				0,625 ml 200 mM EDTA + 89,375 ml H ₂ O + 10 ml ACN			
Propranolol	neeluováno	doba analýzy: 30 minut			ne	6,17	-	-
Metadon	ano	9,69	10,38	0,75	ano	10,98	11,37	0,29
	0,625 ml 200 mM EDTA + 79,375 ml H ₂ O + 20 ml MeOH				0,625 ml 200 mM EDTA + 79,375 ml H ₂ O + 20 ml ACN			
Propranolol	ano	12,75	13,27	0,53	ne	4,18	-	-
Metadon	ano	6,37	6,68	0,60	ne	5,71	-	-
	0,625 ml 200 mM EDTA + 59,375 ml H ₂ O + 40 ml MeOH				0,625 ml 200 mM EDTA + 59,375 ml H ₂ O + 40 ml ACN			
Propranolol	-	-	-	-	ne	3,61	-	-
Metadon	ne	4,68	-	-	ne	4,28	-	-
	20 % MeOH + 80 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				20 % ACN + 80 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v			
Propranolol	ne	3,58	-	-	ne	2,85	-	-
Metadon	ne	2,93	-	-	ne	2,78	-	-
	40 % MeOH + 60 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				40 % ACN + 60 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v			
Propranolol	ne	2,83	-	-	ne	2,61	-	-
Metadon	ne	2,69	-	-	ne	2,63	-	-

4.5.2. Kyselé analyty

Ze skupiny kyselin byly vybrány ketoprofen, fenoprofen a ibuprofen. Ketoprofen byl hlavním analytem a fenoprofen s ibuprofenem sloužily k porovnání a potvrzení výsledků. První mobilní fáze byla zvolena, stejně jako v případě bazických látek, podle aplikačního listu výrobce chromatografické kolony (bromovaný β -cyklodextrin). Jednalo se o MF 1 ve složení methanol (MeOH) a 0,1M kyselina octová (AcA), která byla upravena přidávkem triethylaminu (TEA) na pH 5,6. Tabulka č. 13 shrnuje dosažené výsledky. K chirální separaci došlo u ketoprofenu při vyšší koncentraci organického rozpouštědla (70 % a 80 %). Ibuprofen ani fenoprofen nebyly za těchto podmínek eluovány. Výměna MeOH za ACN, který má vyšší eluční sílu, vedla k eluci těchto látek. V případě ketoprofenu došlo přibližně ke zkrácení retence na polovinu a rozlišení mezi enantiomery se snížilo přibližně o 20 %.

Tabulka č. 13: Dosažené výsledky pro kyselé látky – MF 1

Vzorek	Chirální separace	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Rozlišení
70 % MeOH + 30 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				
Ketoprofen	ano	14,11	15,03	1,26
Fenoprofen	neeluováno	doba analýzy: 30 minut		
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 30 minut		
70 % ACN + 30 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				
Ketoprofen	ano	7,48	7,76	1,02
80 % MeOH + 20 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				
Ketoprofen	ano	14,81	15,54	1,22
Fenoprofen	neeluováno	doba analýzy: 60 minut		
80 % ACN + 20 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				
Ketoprofen	ano	7,77	8,03	0,66
Fenoprofen	ano	8,88	10,10	1,95
Ibuprofen	ano	29,04	35,32	3,45

Ketoprofen je při pH 5,6 z 95,91 % v ionizované formě a tvoří iontový pár s triethylamoniovým kationtem. Předpokládáme, že tím dochází k zeslabení achirální interakce s kladným nábojem na povrchu silikagelu a analyt může interagovat s β -cyklodextrinem. Jedno z možných vysvětlení silnější retence fenoprofenu a ibuprofenu je jejich vyšší hodnota log P. Hodnota log P ketoprofenu je 3,31, fenoprofenu 3,64 a ibuprofenu 3,75. Hodnoty log P byly vypočítány pomocí programu ChemDraw 18.0. [11]

V Tabulce č. 14 jsou uvedeny výsledky pro MF 2 = organické rozpouštědlo + voda. Ketoprofen nebyl eluován při použití MeOH. Až záměna za ACN vedla k eluci a chirální separaci ketoprofenu. Retenční časy byly v porovnání s MF obsahující triethylaminoacetát

přibližně trojnásobné. Fenoprofen a ibuprofen nebyly eluovány. Látky mají v těchto chromatografických podmínkách záporný náboj a dochází k silným iontovým interakcím se stacionární fází. Tato MF neobsahuje iontově-párové činidlo, které by ovlivnilo tyto achirální interakce. Proto dochází k jejich silné zadrželi na koloně.

Tabulka č. 14: Dosažené výsledky pro kyselé látky – MF 2

Vzorek	Chirální separace	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Rozlišení
70 % MeOH + 30 % H ₂ O v/v				
Ketoprofen	neeluováno	doba analýzy: 78 minut		
70 % ACN + 30 % H ₂ O v/v				
Ketoprofen	ano	23,90	28,95	1,43
80 % MeOH + 20 % H ₂ O v/v				
Ketoprofen	neeluováno	doba analýzy: 22 minut		
80 % ACN + 20 % H ₂ O v/v				
Ketoprofen	ano	21,70	26,56	1,22
Fenoprofen	neeluováno	doba analýzy: 22 minut		
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 60 minut		

Předpokládáme, že maskováním povrchu silikagelu EDTA dochází k ovlivnění achirálních a chirálních interakcí. MF 3 s přidavkem 1,25mM EDTA (Tabulka č. 15) chelatuje kovové nečistoty na povrchu silikagelu. Při použití MeOH byla zaznamenána chirální separace pouze u ketoprofenu a s rostoucí koncentrací organického rozpouštědla klesala retence. Záměnou MeOH za ACN byla pozorována chirální separace u fenoprofenu, ale ibuprofen nebyl eluován.

Tabulka č. 15: Dosažené výsledky pro kyselé látky – MF 3

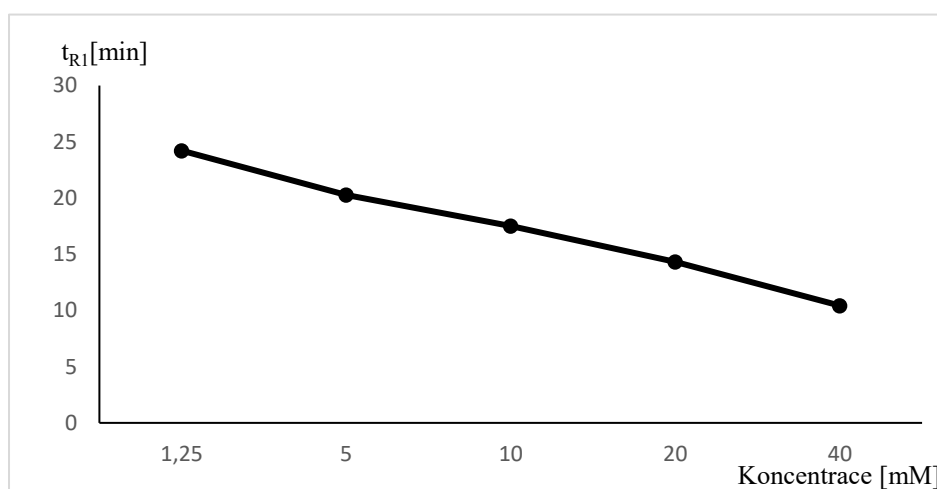
Vzorek	Chirální separace	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Rozlišení
0,625 ml 200 mM EDTA + 59,375 ml H ₂ O + 40 ml ACN				
Ketoprofen	ano	30,19	39,85	1,95
0,625 ml 200 mM EDTA + 29,375 ml H ₂ O + 70 ml MeOH				
Ketoprofen	ano	18,16	22,70	1,85
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 45 minut		
0,625 ml 200 mM EDTA + 29,375 ml H ₂ O + 70 ml ACN				
-	-	-	-	-
0,625 ml 200 mM EDTA + 19,375 ml H ₂ O + 80 ml MeOH				
Ketoprofen	ano	11,52	13,66	1,66
Fenoprofen	ano	32,21	47,54	1,68
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 50 minut		
0,625 ml 200 mM EDTA + 19,375 ml H ₂ O + 80 ml ACN				
Ketoprofen	ano	6,81	7,90	1,73
Fenoprofen	ano	9,25	12,76	1,51
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 70 minut		

Byl zkoumán vliv rostoucí molarity EDTA na chirální separaci ketoprofenu. Stejně jako u měření propranololu byly připraveny MF s koncentrací EDTA 1,25 mM,

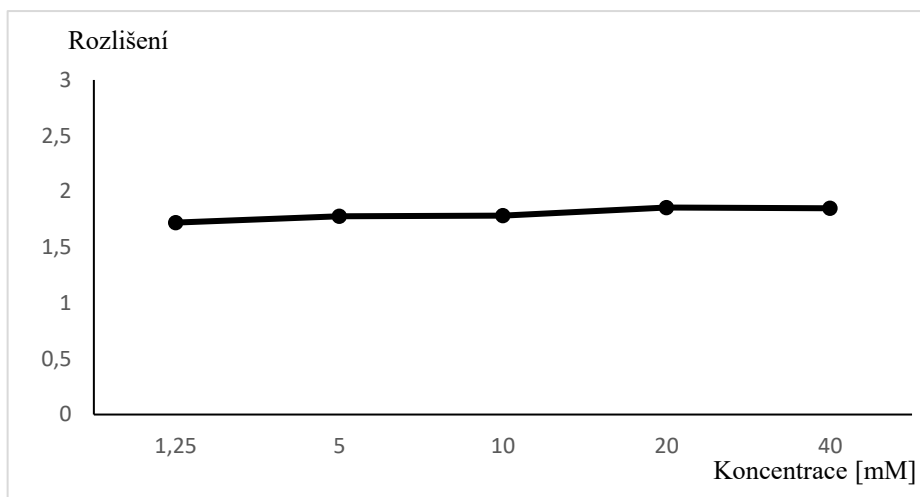
5 mM, 10 mM, 20 mM a 40 mM (Tabulka č. 16). Organickým rozpouštědlem byl ACN (40 %). Chirální separace byla detekována u všech koncentrací na základní linii, ale na rozdíl od propranololu s rostoucí molaritou klesala retence (Graf č. 4). V Grafu č. 5 je zobrazen vliv molarity na rozlišení, které s rostoucí molaritou zůstávalo stejné. Tyto výsledky potvrzují přítomnost achirální interakce, podobně jako tomu bylo u bazických látek s tím rozdílem, že v případě kyselin je interakce přitažlivá. Na rozdíl od propranololu dochází s rostoucí koncentrací EDTA k markantnímu zužování píků (Graf č. 6). Nicméně rozlišení zůstává v podstatě neovlivněno, což lze vysvětlit současným zkracováním retenčních časů. Zvyšováním koncentrace EDTA dochází k postupnému nasycení povrchu silikagelu, a proto pozorujeme snižování retence ketoprofenu. Stejně jako u propranololu dochází k zeslabení elektrostatických interakcí s nečistotami kovů, ale na rozdíl od bazických látek se je nepodařilo eliminovat úplně.

Tabulka č. 16: Vliv koncentrace EDTA na enantioseparaci ketoprofenu

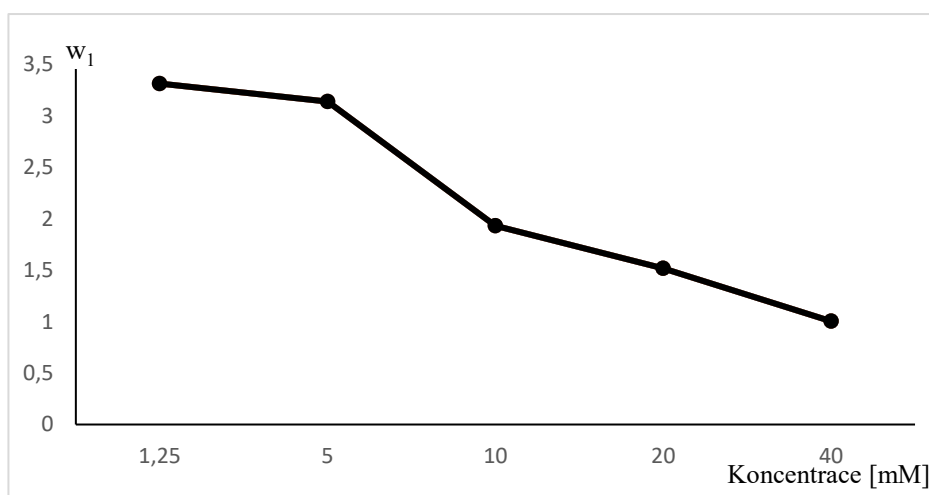
Koncentrace (mM)	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	Rozlišení	w_1	w_2
1,25	24,21	21,75	1,72	3,32	5,62
5	20,28	26,44	1,78	3,14	4,77
10	17,51	22,45	1,78	1,93	2,18
20	14,32	18,15	1,86	1,52	2,64
40	10,43	12,85	1,85	1,00	1,62



Graf č. 4: Závislost retenčního času na koncentraci EDTA u analýzy ketoprofenu



Graf č. 5: Závislost rozlišení na koncentraci EDTA u analýzy ketoprofenu



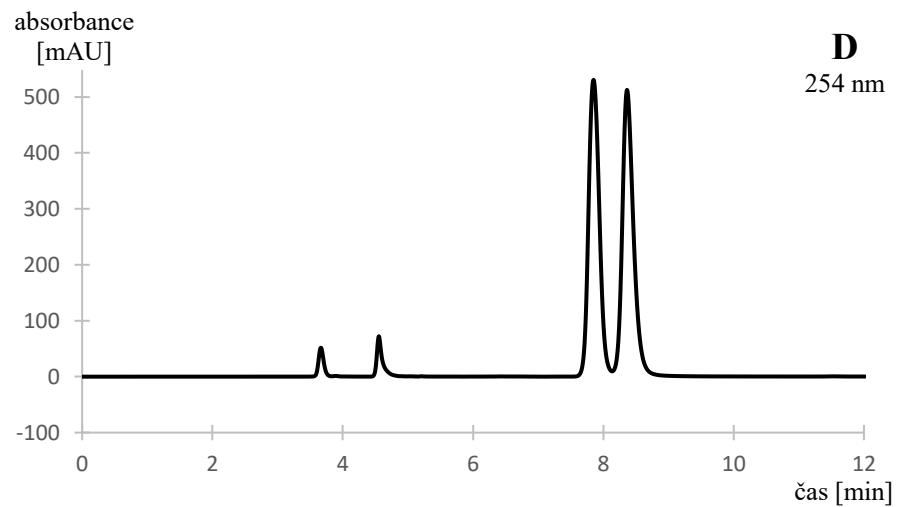
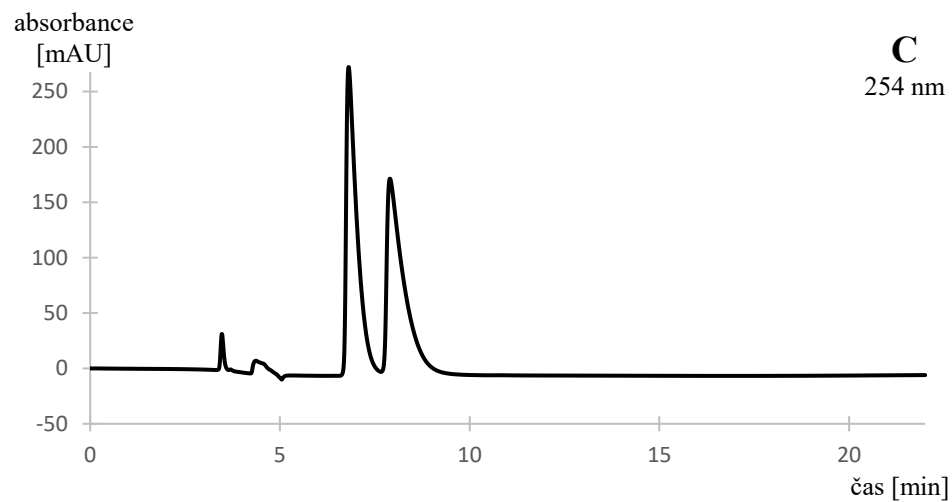
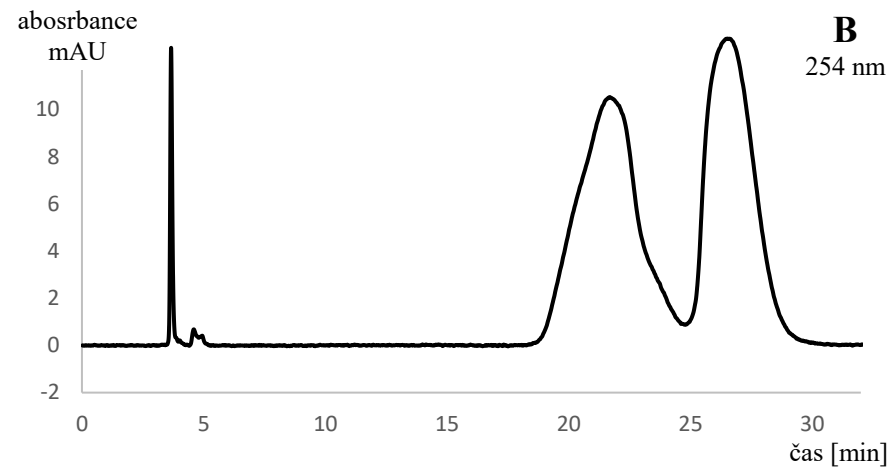
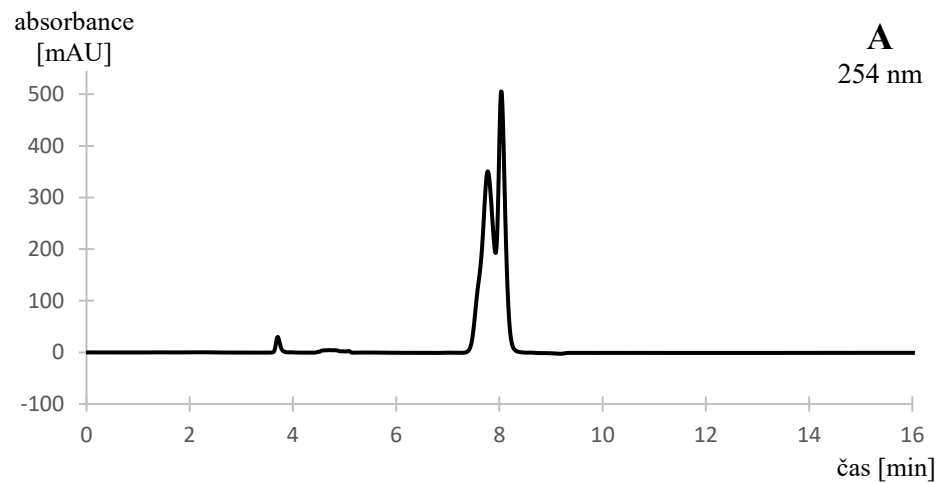
Graf č. 6: Závislost šířky píku na koncentraci EDTA u analýzy ketoprofenu

Poslední zkoumanou MF byla kombinace MeOH a 0,1M AcA upravené hydroxidem sodným (NaOH) při pH 3,2 (MF 4). V této mobilní fázi došlo k chirální separaci ketoprofenu a fenoprofenu. Ibuprofen nebyl eluován. Použití ACN vedlo k chirální separaci v kratším čase a došlo k eluci i chirální separaci ibuprofenu. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 17. Kyselina octová je při pH 3,2 z 97,32 % v nedisociované formě a nechelatuje ionty kovů na povrchu silikagelu. Za těchto chromatografických podmínek je ketoprofen z 89,59 % také v nedisociované formě, a proto předpokládáme, že dochází především k jeho interakci s β -cyklodextrinem, což vedlo k chirální separaci.

Tabulka č. 17: Dosažené výsledky pro kyselá látky – MF 4

Vzorek	Chirální separace	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Rozlišení
70 % MeOH + 30 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				
Ketoprofen	ano	15,90	18,06	2,57
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 44 minut		
70 % ACN + 30 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				
Ketoprofen	ano	6,89	7,35	1,62
80 % MeOH + 20 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				
Ketoprofen	ano	16,55	18,33	1,58
Fenoprofen	ano	32,13	43,63	2,08
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 42 minut		
80 % ACN + 20 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				
Ketoprofen	ano	7,81	8,33	1,65
Fenoprofen	ano	7,90	9,75	2,14
Ibuprofen	ano	20,78	26,27	3,43

V Tabulce č. 18 je souhrn výsledků pro kyseliny. Na Obrázku č. 18 jsou uvedeny chromatogramy ketorprofenu pro jednotlivé chromatografické podmínky.



Obrázek č. 18: Chromatogramy ketoprofenu – 80 % ACN; **A** + 0,1M AcA upravena TEA (pH 5,6) **B** + H₂O, **C** + 1,25mM EDTA, **D** + 0,1M AcA upravena NaOH (pH 3,2)

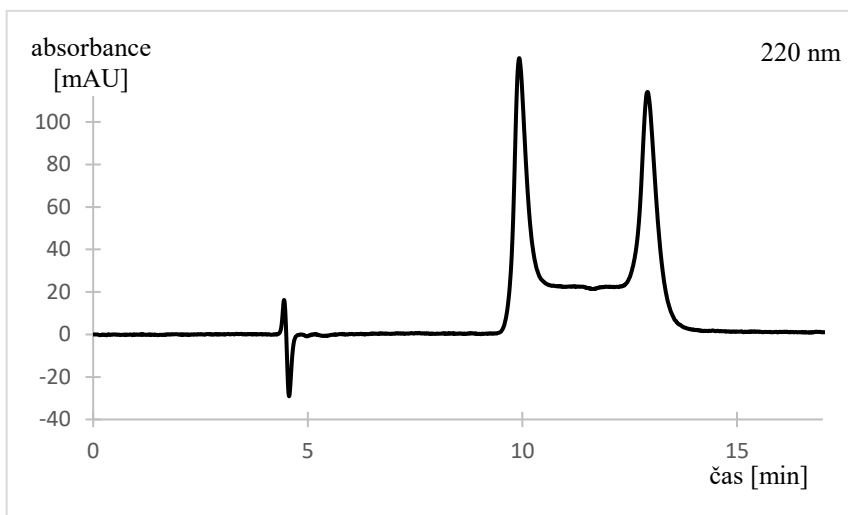
Tabulka č. 18: Souhrn výsledků chromatografických podmínek: ketoprofen, fenoprofen, ibuprofen

Vzorek	Chirální separace	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Rozlišení	Chirální separace	t _{R1} (min)	t _{R2} (min)	Rozlišení
	70 % MeOH + 30 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				70 % ACN + 30 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v			
Ketoprofen	ano	14,11	15,03	1,26	ano	7,48	7,76	1,02
Fenoprofen	neeluováno	doba analýzy: 30 minut			-	-	-	-
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 30 minut			-	-	-	-
	80 % MeOH + 20 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				80 % ACN + 20 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v			
Ketoprofen	ano	14,81	15,54	1,22	ano	7,77	8,03	0,66
Fenoprofen	neeluováno	doba analýzy: 60 minut			ano	8,88	10,10	1,95
Ibuprofen	-	-	-	-	ano	29,04	35,32	3,45
	70 % MeOH + 30 % H ₂ O v/v				70 % ACN + 30 % H ₂ O v/v			
Ketoprofen	neeluováno	doba analýzy: 78 minut			ano	23,90	28,95	1,43
Fenoprofen	-	-	-	-	-	-	-	-
Ibuprofen	-	-	-	-	-	-	-	-
	80 % MeOH + 80 % H ₂ O v/v				80 % ACN + 20 % H ₂ O v/v			
Ketoprofen	neeluováno	doba analýzy: 22 minut			ano	21,70	26,56	1,22
Fenoprofen	-	-	-	-	neeluováno	doba analýzy: 22 minut		
Ibuprofen	-	-	-	-	neeluováno	doba analýzy: 60 minut		
	0,625 ml 200 mM EDTA + 29,375 ml H ₂ O + 70 ml MeOH				0,625 ml 200 mM EDTA + 29,375 ml H ₂ O + 70 ml ACN			
Ketoprofen	ano	18,16	22,70	1,85	-	-	-	-
Fenoprofen	-	-	-	-	-	-	-	-
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 45 minut			-	-	-	-
	0,625 ml 200 mM EDTA + 19,375 ml H ₂ O + 80 ml MeOH				0,625 ml 200 mM EDTA + 19,375 ml H ₂ O + 80 ml ACN			
Ketoprofen	ano	11,52	13,66	1,66	ano	6,81	7,90	1,73
Fenoprofen	ano	32,21	47,54	1,68	ano	9,25	12,76	1,51
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 50 minut			neeluováno	doba analýzy: 70 minut		
	70 % MeOH + 30 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				70 % ACN + 30 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v			
Ketoprofen	ano	15,90	18,06	2,57	ano	6,89	7,35	1,62
Fenoprofen	-	-	-	-	-	-	-	-
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 44 minut			-	-	-	-
	80 % MeOH + 20 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				80 % ACN + 20 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v			
Ketoprofen	ano	16,55	18,33	1,58	ano	7,81	8,33	1,65
Fenoprofen	ano	32,13	43,63	2,08	ano	7,90	9,75	2,14
Ibuprofen	neeluováno	doba analýzy: 42 minut			ano	20,78	26,27	3,43

4.5.3. Neutrální látky

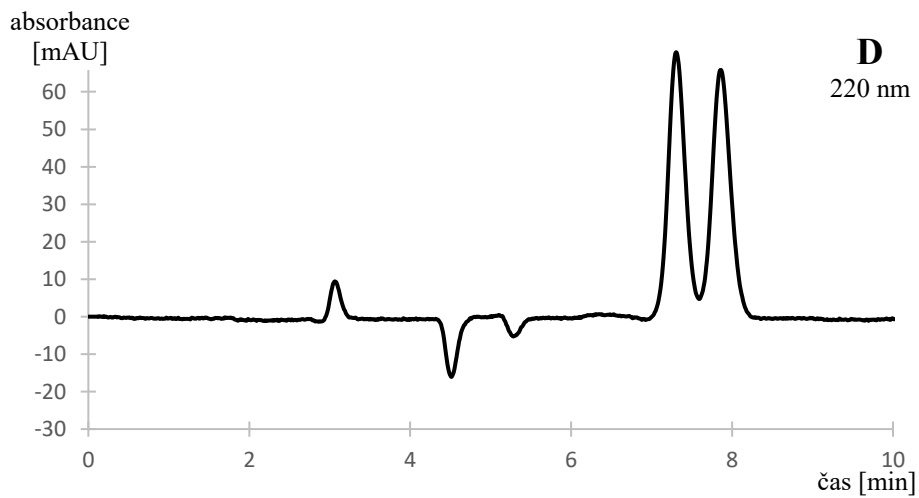
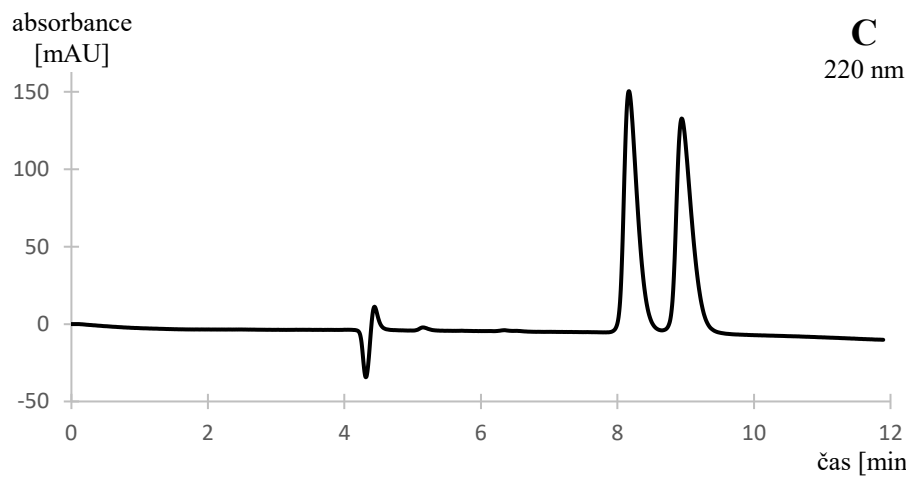
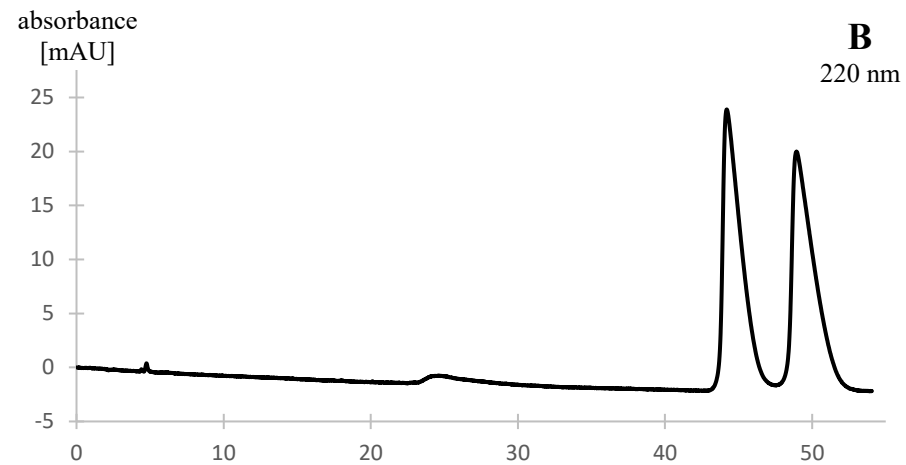
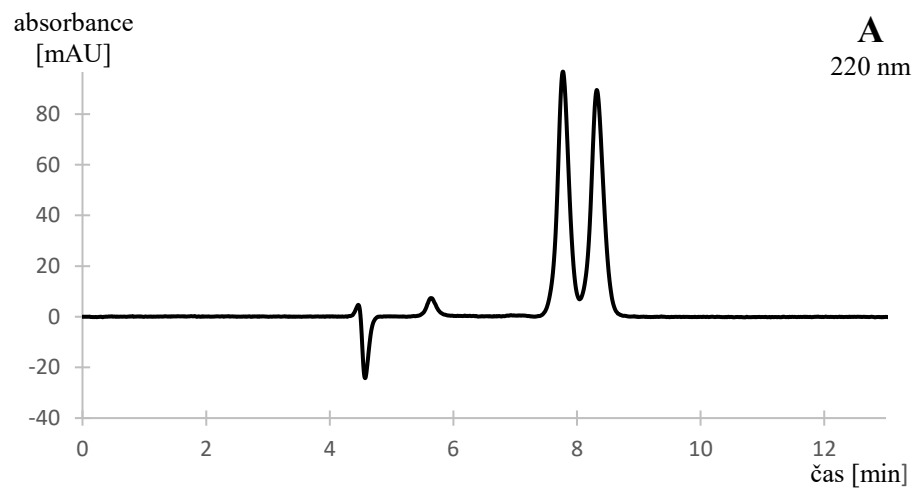
Pro kontrolu a potvrzení naší teorie jsme zvolili analyty hexobarbital a oxazepam. Ve všech výše zmíněných chromatografických podmínkách došlo k chirální separaci. Záměna methanolu (MeOH) za acetonitril (ACN) vedla ke snížení retence a rozlišení. Tabulka č. 19 shrnuje výsledky pro všechny čtyři MF. Za uvedených chromatografických podmínek jsou hexobarbital ($pK_a = 7,99$) a oxazepam ($pK_a = 11,65$) z 99,99 % v nedisociované formě. Předpokládali jsme, že nedochází k elektrostatickým achirálním interakcím s nečistotami kovu na povrchu silikagelu. Nicméně v MF 2 došlo u obou látek k prodloužení retenčních časů jak u hexobarbitalu i oxazepamu v methanolicke mobilní fázi. U hexobarbitalu je prodloužení retence výraznější. Vysvětlení tohoto jevu může být na základě částečné ionizace látek a iontové interakce s povrchem silikagelu, popřípadě se na retenci může podílet tvorba komplexu analytu s kovem nebo nespecifická adsorpce na povrch silikagelu. Na Obrázku č. 20 jsou uvedeny chromatogramy hexobarbitalu pro uvedené čtyři MF.

V případě oxazepamu byl pozorován tzv. batman pík (Obrázek č. 19), což značí, že za daných chromatografických podmínek dochází k racemizaci během analýzy. Snížením teploty by došlo ke snížení základní linie. [53]



Obrázek č. 19: Chromatogram oxazepamu – MF 20 % MeOH + 80 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v

Při testování všech čtyřech základních typů MF nebyly pozorovány chirální separace u warfarinu a guaifenezinu.



Obrázek č. 20: Chromatogramy hexobarbitalu – 40 % MeOH; **A** + 0,1M AcA upravena TEA (pH 5,6) **B** + H₂O, **C** + 1,25mM EDTA, **D** + 0,1M AcA upravena NaOH (pH 3,2)

Tabulka č. 19: Souhrn výsledků chromatografických podmínek: hexobarbital, oxazepam

Vzorek	Chirální separace	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rozlišení	Chirální separace	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rozlišení
	20 % MeOH + 80 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				20 % ACN + 80 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v			
Hexobarbital	ano	25,57	30,04	2,96	ano	7,43	7,91	1,58
Oxazepam	ano	9,94	12,93	4,62	ano	6,19	6,74	1,21
	40 % MeOH + 60 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				40 % ACN + 60 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v			
Hexobarbital	ano	7,77	8,32	1,47	ne	4,78	-	-
Oxazepam	ano	6,09	6,63	1,35	ne	4,49	-	-
	70 % MeOH + 30 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v				80 % ACN + 20 % 0,1M AcA (pH 5,6 – upraveno TEA) v/v			
Hexobarbital	ne	5,11	-	-	-	-	-	-
Oxazepam	-	-	-	-	ne	4,21	-	-
	20 % MeOH + 80 % H ₂ O v/v				20 % ACN + 80 % H ₂ O v/v			
Hexobarbital	ano	44,19	48,92	1,77	ano	10,18	10,80	1,61
Oxazepam	ano	12,19	16,82	5,10	ano	6,42	7,09	1,71
	40 % MeOH + 60 % H ₂ O v/v				40 % ACN + 60 % H ₂ O v/v			
Hexobarbital	ne	11,63	-	-	ne	5,52	-	-
Oxazepam	ano	6,76	7,62	1,89	ne	4,56	-	-
	0,625 ml 200 mM EDTA + 79,375 ml H ₂ O + 20 ml MeOH				0,625 ml 200 mM EDTA + 79,375 ml H ₂ O + 20 ml ACN			
Hexobarbital	ano	20,44	23,54	2,54	ano	7,87	8,52	2,05
Oxazepam	ano	10,48	13,72	3,97	ano	9,32	9,93	1,49
	0,625 ml 200 mM EDTA + 59,375 ml H ₂ O + 40 ml MeOH				0,625 ml 200 mM EDTA + 59,375 ml H ₂ O + 40 ml ACN			
Hexobarbital	ano	8,16	8,94	1,92	ne	4,48	-	-
Oxazepam	ano	5,95	6,50	1,19	ne	4,41	-	-
	20 % MeOH + 80 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				20 % ACN + 80 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v			
Hexobarbital	ano	19,01	22,21	2,79	ano	6,81	7,25	1,13
Oxazepam	ano	9,42	11,97	3,381	ano	5,73	6,09	0,72
	40 % MeOH + 60 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v				40 % ACN + 60 % 0,1M AcA (pH 3,2 – upraveno 1M NaOH) v/v			
Hexobarbital	ano	7,30	7,85	1,32	ne	4,48	-	-
Oxazepam	ano	5,95	6,42	0,93	ne	4,36	-	-

5. Závěr

Předpokládali jsme, že interakce s kovovými nečistotami na povrchu silikagelu ovlivňují retenční chování studovaných látek. Tuto tezi jsme potvrdili použitím čtyřech mobilních fází (MF).

Bazické analyty se v kyselé MF a ve vodné MF eluovaly blízko mrtvého času. Docházelo k repulzi mezi kladnými náboji a nemohlo tedy dojít k chirální separaci. Pokud došlo k zamezení této interakce (vytvoření iontového páru nebo odstínění kovových nečistot pomocí EDTA), byla opět umožněna dostatečná interakce s chirální stacionární fází a byla zaznamenána chirální separace. U kyselin docházelo ve vodné MF k silné retenci a šířka píků byla podstatně širší než u zbylých třech použitých MF. V kyselé MF byly kyselé analyty v neionizovaném stavu a mohlo dojít k chirální separaci. Stejně jako u bazí, při ovlivnění sekundárních interakcí vytvořením iontového páru nebo maskováním povrchu silikagelu EDTA, byla zaznamenána chirální separace.

Poté byl zkoumán vliv rostoucí molarity EDTA na chirální separaci propranololu a ketoprofenu. Zaznamenali jsme chirální separaci propranololu i ketoprofenu u všech koncentrací. U propranololu při zvýšení koncentrace EDTA z 1,25 mM na 5 mM došlo ke zvýšení retence a rozlišení. Při zvýšení koncentrace na 5 mM byly píky užší. Při dalším zvyšování koncentrace nedošlo k výrazné změně a předpokládáme, že byly minimalizovány achirální interakce. Na rozdíl od propranololu retence ketoprofenu klesala s rostoucí molaritou EDTA, ale rozlišení zůstávalo neovlivněno. Dále s rostoucí molaritou docházelo k zužování píků. Na rozdíl od propranololu se nepodařilo úplně eliminovat elektrostatické interakce s povrchem silikagelu.

U neionizovaných látek došlo k chirální separaci ve všech čtyřech MF. Ve vodné MF byla zaznamenána neúměrně větší retence než u ostatních MF. Stejně tak píky byly širší. Předpokládáme, že za jev mohou být zodpovědné i nepatrné iontové interakce analytu s povrchem silikagelu, tvorba komplexů látek s kovem nebo jejich nespecifická vazba na povrch silikagelu.

Závěrem lze říci, že při vhodném ovlivnění achirálních interakcí se stacionární fází můžeme dosáhnout chirální separace a eliminovat příspěvek achirálních interakcí, které nepříznivě ovlivňují retenční čas a také tvar píků.

6. Seznam použitých zkratek

AGP	kyselý α 1-glykoprotein
AVI	avidin
BSA	bovinní sérový albumin
CBH	celobiohydrolasa
CE	kapilární elektroforéza
CFs	cyklofruktany
CGTasa	cyklodextrín-glykosyltransferáza
CSP	chirální stacionární fáze
CD	cyklodextrin
ECD	elektrochemický detektor
FD	fluorimetrický detektor
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GC	plynová chromatografie
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSA	lidský sérový albumin
LC	kapalinová chromatografie
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometr
NP mód	normální mód
OVM	ovomucoid
PO mód	polárně-organický mód
RID	refraktometrický detektor
RP mód	reverzní mód
SMB	simulated moving bed
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SW	software

TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV/VIS	spektrofotometrický detektor
α -CD	alfa-cyklodextrín
β -CD	beta-cyklodextrín
γ -CD	gama-cyklodextrín

7. Seznam použité literatury

- [1] KAZAKEVICH, Yuri a Rosario LOBRUTTO. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007. ISBN 978-0-471-68162-5.
- [2] GAL, Joseph. Molecular Chirality: Language, History, and Significance. *Differentiation of Enantiomers I*. Cham: Springer International Publishing, **2013**, 340, 1-20
- [3] KLIMEŠ, Jiří. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vydání. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
- [4] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Europrint, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [5] FEDERSEI, Hans-Jürgen. The impact of chirality on drug manufacturing on the industrial scale. *Endeavour*, **1994**, 18.4, 163-172.
- [6] NGUYEN, Lien Ai; HE, Hua; PHAM-HUY, Chuong. Chiral drugs: an overview. *Int. J. Biomed. Sci.: IJBS*, **2006**, 2.2, 85.
- [7] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley, 2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [8] ERNST, Karl-Heinz. Molecular chirality at surfaces. *Phys. status solidi (b)*. **2012**, 249.11, 2057-2088.
- [9] ALKADI, Hourieh; JBEILY, Rajwa. Role of Chirality in Drugs: An Overview. *Infect. Disord.: Drug Targets*, **2018**, 18.2, 88-95.
- [10] HUTT, Andrew J. Chirality and pharmacokinetics: an area of neglected dimensionality?. *Drug Metab. Drug Interact.*, **2007**, 22.2-3, 79-112.
- [11] ChemDraw 18.0, PerkinElmer Informatics, Inc.
- [12] CALDWELL, John a Irving W. WAINER. Stereochemistry: definitions and a note on nomenclature. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. **2001**, 16 (S2), S105-S107.
- [13] HUTT, A. J.; TAN, S. C. Drug chirality and its clinical significance. *Drugs*, **1996**, 52.5, 1-12.

- [14] SOMOGYI, Andrew, Felix BOCHNER a David FOSTER. Inside the isomers: the tale of chiral switches. *Australian Prescriber*. **2004**, 27.2, 47-49.
- [15] NERKAR, A. G., et al. Chiral switches: a review. *J Pharm Res*, **2011**, 4, 1300-1303.
- [16] MCCONATHY, Jonathan; OWENS, Michael J. Stereochemistry in drug action. *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry*, **2003**, 5.2, 70.
- [17] H BROOKS, W.; C GUIDA, W.; G DANIEL, K. The significance of chirality in drug design and development. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2011**, 11.7, 760-770.
- [18] CALCATERRA, Andrea; D'ACQUARICA, Ilaria. The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2018**, 147, 323-340.
- [19] AGRANAT, Israel; CANER, Hava; CALDWELL, John. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2002**, 1.10, 753.
- [20] HUTT, A. J.; VALENTOVA, J. The chiral switch: the development of single enantiomer drugs from racemates. *Acta Fac. Pharm. Univ. Comenianae*, **2003**, 50.7, 23.
- [21] MAIER, Norbert M.; FRANCO, Pilar; LINDNER, Wolfgang. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 906.1-2, 3-33.
- [22] JESCHKE, Peter. Current status of chirality in agrochemicals. *Pest Manage. Sci.*, **2018**, 74.11, 2389-2404.
- [23] SUBRAMANIAN, G. *Chiral separation techniques: a practical approach*. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2001. ISBN 35-272-9875-4.
- [24] LORENZ, Heike, et al. Crystallization of enantiomers. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **2006**, 45.10, 863-873.
- [25] XIE, Rui; CHU, Liang-Yin; DENG, Jin-Gen. Membranes and membrane processes for chiral resolution. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37.6, 1243-1263.
- [26] SCHUUR, Boelo, et al. Chiral separation by enantioselective liquid-liquid extraction. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9.1, 36-51.
- [27] GHANEM, Ashraf; ABOUL-ENEIN, Hassan Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15.21, 3331-3351.

- [28] SAZ, J. M.; MARINA, M. L. Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **2016**, *1467*, 79-94.
- [29] LI, Libo, et al. A comprehensive study of the enantioseparation of chiral drugs by cyclodextrin using capillary electrophoresis combined with theoretical approaches. *Talanta*, **2015**, *142*, 28-34.
- [30] SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, Laura, et al. Chiral analysis of aromatic amino acids in food supplements using subcritical fluid chromatography and Chirobiotic T2 column. *J. Supercrit. Fluids*, **2016**, *107*, 519-525.
- [31] MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-385013-3.
- [32] *Český lékopis 2017*. Praha: Grada, 2017
- [33] WESTON, Andrea a Phyllis R. BROWN. *HPLC and CE*. San Diego: Academic Press, 1997. ISBN 01-213-6640-5.
- [34] CZAPLICKI, Sylwester. Chromatography in bioactivity analysis of compounds. In: *Column chromatography*. IntechOpen, 2013.
- [35] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a Joseph L. GLAJCH. *Practical HPLC method development*. 2nd ed. New York: Wiley, 1997. ISBN 04-710-0703-X.
- [36] YASHIMA, Eiji. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *J. Chromatogr. A*, **2001**, *906*, 105-125.
- [37] SCRIBA, Gerhard K.E. Chiral recognition in separation science – an update. *J. Chromatogr. A*, **2016**, *1467*, 56-78.
- [38] LÄMMERHOFER, Michael. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, 814-856.
- [39] SCRIBA, Gerhard K. E. Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences: Mechanisms and modern chiral stationary phases. *Chromatographia*. **2012**, *75*, 815-838.
- [40] SUN, Ping, Chunlei WANG, Zachary S. BREITBACH, Ying ZHANG a Daniel W. ARMSTRONG. Development of New HPLC Chiral Stationary Phases Based on Native and Derivatized Cyclofructans. *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 10215-10226.

- [41] WARD, Timothy J a Alton B FARRIS III. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 906, 73-89.
- [42] HYUN, Myung Ho. Enantioseparations of Primary Amino Compounds by High-Performance Liquid Chromatography Using Chiral Crown Ether-Based Chiral Stationary Phase. *Chiral Separations*. Totowa, NJ: Humana Press, **2013**, 165-176. *Methods in Molecular Biology*.
- [43] ZHOU, Lili et al. Comparative study of immobilized α 1 acid glycoprotein and ovomucoid protein stationary phases for the enantiomeric separation of pharmaceutical compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, 46.5, 898-906.
- [44] LUBDA, D., et al. Monolithic silica columns with chemically bonded β -cyclodextrin as a stationary phase for enantiomer separations of chiral pharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 377.5, 892-901.
- [45] LAI, Xianghua; TANG, Weihua; NG, Siu-Choon. Novel cyclodextrin chiral stationary phases for high performance liquid chromatography enantioseparation: Effect of cyclodextrin type. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218.33, 5597-5601.
- [46] RAHIM, Nurul Yani; TAY, Kheng Soo; MOHAMAD, Sharifah. β -Cyclodextrin functionalized ionic liquid as chiral stationary phase of high performance liquid chromatography for enantioseparation of β -blockers. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, **2016**, 85.3-4, 303-315.
- [47] VARGA, Gábor, et al. Comparison of separation performances of novel β -cyclodextrin-based chiral stationary phases in high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 70, 71-76.
- [48] SINGH, Ramnik, et al. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes – a review. *J. Pharm. Sci. Technol.*, **2010**, 2.3, 171-183.
- [49] LI, Liang, et al. Preparation and evaluation of a novel N-benzyl-phenethylamino- β -cyclodextrin-bonded chiral stationary phase for HPLC. *Talanta*, **2017**, 174, 179-191.
- [50] BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 59.6, 609-617.
- [51] ABELYAN, V. A., et al. Characteristics of cyclodextrin production using cyclodextrin glucanotransferases from various groups of microorganisms. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **2002**, 38.6, 527-535.
- [52] WANG, Lili, et al. Chiral Separation of Racemic Naproxen by High-Performance Liquid Chromatography with β -CD/SiO₂ as the Chiral Stationary Phase. *J. AOAC Int.*, **2014**, 97.1, 121-127.

- [53] POLAVARAPU, Prasad L. (ed.). *Chiral Analysis: Advances in Spectroscopy, Chromatography and Emerging Methods*. Elsevier, 2018.