

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

CHIRÁLNÍ HPLC SEPARACE

MICHAELA HANČILOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Vladimír Kubíček CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu Ing. Vladimíru Kubíčkoví CSc. Za podporu a pomoc při praktické části a také za vedení bakalářské práce.

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

V Hradci Králové

11. 5. 2020

Michaela Hančilová

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1 HPLC	9
3.1.1 Chromatografické systémy	9
3.1.2 Instrumentace v HPLC	10
3.2 Chirální separace.....	11
3.2.1 Chiralita	11
3.2.2 Chirální chromatografie	13
3.2.3 Mechanismy chirální separace.....	13
3.3 Chirální stacionární kolony.....	13
3.3.1 Proteinové CSP	14
3.3.2 Polysacharidové CSP	15
3.3.3 Donor-akceptorové (Pirklovy) CSP	17
3.3.4 Cyklodextrinové CSP.....	18
3.3.5 Makrocyclická antibiotika CSP	20
3.3.6 Chirální ligandová výměna	22
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1 Přístroje, pomůcky, chemikálie	24
4.2 Příprava vzorku pro HPLC analýzu.....	25
4.3 Seznam separovaných racemátů	25
4.4 Výchozí nastavení chromatografických podmínek	27
5. Výsledky a diskuse.....	28
5.1 Hodnocení chirální separace.....	28
6. ZÁVĚR	38
7. POUŽITÉ ZKRATKY.....	39
8. POUŽITÁ LITERATURA.....	40

ABSTRAKT

V této práci byly hledány podmínky pro chromatografickou separaci enantiomerů několika látek, které byly připraveny na katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Cílem práce bylo ověřit enantiomerickou čistotu těchto látek a potvrdit tak stereoselektivitu použitých syntetických postupů.

Měření na koloně Chiralcel®OD-R 250x4,6 mm; 10 μm, probíhalo v reverzním módu. Výchozí složení mobilní fáze bylo nastaveno na 25% roztoku chloristanu sodného (1 mol/l) a 75% MeOH. Výchozí složení mobilní fáze bylo vyhovující pro většinu látek. U několika látek však bylo potřeba zvýšit polaritu mobilní fáze ke zlepšení retence látek.

Získané chromatogramy jednotlivých enantiomerů prokazují enantiomerickou čistotu analyzovaných látek, jelikož se na těchto chromatogramech nenacházejí píky jejich druhých enantiomerů. To znamená, že syntetické postupy katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy jsou stereoselektivní.

Klíčová slova: Chiralita, HPLC, enantiomer, rozlišení

ABSTRACT

Suitable conditions for a chromatographic separation of several substances-enantiomers, prepared on the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy, Charles University in Hradec Králové, were sought. The aim of this thesis was to verify the enantiomeric purity of the substances and this way to confirm stereoselectivity of the synthetic procedures used.

The measurement on a Chiralcel®OD-R 250x4.6 mm column; 10 µm, was performed in reverse mode. The initial composition of the mobile phase was 25% of sodium perchlorate solution (1 mol / L) and 75% of MeOH. The initial composition of the mobile phase was satisfactory for most substances. However, for several ones it was necessary to increase the polarity of the mobile phase in order, to improve the retention of substances.

From the obtained chromatograms of individual enantiomers, we can prove the enantiomeric purity of the analyzed substances, because there are no peaks of the other enantiomers on these chromatograms. This means that the synthetic procedures used by the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis are stereoselective.

Key words: chirality, HPLC, enantiomer, resolution

1. ÚVOD

Jelikož se dnes ve všech oblastech lidského zkoumání setkáváme se stále větším množstvím bioorganických molekul a léčiv, které jsou chirální, jsou chirální separace velmi důležitou a nedílnou součástí HPLC analýz. Ve farmaceutickém průmyslu je kladen velký důraz na syntézu enantiomericky čistých léčiv. Proto se neustále vymýšlí nové, lepší stereoselektivní separační postupy.

Pro chirální separace je nejpoužívanější přímá separace, za použití chirálních stacionárních kolon. Existuje hned několik druhů těchto kolon, a to proteinové, polysacharidové, Pirklovy, cyklodextrinové, makrocyclická antibiotika, crown-ethery, cyklofruktany, iontově výměnné a chirální ligandová výměna. Tyto kolony jsou kompatibilní s různými separačními systémy s normálním, reverzním i polárně organickým módem.

V této bakalářské práci bych se ráda zaměřila na HPLC metodu, chiralitu a na podrobnější popis několika vybraných kolon. V experimentální části se budu soustředit na nalezení optimálních podmínek látek pro separaci a na ověření, zdali jsou látky připravené na katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, enantiomericky čisté.

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce s názvem Chirální HPLC separace je seznámit čtenáře stručně s HPLC metodou, chiralitou a chirálními separacemi, zejména s chirálními stacionárními kolonami. Pro podrobnější popis těchto kolon jsem si zvolila proteinové, polysacharidové, Pirklovy, cyklodextrinové, makrocyclická antibiotika a chirální ligandovou výměnu.

V experimentální části jsem používala kolonu Chiralcel®OD-R 250x4,6 mm; 10 µm. Na této koloně jsem měla separovat enantiomery, které byly připraveny na katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Hlavním účelem této separace bylo prokázat enantiomericou čistotu připravených látek, a tedy stereoselektivitu použitých syntetických postupů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 HPLC

Chromatografické metody řadíme mezi metody separační, jejich principem je rozdílná distribuce dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze, mezi fází mobilní neboli pohyblivou a fází stacionární neboli nepohyblivou. V případě kapalinové chromatografie je mobilní fází právě kapalina. Stacionární fází může být látka tuhá nebo kapalná, která je umístěna na tuhém nosiči. (Nováková et al., 2013)

3.1.1 Chromatografické systémy

V chromatografii se využívá několik separačních systémů: systém s normálními fázemi, s reverzními fázemi, iontově výměnná chromatografie, chirální separace, gelová chromatografie a hydrofobně interakční chromatografie. (Wellings, 2006)

3.1.1.1 Chromatografický systém s normálními fázemi

Chromatografický systém s normálními fázemi je klasický separační mód založen na distribuci analytu mezi polární stacionární fází a nepolární mobilní fází. Tyto stacionární fáze mohou být tvořeny nemodifikovaným silikagelem nebo oxidem hlinitým. (Dong, 2006) To, jak se budou látky eluovat, je ovlivněno polaritou analytu a množstvím polárního rozpouštědla v mobilní fází. Čím bude látka polárnější a množství polárního rozpouštědla v mobilní fází menší, tím se bude retence látek na koloně zvyšovat. Mobilní fáze se tedy vybírá podle eluotropické řady rozpouštědel. Nejčastěji jsou voleny binární směsi s odlišnou polaritou. Využití separace v systému s normálními fázemi v současné době však ustupuje. (Nováková et al., 2013)

3.1.1.2 Chromatografický systém s reverzními fázemi

Separace v systému s reverzními fázemi je založena na distribuci analytu mezi polární mobilní fází a nepolární stacionární fází, která je tvořena modifikovanými silikagely (nejčastěji silikagely, na které jsou navázány např. C18). V tomto systému budou jako první eluovány analyty polární, a naopak nepolární analyty budou

zadržovány na koloně. Eluční pořadí je tedy odlišné, než jak tomu bylo u normálních fází. Jako mobilní fáze se nejčastěji využívá směs methanolu nebo acetonitrilu s vodou nebo vhodným puforem. Systém s reverzními fázemi je nejvíce používaný mód pro HPLC, využívá se pro víc jak 70 % HPLC analýz. (Dong, 2006)

3.1.1.3 Polárně organický mód

Polárně organický mód je systém, ve kterém mobilní fázi tvoří směs organických rozpouštědel jako je acetonitril nebo methanol s organickými kyselinami nebo bázemi. Organickými kyselinami, které se zde využívají, mohou být kyselina octová, mravenčí nebo trifluoroctová a jako báze se využívá trimethylamin, diethylamin a ethylendiamin. Výhodou u polárně organického módu je snadné spojení s MS detekcí a nevýhodou je omezené ovlivnění ionizace polárních látek. (Nováková et al., 2013)

3.1.2 Instrumentace v HPLC

HPLC přístroj se skládá z několika částí ze zásobníku mobilní fáze, odplyňovače, směšovače, vysokotlakého čerpadla, dávkovače vzorku, chromatografické kolony, detektoru s průtokovou celou a celý systém je řízen počítačem. (Nováková et al., 2013)

Zásobník mobilní fáze slouží k uchování a transportu mobilní fáze. Nejčastěji je tvořen průhlednými, skleněnými nádobami. Obsahuje také speciální filtry, které odstraňují částice nečistot. (Arora et al., 2014)

Odplynění mobilní fáze se provádí, aby při změně tlaku na výstupu z kolony nebo i v koloně nedocházelo k uvolňování bublinek rozpuštěných plynů. (Nováková et al., 2013)

Vysokotlaká čerpadla zajišťují konstantní průtok mobilní fáze kolonou. (Arora et al., 2014)

Dávkovač vzorku dávkuje vzorek na kolonu pod vysokým tlakem. Dnes se využívá autosampler, který automaticky nastříkne požadované množství vzorku z vialky na kolonu. (Dong, 2006)

Chromatografické kolony jsou kovové trubice vyplněné stacionární fází. Jejich vnitřní průměr bývá 2,1-5 mm a délka 10 až 300 mm. Velikost částic, kterými jsou

kolony vyplněny, je cca 2-5 μm . Kolony se nachází v termostatovaném prostoru. (Nováková et al., 2013)

Detekční systémy měří koncentraci eluovaných analytů tak, že monitorují některou z jejich vlastností, jako je třeba absorbance nebo fluorescence. Detektor může být universální nebo specifický. Nejčastěji se používá UV-VIS detektor, často ve spojení s diodovým polem, nebo hmotnostní spektrometr. Existuje velké množství dalších detektorů, například fluorescenční, CAD, ELSD, atd. (Dong, 2006)

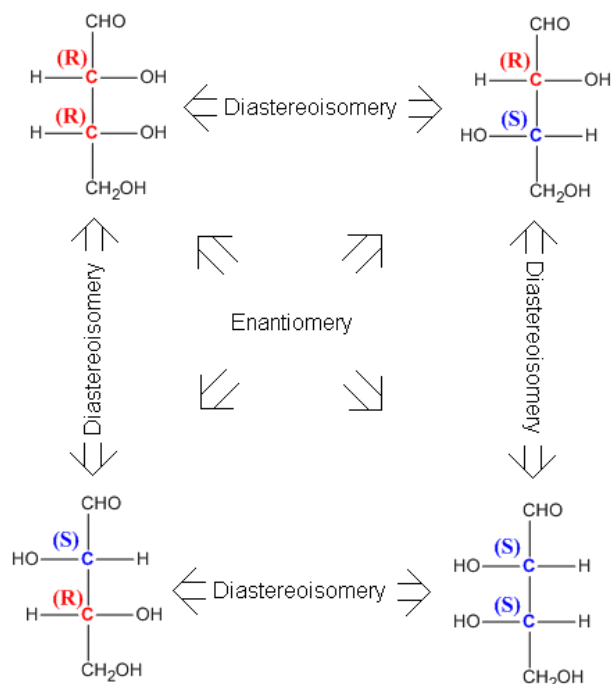
Moderní HPLC systémy jsou ovládány počítači, které mohou korigovat parametry, jako je složení mobilní fáze, teplota, průtok a množství vzorku, které je nastříknuto na kolonu, a provádět sběr a vyhodnocování chromatografických dat. (Arora et al., 2014)

3.2 Chirální separace

3.2.1 Chiralita

Chirální molekula je definována jako molekula, u které se nepřekrývají její zrcadlové obrazy. Tato molekula může mít jedno nebo více chirálních center, což jsou typicky uhlíky (chirální může být dusík, síra a fosfor). Tyto stereogenní atomy uhlíku na sobě mají navázané čtyři různé substituenty. (Snyder et al., 1997)

Stereoisomery jsou molekuly, které mají atomy navázané ve stejné konstituci, ale mají jiné uspořádání atomů v prostoru. Můžeme je rozdělit do dvou skupin na enantiomery a diastereomery. (Solomons et al., 2011)



Obr. 1: Zobrazení různých stereoisomerů

Zdroj: Nováková, Douša (2013), převzato

Dva zrcadlové obrazy jedné chirální molekuly se nazývají enantiomery (Obr.1). Enantiomery mají stejné fyzikální a chemické vlastnosti a stáčí rovinu polarizovaného světla. Když jeden z enantiomerů stáčí rovinu polarizovaného světla ve směru hodinových ručiček, je označován jako (+) a když ji stáčí proti směru hodinových ručiček, je označován jako (-). (Nováková et al., 2013) Tradičně je (+) isomerům přiřazována dextro (d) konfigurace a (-) isomerům levo (l) konfigurace. Toto však neplatí ve všech případech a je nutné takto označovat jen sloučeniny, u nichž byla skutečná rotace experimentálně změřena. (Beesley et al., 1998)

Diastereomery jsou stereoisomery, jejichž molekuly nejsou svými zrcadlovými obrazy (Obr.1). Obsahují více než jedno chirální centrum. Diastereomery mají různé chemické vlastnosti, a proto je možné, je separovat konvenčními separačními technikami. (Solomons et al., 2011) Mezi enantioseparační techniky můžeme zařadit krystalizaci, chromatografii, kapilární elektroforézu a biosensory. (Beesley et al., 1998)

3.2.2 Chirální chromatografie

V chirální separaci rozlišujeme separaci přímou a nepřímou. Nepřímá separace je založena na reakci mezi párem enantiomerů a enantiometricky čistým chirálním derivatizačním činidlem. Touto reakcí vznikají diastereomery. Ty je možné odseparovat pomocí klasického achirálního HPLC systému za použití normální nebo reverzní fáze. Chirální derivatizace je dnes zcela vytlačována jinými technikami. (Snyder et al., 1997) Hlavními nevýhodami je to, že nesmí dojít k racemizaci, experimentální náročnost a čistota chirálního derivatizačního činidla (> 99 %). Naopak výhodami mohou být možnost použití konvenčních chromatografických kolon, dobrá selektivita diastereomerů a snadná změna elučního pořadí enantiomerů. (Nováková et al., 2013)

U přímé separace se chirální selektor přidává do mobilní fáze nebo je navázán na stacionární fázi. Dochází ke vzniku dočasných diastereomerních komplexů, afinita těchto látek k selektoru udává jejich dobu eluce a tím i rozdílnost retenčních časů. (Snyder et al., 1997) Výhodami může být snadné provedení na chirálních stacionárních fázích, snadná kvantifikace a izolace enantiomerů, rychlost provedení a také to, že zde není nutná derivatizace. Nevýhodou je vysoká cena chirálních kolon. (Nováková et al., 2013) Přidávání chirálních selektorů do mobilní fáze se prakticky nevyužívá kvůli nutnosti kontinuálního dodávání drahých chirálních aditiv mobilní fáze, detekčních potíží a velmi časté přítomnosti špatně tvarovaných píků. (Snyder et al., 1997)

3.2.3 Mechanismy chirální separace

Mechanismus chirální separace není zcela objasněn. Předpokládá se, že mezi analytem a chirální stacionární fází působí hned několik interakcí. Tyto interakce vytváří krátkodobé diastereomerní komplexy a jsou to například H-můstky, π - π interakce, dipól-dipól interakce a disperzní interakce. K separaci dvou enantiomerů je zapotřebí alespoň tříbodová interakce mezi analytem a CSP. (Nováková et al., 2013)

3.3 Chirální stacionární kolony

Rozlišujeme několik typů CSP. Pro kapalinovou chromatografii je však dělíme zpravidla do šesti skupin.

Tabulka č.1 Rozdělení chirálních stacionárních fází

Typ CSP	Interakce mezi analytem a CSP	Typ analytu	LC uspořádání
Proteinové	Hydrofobní a elektrostatické interakce	Ionizovatelná skupina (amin nebo kyselina); žádoucí přítomnost aromatického kruhu, polární a aromatické skupiny	Jen reverzní mód
Polysacharidové	Inkluzní komplexy, atraktivní interakce	Schopnost interakce prostřednictvím H-můstků, stericky objemná skupina blízko chirálního centra pomáhá	Reverzní i normální mód
Pirklovy	H-můstky, π - π interakce, dipól-dipól interakce	Schopnost interakce pomocí H-můstků a π elektronů, žádoucí je aromatická skupina	Většinou normální mód; reverzní většinou s menší rezolucí
Cyklodextriny	Inkluzní komplexy, H-můstky	Polární a aromatické skupiny	Reverzní, normální a polárně organický mód
Makrocyclická antibiotika	H-můstky, π - π interakce, dipól-dipól interakce, sterické efekty, hydrofobní	Schopnost interakce pomocí H-můstků a π elektronů, dipólové vazby, stericky objemná skupina v blízkosti chirálního centra pomáhá	Reverzní a normální mód
Chirální ligandově výměnné	Koordinační komplexy s kovy	α -Amino a α -hydroxy aminokyseliny	Reverzní mód

Zdroj: Snyder et al, 1997 (převzato)

3.3.1 Proteinové CSP

Proteinové CSP byly vyvinuty jako první a jsou tvořeny přírodními proteiny, které jsou navázané na matici tvořenou oxidem křemičitým. (Beesley et al., 1998) Příkladem přírodních proteinů mohou být hovězí a lidský sérový albumin, α_1 kyselý glykoprotein, ovomukoid a pepsin. (Snyder et al., 1997) V těchto proteinech se vyskytuje velké množství chirálních center jedné konfigurace a je známa jejich silná interakce s malými analyty vykazujícími silnou chirální selektivitu. (Beesley et al., 1998) Různé proteiny

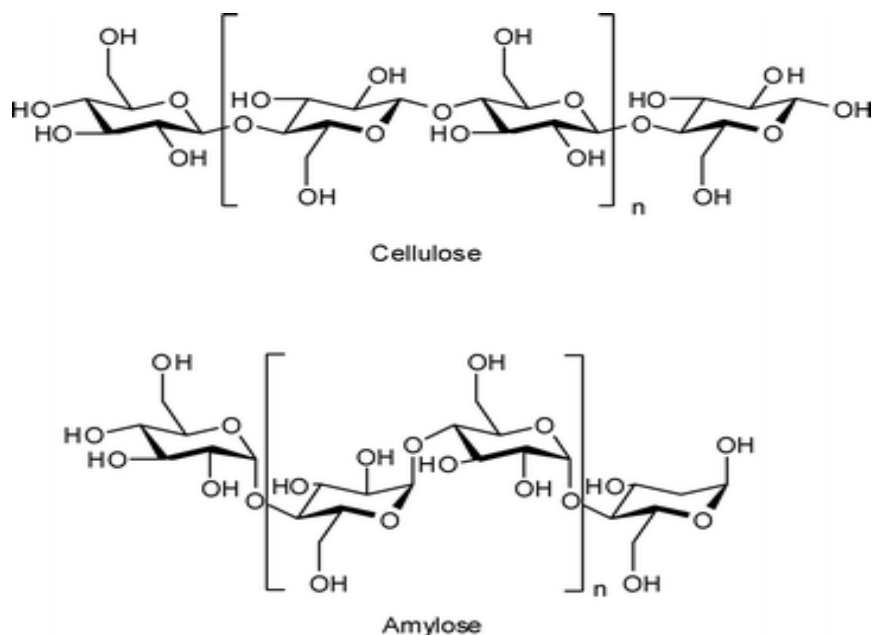
vykazují různou selektivitu pro široké spektrum látek odlišného složení. (Snyder et al., 1997)

Mechanismus interakce mezi proteiny a racemáty v komplexu není zcela objasněn. Proteiny vytváří trojdimenzionální strukturu. Hlavními interakcemi, které se zde uplatňují, jsou hydrofobní interakce, elektrostatické interakce a H-můstky. (Gübitz et al., 2004)

Výhodou těchto kolon je jejich kompatibilita s vodnými pufovanými mobilními fázemi. (Snyder et al., 1997) Nevýhodou je však jejich menší vazebná kapacita na rozdíl od ostatních CSP, proteiny používané v CSP mají významná omezení. Těmi může být jejich nízká účinnost a denaturace proteinů, kterou způsobuje vyšší nebo nižší hodnota pH, než je hodnota optimální, změna iontové síly a organického složení mobilní fáze. (Tang et al., 2012) Proto se jen velmi omezeně používají v preparativní chromatografii. (Snyder et al., 1997)

3.3.2 Polysacharidové CSP

Skoro všechny v přírodě se vyskytující polysacharidy jsou chirální a opticky aktivní, a to díky své asymetrické struktuře. Pro kapalinovou chromatografii byly vyzkoušeny polysacharidové polymery, jako je například celulóza, amylóza, chitosan, xylan, dextran a inulin. Z těchto všech poskytly nejlepší výsledky celulóza a amylóza (Obr.2). (Subramanian, 2007) Celulóza a amylóza ve svém základním stavu nejsou příliš dobrými chirálními selektory. Zlepšení chromatografie a enantioselektivity těchto chirálních selektorů, může být docíleno derivatizací jejich hydroxylových skupin. (Meyers, 2006) Po derivatizaci se vážou na silikagelovou matici. (Subramanian, 2007)



Obr. 2: Rozdíl stavby celulózy a amylózy

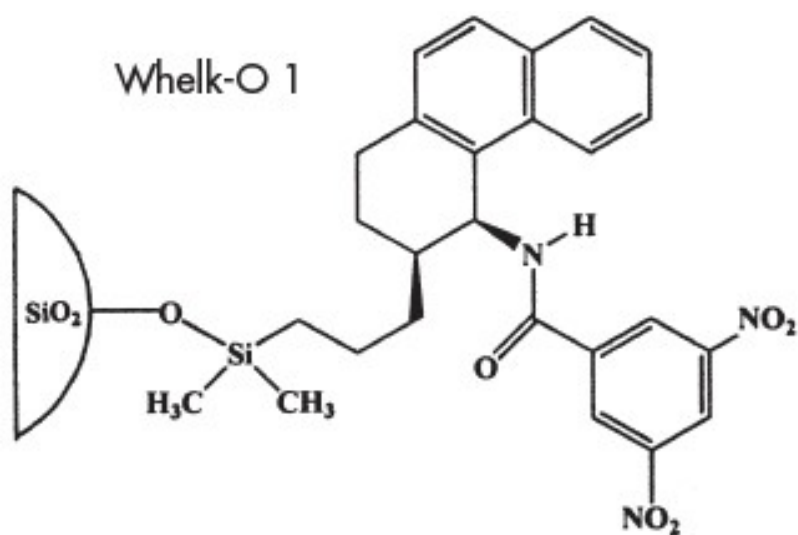
Zdroj: Kobayashi, H., et al (2011). *Synthesis of sugar alcohols by hydrolytic hydrogenation of cellulose over supported metal catalysts. Green Chem.*

Hned několik faktorů hraje důležitou roli v mechanismu retence, například průměrná molekulová hmotnost a molekulová hmotnost distribuce polymerů, způsob, jakým byl polysacharid zakotven na nosič a charakter samotného nosiče. (Snyder et al., 1997) Chirální rozpoznávací schopnost CSP je ovlivněna nejen chemickou strukturou polysacharidových derivátů, ale také supramolekulární strukturou polymeru. (Subramanian, 2007) Interakce může být zprostředkována prostřednictvím H-můstek, π - π interakcemi a stericky objemnou skupinou, která v blízkosti chirálního centra pomáhá. (Meyers, 2006; Snyder et al., 1997)

Pro polysacharidové CSP se běžně používá mód s normálními fázemi. Existují ale různé typy, pro které lze použít i reverzní fáze. (Meyers, 2006) Jako mobilní fáze se využívá směs heptanu s alkoholem a k prevenci chvostujícího píku se může přidat malé množství organické kyseliny nebo zásady. (Beesley et al., 1998) Celulózové a amylózové kolony mají dobrou kapacitu a jsou často používány pro preparativní separaci. (Meyers, 2006)

3.3.3 Donor-akceptorové (Pirklovy) CSP

Pirklovy CSP byly poprvé vyvinuty koncem sedmdesátých let, později bylo vytvořeno hned několik dalších typů. Známe je jako Pirklovy, kartáčové a donor-akceptorové CSP. Tato třída CSP využívá neutrální syntetické chirální nízkomolekulární selektory. (Lämmerhofer et al., 2010) S kartáčovým typem distribuce chirálních molekul na povrch inertní matrice jsou snadno přístupné pro analyty (Obr.3). (Tang et al., 2012) Jako podklad pro tvorbu těchto kolon se používá teorie reciprocity. Ta je založena na myšlence, že pokud je CSP Y schopna separovat enantiomery látky X, tak je látka X schopna fungovat jako CSP a separovat enantiomery látky Y. (Snyder et al., 1997)



Obr. 3 Příklad stavby chirálního selektoru

Zdroj: <https://www.bgb-info.com/home.php?cat=28757>

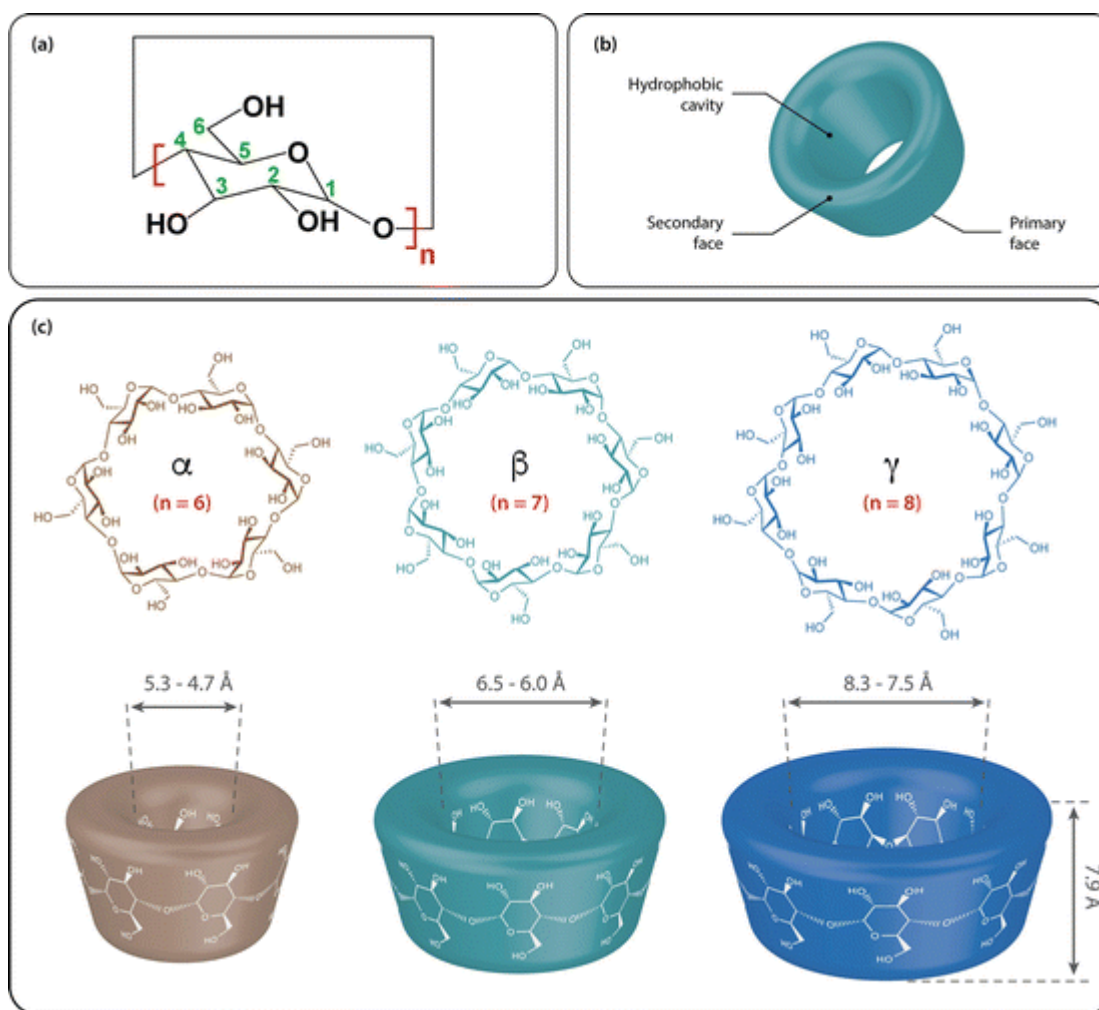
Je známo, že donor-akceptorové CSP oddělují dva enantiomery racemických sloučenin prostřednictvím minimálně tří simultánních interakcí mezi CSP a racemickým solutem, přičemž alespoň jedna interakce je stereochemicky závislá. Interakce mezi CSP a solutem mohou být buď přitažlivé, nebo odpudivé povahy, včetně jakékoli z molekulárních interakcí, jako je interakce π - π donor-akceptor, H-můstky, dipólové interakce a sterická odpuzování. (Hyun et al. 2003) Tyto vzájemná působení přispívají k celkové stabilitě diastereomerních komplexů vytvořených mezi jednotlivým enantiomerem a chirálním selektorem na stacionární fázi. (Meyers, 2006) Zejména nezbytná je π - π donor-akceptor interakce pro chirální rozpoznávání na Pirklově CSP.

Pro účinnou interakci donor akceptorů s racemickými soluty byly tyto CSP navrženy tak, aby obsahovaly π -kyselé a / nebo π -bazické aromatické skupiny. Podobně racemické soluty, které jsou rozdělovány na Pirklových kolnách, by měly obsahovat π -kyselé a / nebo π -bazické aromatické skupiny nebo by měly být derivatizovány derivatizačními činidly obsahujícími π -kyselé nebo π -bazické aromatické skupiny. (Hyun et al. 2003)

Pirklovy CSP nejčastěji operují v módu s normálními fázemi, ale mohou být použity i v reverzních fázích. Velkou výhodou je dostupnost kolon v obou enantiomerních formách s opačnou konfigurací, zobrazujících opačné eluční pořadí. Díky tomuto je možné je použít pro analytickou i preparativní separaci. (Snyder et al., 1997) Většina z těchto CSP poskytuje dobrou enantioselektivitu pro separaci aminokyselin, aminoalkoholů, aminů a jiných kyselých racemátů. (Tang et al., 2012)

3.3.4 Cyklodextrinové CSP

CD CSP mají dlouhou historii. Jejich vývoj se datuje již do sedmdesátých let minulého století a CD CSP vytvořené Armstrongovou skupinou byly první komerčně dostupné CSP vhodné pro reverzní fáze. (Tang et al., 2012) CD jsou cyklické oligomery získané degradací škrobu enzymem cyklodextrinová transglykosyláza. CD tvoří skupinu cyklických oligosacharidů. Skládají se ze šesti nebo více D-glukopyranosidových jednotek spojených v α (1-4). Nazývají se také cykloamylosy. Typické nativní CD obsahují šest, sedm nebo osm glukózových jednotek a jsou označeny α -, β -, a γ -cyklodextriny (Obr 4). Jsou to duté molekuly ve tvaru komolého kuželu vytvořeného z několika glukózových jednotek, které jsou kovalentně spojené atomy kyslíku a udržované ve tvaru skrz vodíkové vazby mezi sekundárními hydroxylovými skupinami na sousedních jednotkách na širším okraji dutiny. CD jsou ve skutečnosti kruhovými molekulami a mají prstencový nebo kuželový tvar (Obr 4). Válcovitý tvar nemají kvůli nedostatku volné rotace v úrovni vazeb mezi glukopyranózovými jednotkami. (Crini et al., 2018) Okraj kavity je lemován polárními, sekundárními hydroxylovými skupinami, ale kavita sama o sobě je hydrofobní. Hydrofobní část molekuly analytu preferuje nepolární vnitřek kavity, zatímco polární funkční skupina se může přes H-můstky navázat na polární část kavity. (Snyder et al., 1997)



Obr. 4 Schématické zobrazení základní chemické struktury (a), třídízenční struktury cyklodextrinů (b) a chemické a dimenzionální struktury α -, β -, a γ -cyklodextrinů (c)

Zdroj: Crini, G., et al (2018). *Fundamentals and Applications of Cyclodextrins*.

Mechanismus chirálního rozpoznávání je založen nejen na interakcích analytů s hydrofilním povrchem CD, ale také na začlenění objemné hydrofobní skupiny analytu, nejlépe aromatické skupiny, do hydrofobní dutiny CD. Vodíková vazba a dipól-dipól interakce s hydroxylovými skupinami v polohách C-2 a C-3 v ústí dutiny také přispívá k chirálnímu rozpoznání. Enantioseparační schopnosti CD mohou být zvýšeny derivatizací jejich hydroxylových skupin. (Tang et al., 2012) Určité strukturální vlastnosti mohou zvýšit pravděpodobnost separace enantiomerů na CD CSP. Molekula analytu musí být schopna vstoupit do dutiny, aromatický kruh nebo cykloalkylový kruh by měly být

v blízkosti chirálního centra. Substituent v blízkosti chirálního centra analytu by měl být schopen interagovat s OH skupinami na vstupu do CD kavity. (Snyder et al., 1997)

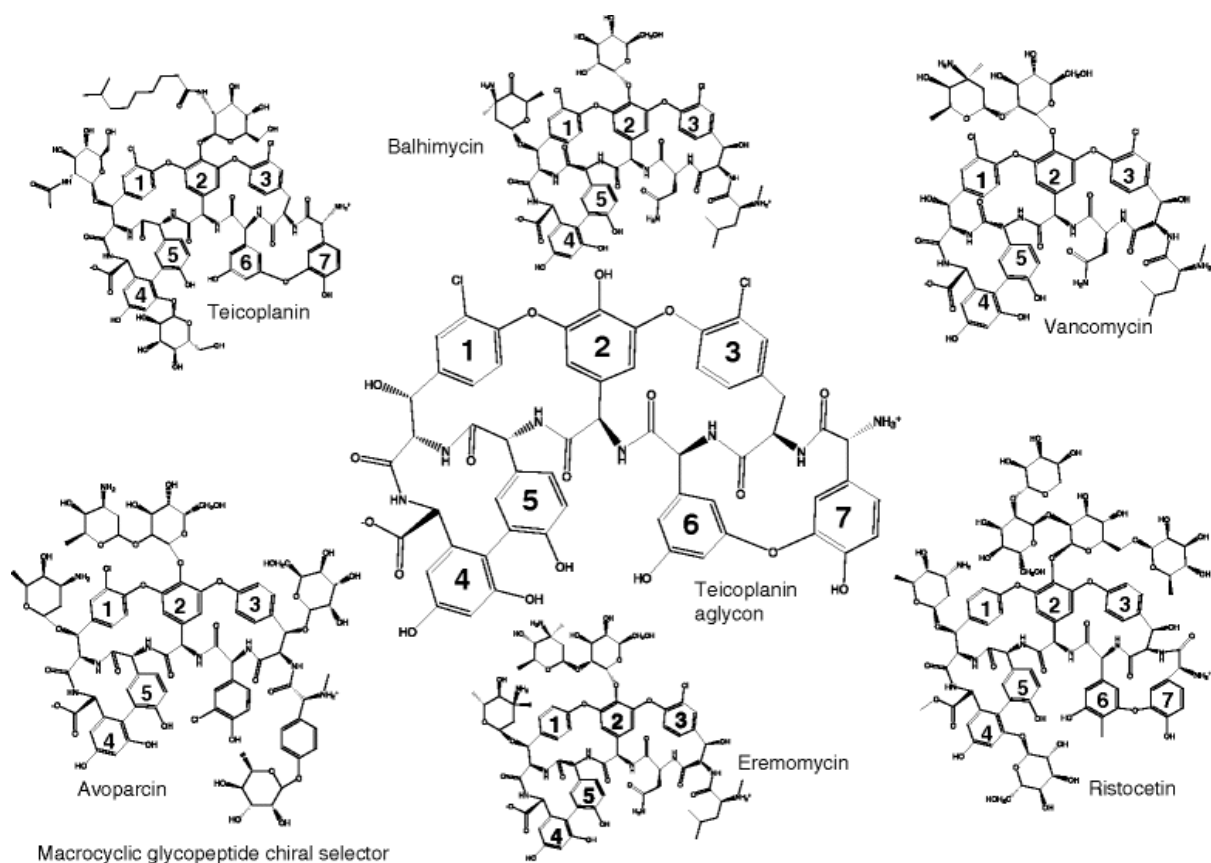
Separace enantiomerů může probíhat ve všech třech módech v normálním, reverzním i polárně organickém. Důležitým parametrem pro výběr módu je rozpustnost analytu. Pravděpodobnost separace enantiomerů klesá v pořadí reverzní, normální a polárně organický mód. (Snyder et al., 1997)

Obecně platí, že látky, které obsahují jeden kruh (např. benzen), se budou separovat na α -CD, látky s dvěma kruhy (např. naftalen) na β -CD a látky se třemi jako je pyren, se budou separovat na γ -CD. (Snyder et al., 1997) β -CD je nejrozšířenější chirální separační materiál v HPLC technologii. K dnešnímu dni existuje celá řada sloučenin (např. B-blokátory, alkaloidy, karboxylové kyseliny a neutrální molekuly), které byly na těchto CD CSP úspěšně odděleny. (Tang et al., 2012)

3.3.5 Makrocyclická antibiotika CSP

Makrocyclická antibiotika CSP našla široké uplatnění jako chirální selektory pro HPLC, zejména teikoplanin, aglykon teikoplaninu, vankomycin, ristocetin A a jejich deriváty (Obr.5). Makrocyclická antibiotika CSP vykazují vynikající selektivitu a mohou být navázány na silikagel přes vazebné řetězce za použití různých chemikálií. (Meyers, 2006) Komerční makrocyclické glykopeptidové CSP byly shledány velmi odolnými a schopnými pracovat v různých chromatografických režimech: normálním, reverzním a polárně organickém módu při zachování jejich separačních vlastností. (Berthod et al., 2010)

I přes veliký význam těchto CSP o nich dopodrobna víme relativně málo, zejména ohledně jejich chirálních rozpoznávacích mechanismů na molekulární úrovni. Je známo, že tyto antibiotické selektory jsou značně strukturálně složité, a to komplikuje jejich zkoumání. Sdílejí společné heptapeptidové aglykonové jádro s aromatickými zbytky, které jsou vzájemně propojeny a vytváří košovité struktury s mělkými kapsami pro inkluzní komplexy. Sacharidové zbytky jsou umístěny na povrchu. (Lämmerhofer, 2010)



Obr. 5 Molekulární struktury makrocyclických glykopeptidů teikoplaninu, vancomycinu, ristocetinu, aglykonu teikoplaninu a dalších.

Zdroj: Berthod, A., et al (2010). *Chiral Recognition with Macrocyclic Glycopeptides: Mechanisms and Applications. Chiral Recognition in Separation Methods*,

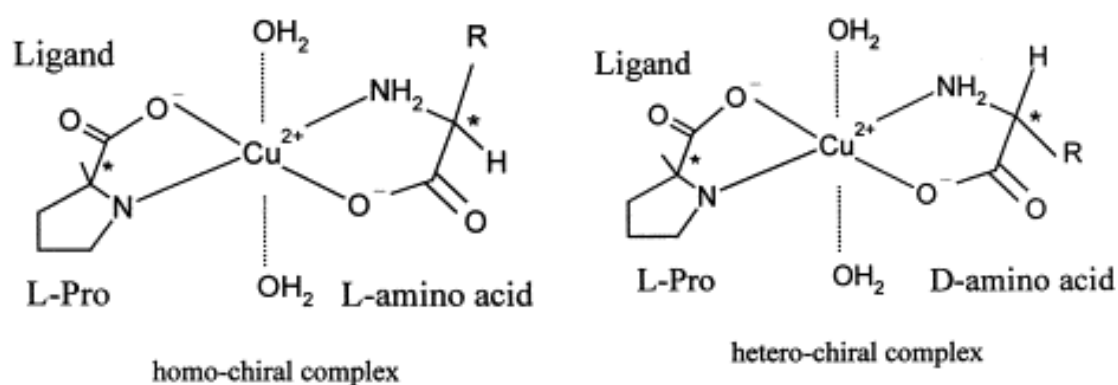
Na rozdíl od jiných typů chirálního selektoru obsahují makrocyclická antibiotika širokou škálu strukturálních typů (např. makrocyclické polyenpolyoly, ansa sloučeniny, makrocyclické glykopeptidy, peptidy a peptid-heterocyklové konjugáty). Různé struktury tohoto typu makrocyclických CSP umožňují více interakcí (např. hydrofobní, dipól-dipól, π - π interakce, H-můstky a sterické odpuzování). (Tang et al., 2012)

Nejvýraznějším rysem této třídy chirálních selektorů je jejich iontový charakter. Bez výjimky jsou všechny makrocyclické glykopeptidové chirální selektory ionizovatelné. Všechny nesou primární nebo sekundární aminy, které jsou kladně nabitě při neutrálních a kyselých hodnotách pH. Všechny, kromě ristocetinu, mají také karboxylovou kyselinu s negativním nábojem při neutrálním a zásaditém pH. Čistý náboj chirálního selektoru je nastavitelný změnou pH mobilní fáze. (Berthod et al., 2010)

Makrocyclická antibiotika mají široké spektrum aplikace. Mají vynikající enantioselektivitu pro nativní aminokyseliny, peptidy, α -hydroxykarboxylové kyseliny a různé neutrální analyty, včetně cyklických amidů a aminů. (Tang et al., 2012; Meyers, 2006)

3.3.6 Chirální ligandová výměna

Koncem šedesátých let použil Davankov ligandově výměnou CSP k imobilizaci prolinu na polystyrenový nosič s Cu^{2+} ionty v eluentu. Použití bylo založeno na diastereomerním ternárním koordinačním komplexu formátovaném chirálním selektorem, kovovým iontem a analytem, ve kterém je chirální selektor a analyt adsorbován v koordinační sféře centrálního kovového iontu (Obr. 6). Po syntéze a zkoušce CSP chirální ligandové výměny typu polystyrenu v roce 1968, vznikly analogické CSP, vázané na oxid křemičitý a o deset let později byly vyvinuty i další CSP polymerního typu. (Tang et al., 2012)



Obr. 6 Ternární ligandově výměnný komplex mezi ligandem (L-Pro), Cu^{2+} a enantiomerem aminokyseliny

Zdroj: Koska, J., et al (2001). *Solvent effects in chiral ligand exchange systems*.

Chirální ligandová výměna je retenční mód, ve kterém jsou enantiomery separovány na základě rozdílu v jejich nábojových a ionizačních konstantách. Tímto způsobem lze oddělit pouze ionizované analyty. Tento typ chromatografie zahrnuje tvorbu reverzibilního kovového komplexu koordinací substrátů, které fungují jako ligandy kovového iontu. Chirální ligandová výměna využívá schopnosti Cu^{2+} nebo jiných

dvojmocných kovových iontů tvořit diastereomerní komplexy s chirálními analyty, a tím vzniká smíšený ternární komplex kov-ion / selektor / solut. (Meyers, 2006; Lämmerhofer et al., 2010) Separace enantiomerů pomocí této metody je založena na rozdílu termodynamických stabilit mezi enantiomery a dvojmocnými kationy. Stabilita komplexu je vysoce závislá na použitém přechodném kovu. Cu^{2+} komplexy jsou obecně stabilnější a preferovanější pro HPLC než Ni^{2+} nebo Co^{2+} komplexy. (Meyers, 2006)

Chirální ligandová výměna je dostupná a používá se primárně pro enantiomerní separaci tříd biologicky relevantních sloučenin (např. aminokyseliny, α -hydroxylové kyseliny). Enantiomery musí být schopny tvořit bidentátní cheláty, aby byly odděleny na tomto druhu CSP. (Tang et al., 2012) Selektivita a účinnost tohoto typu separace je velmi ovlivněna pH, iontovou silou mobilní fáze a teplotou. (Meyers, 2006)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 *Přístroje, pomůcky, chemikálie*

Kapalinový chromatograf (Shimadzu):

- degasér DGU A5
- vysokotlaká pumpa LC-10ADvp
- autosampler SIL-10ADvp
- kolonový termostat CTO-10Avp
- PDA detektor SPD-M10Avp
- Chromatograf byl řízen prostřednictvím řídicí jednotky SCL-10Avp z počítače pomocí chromatografického softwaru CLASS-VP.

Kolona:

Chiralcel®OD-R 250x4,6 mm; 10 µm, výrobce: Daicel Corporation

Pomůcky:

Analytické váhy (Sartorius)

Laboratorní sklo

Vialky

Mikropipeta

Chemikálie:

Methanol for gradient elution (Aldrich)

Chloristan sodný monohydrát (Fluka)

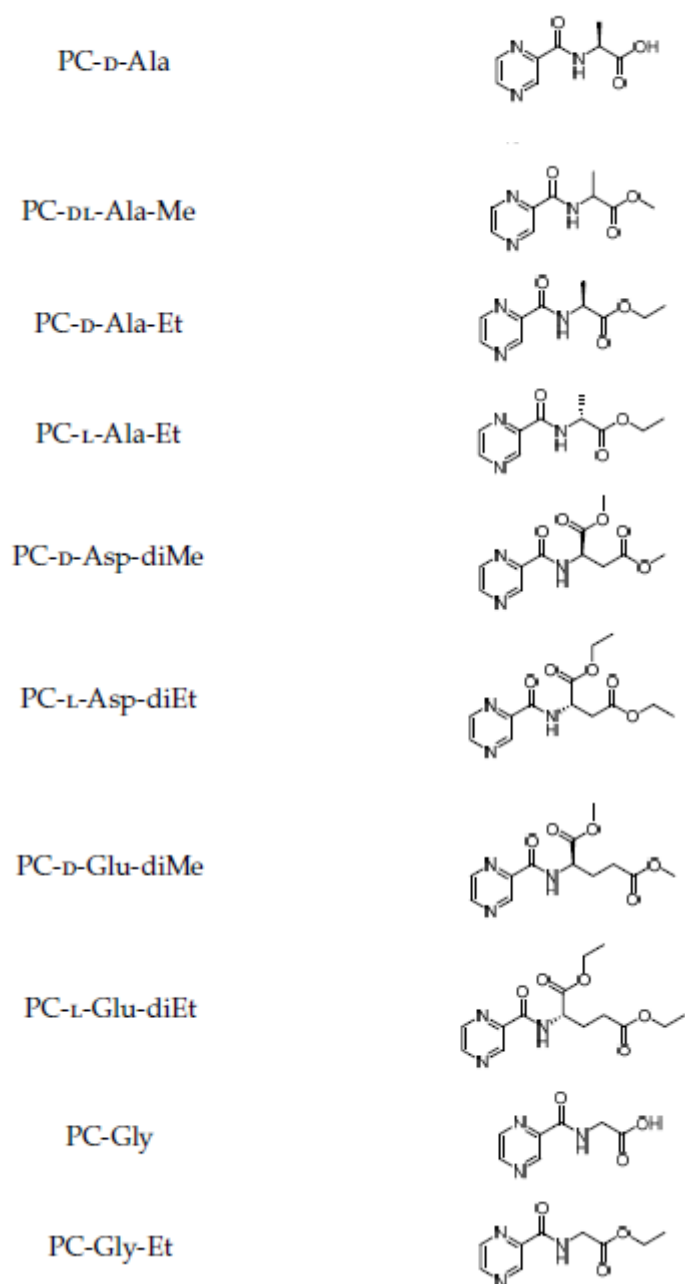
Deionizovaná voda (FAF)

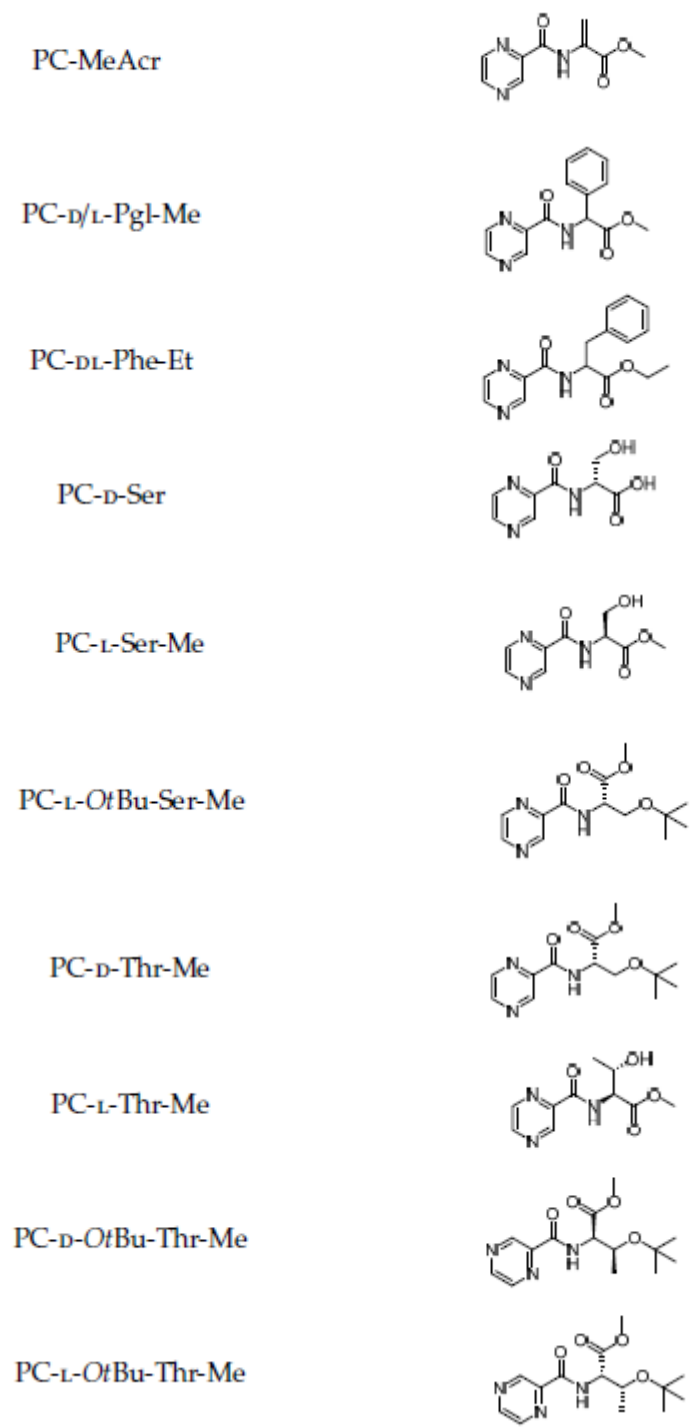
4.2 Příprava vzorku pro HPLC analýzu

Příprava zásobního roztoku probíhala rozpuštěním malého množství v 5ml methanolu v kádince. Tento roztok jsem přelila do odměrné baňky, přidala 2,5 ml roztoku chloristanu sodného (1 mol/l), doplnila methanolem po značku a promíchala.

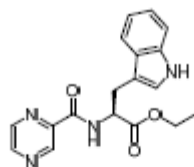
4.3 Seznam separovaných racemátů

Tyto látky byly připraveny na katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy:

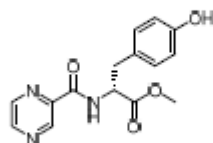




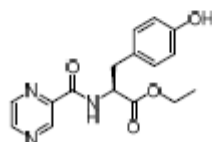
PC-L-Trp-Et



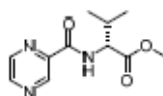
PC-D-Tyr-Me



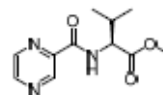
PC-L-Tyr-Et



PC-D-Val-Me



PC-L-Val-Me



4.4 Výchozí nastavení chromatografických podmínek

Teplota kolony byla nastavena na 25 °C. Průtok mobilní fáze byl u všech separací 0,5 ml/min. Výchozí složení mobilní fáze bylo 25% roztoku chloristanu sodného (1 mol/l) a 75% MeOH, které bylo upravováno dle potřeby. Nástřiky vzorků byly vždy 20 μ l. Detekce probíhala při vlnových délkách 228 a 310 nm. Základní doba analýzy byla 20 minut, ale byla upravována dle potřeby.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Hodnocení chirální separace

U kolony Chiralcel®OD-R 250x4,6 mm; 10 µm probíhala separace v reverzním módu za různého složení mobilní fáze. Výchozí složení mobilní fáze bylo nastaveno na 25% roztoku chloristanu sodného (1 mol/l) a 75% MeOH. Za těchto podmínek se separovalo nejvíce látek. Pro některé látky bylo potřeba složení změnit, aby došlo ke zlepšení jejich retence.

Tabulka 2: Přehled separovaných látek, jejich retenční časy a výsledné složení mobilní fáze

název	Retenční čas	Mobilní fáze
PC-D-Ala	9,35	25:75
PC-D-Ala-Et	9,24	25:75
PC-L-Ala-Et	10,56	25:75
PC-L-Asp-diEt	12,12	25:75
PC-D-Asp-diMe	10,09	25:75
PC-L-Glu-diEt	12,87	25:75
PC-D-Glu-diMe	10,00	25:75
PC-Gly	5,99	25:75
PC-Gly-Et	8,10	25:75
PC-MeAcr	17,04	25:75
PC-L-OtBu-Ser-Me	11,96	25:75
PC-D-OtBu-Thr-Me	14,45	25:75
PC-L-OtBu-Thr-Me	12,92	25:75
PC-D-(L)-Pgl-Me	16,41/17,75	25:75
PC-DL-Phe-Et	19,74/21,35	25:75
PC-D-Ser	5,92	25:75
PC-L-Ser-Me	7,28	25:75
PC-L-Trp-Et	27,33	25:75
PC-L-Tyr-Et	13,92	25:75
PC-D-Tyr-Me	10,42	25:75
PC-DL-Ala-Me	11,78/12,72	35:65
PC-D-Val-Me	20,10	40:60
PC-L-Val-Me	21,36	40:60
PC-D-Thr-Me	8,93	40:60
PC-L-Thr-Me	9,42	40:60

Z tab. 2 je zřejmé, že ve většině případů bylo výchozí složení mobilní fáze dostačující. Dále je uvedeno několik vzorových chromatogramů.

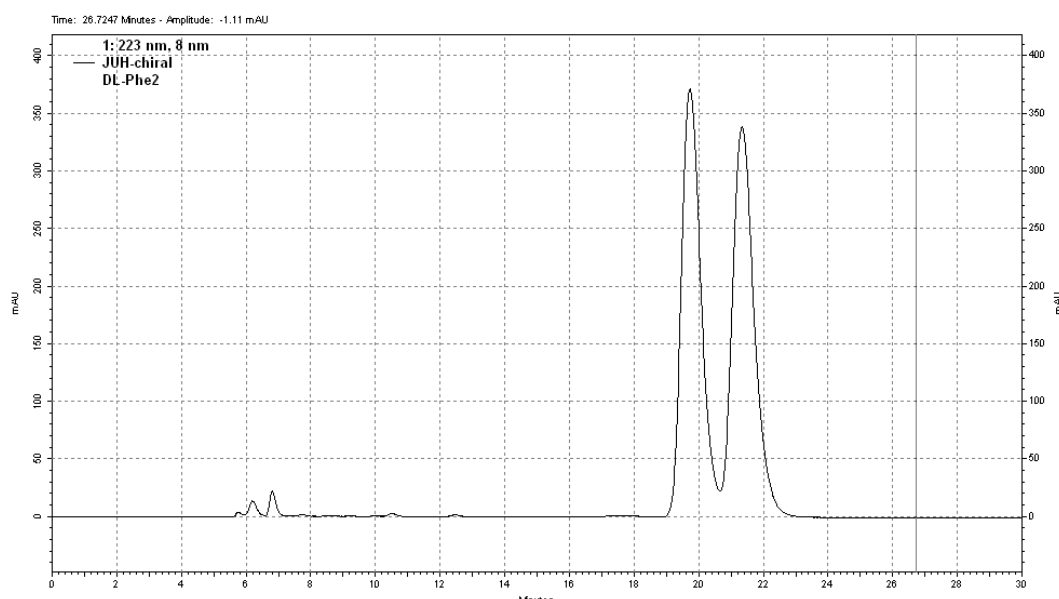
Obr. 7: Chromatografický záznam separace PC-DL-Phe-Et

Mobilní fáze:

roztok chloristanu sodného (1 mol/l):MeOH=25:75

tR1= 19,74 min.

tR2= 21,35 min.



Separace D a L fenylalaninu-Et probíhala za použití výchozího složení mobilní fáze. Bylo však nutné prodloužit čas analýzy. Látky mají spíše nepolární charakter, proto se déle zdržovaly na koloně.

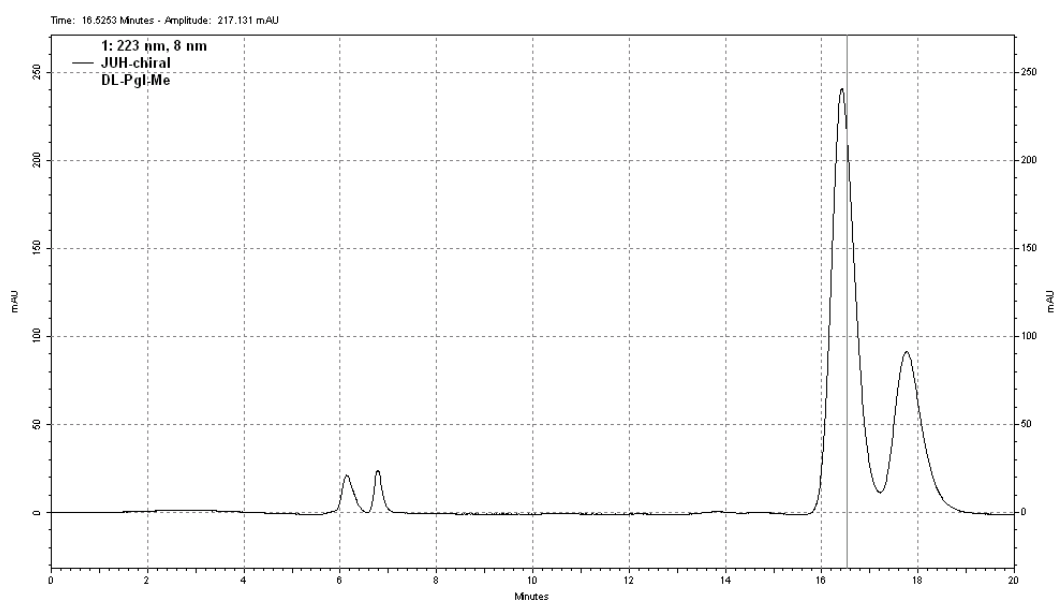
Obr. 8: Chromatografický záznam separace PC-D-(L)-Pgl-Me

Mobilní fáze:

roztok chloristanu sodného (1 mol/l):MeOH=25:75

tR1= 16,41 min.

tR2= 17,75 min.



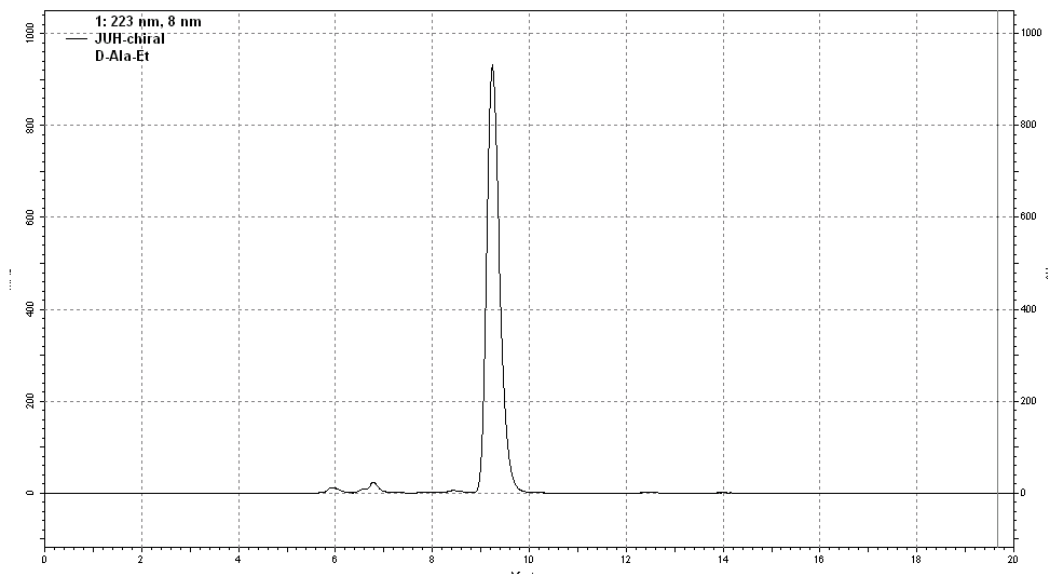
D a L Pgl-Me se dobře separovaly za podmínek, které byly uvedeny v podkapitole 4.4.

Obr. 9: Chromatografický záznam separace PC-D-Ala-Et

Mobilní fáze:

roztok chloristanu sodného (1 mol/l):MeOH=25:75

t_{R1} = 9,24 min.

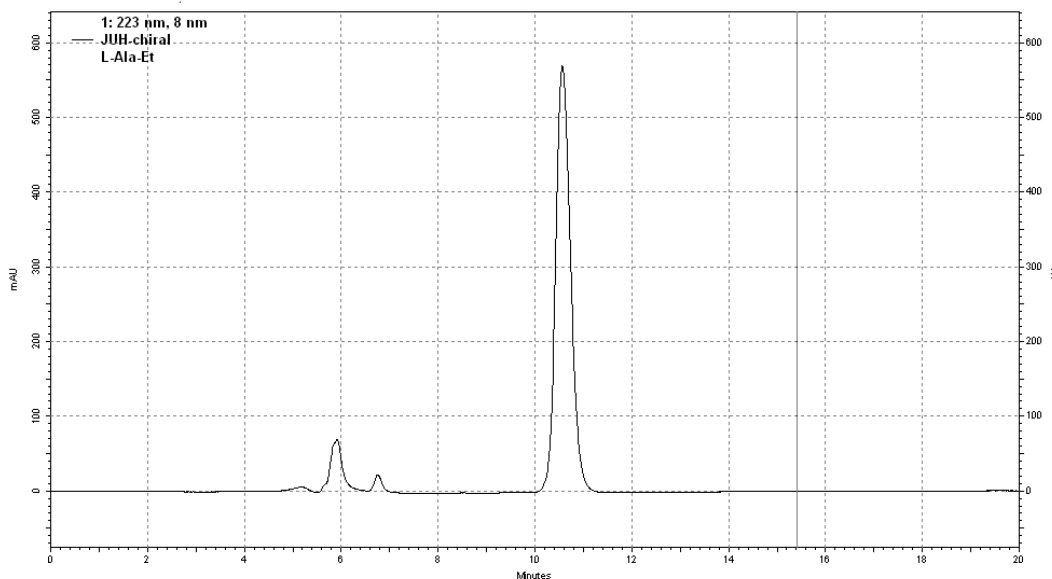


Obr. 10: Chromatografický záznam separace PC-L-Ala-Et

Mobilní fáze:

roztok chloristanu sodného (1 mol/l):MeOH=25:75

t_{R2} = 10,56 min.



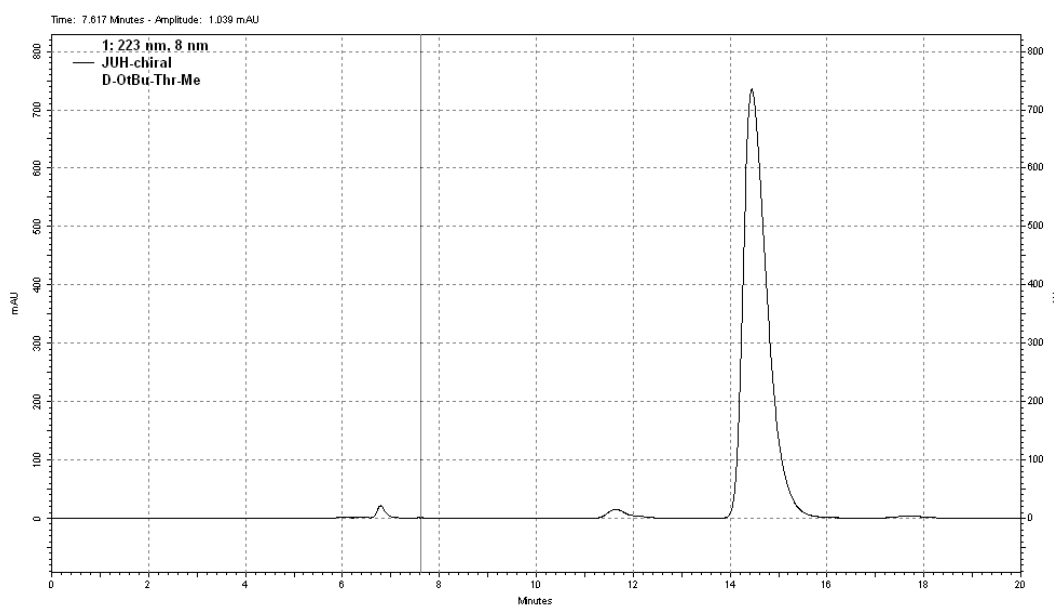
D a L Alanin-Et se dobře separovaly za podmínek, které byly uvedeny v podkapitole 4.4.

Obr. 11: Chromatografický záznam separace PC-D-OtBu-Thr-Me

Mobilní fáze:

roztok chloristanu sodného (1 mol/l):MeOH=25:75

tR1= 14,45 min.

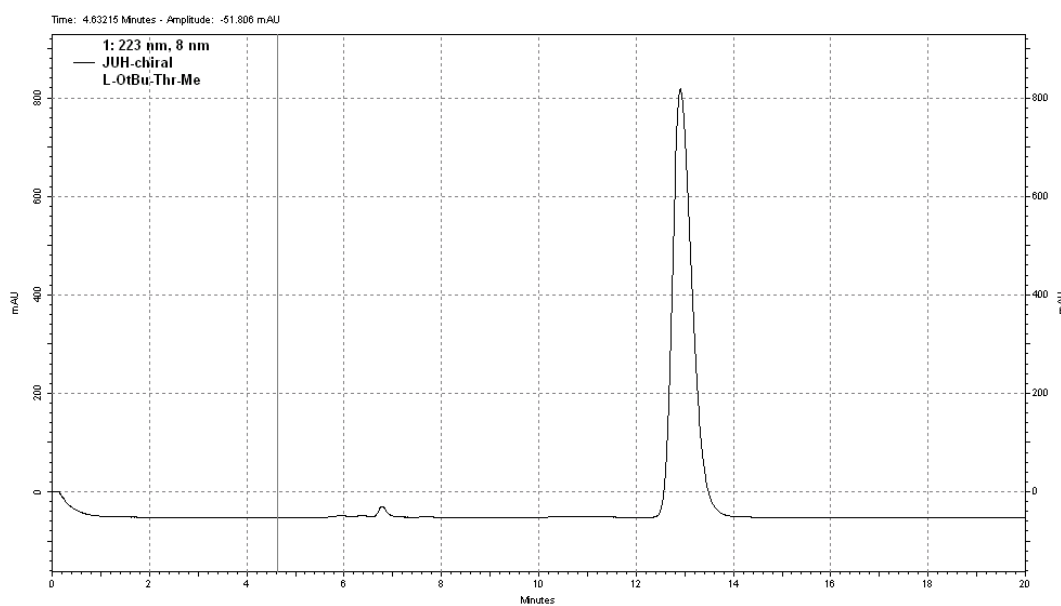


Obr. 12: Chromatografický záznam separace PC-L-OtBu-Thr-Me

Mobilní fáze:

roztok chloristanu sodného (1 mol/l):MeOH=25:75

t_{R2} = 12,92 min.



D a L-OtBu-Thr-Me se dobře separovaly za podmínek, které byly uvedeny v podkapitole 4.4.

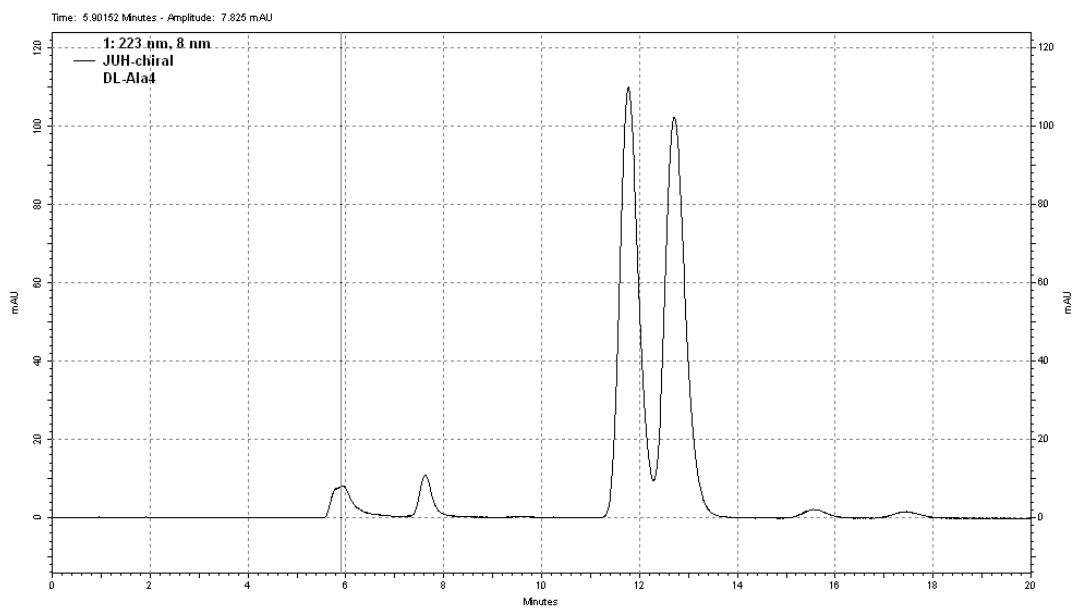
Obr. 13: Chromatografický záznam separace DL-Ala-Me

Mobilní fáze:

roztok chloristanu sodného (1 mol/l):MeOH=35:65

tR1= 11,78 min.

tR2=12,72 min.



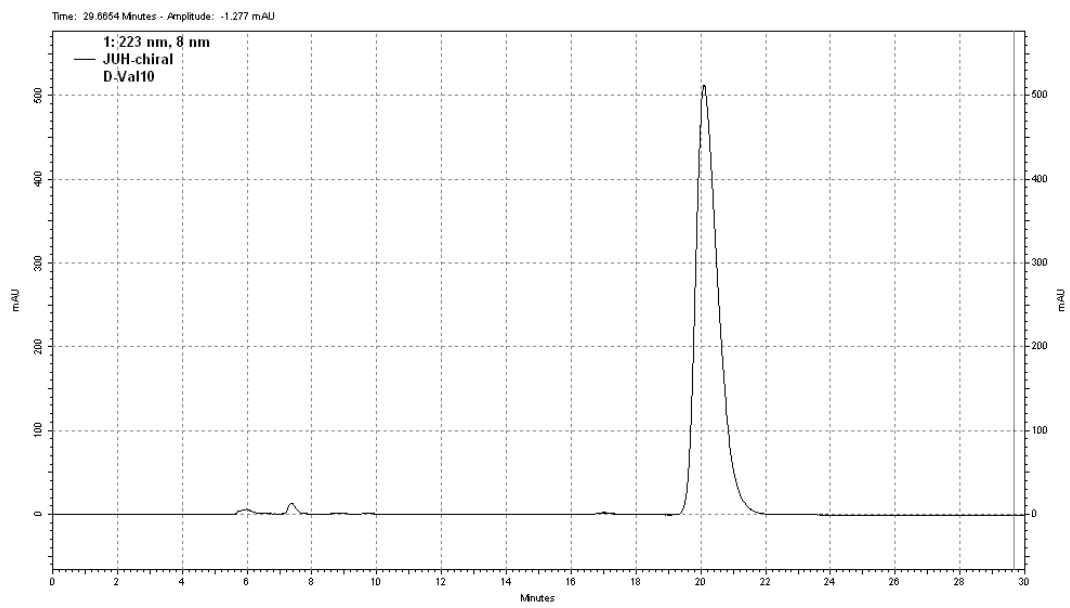
U D a L Alaninu-Me bylo nutné zvýšit polaritu mobilní fáze, přidáním většího množství chloristanu došlo k lepší separaci.

Obr. 14: Chromatografický záznam separace D-Val-Me

Mobilní fáze:

roztok chloristanu sodného (1 mol/l):MeOH=40:60

tR1= 20,10 min.

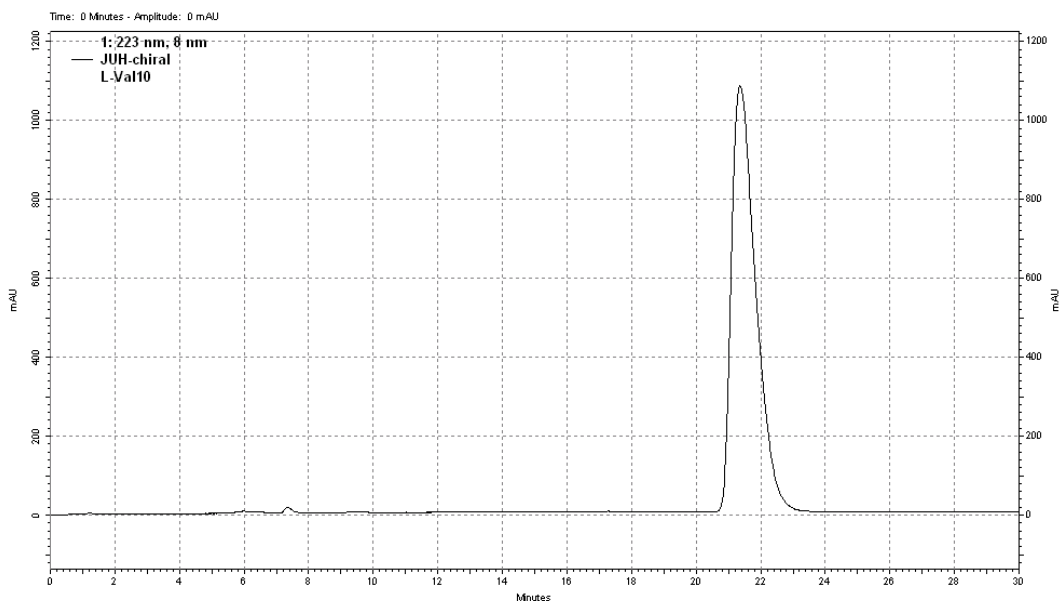


Obr. 15: Chromatografický záznam separace L-Val-Me

Mobilní fáze:

roztok chloristanu sodného (1 mol/l):MeOH=40:60

$t_R=21,36$ min.



U D a L Valinu-Me bylo nutné zvýšit polaritu mobilní fáze, přidáním většího množství chloristanu došlo k lepší separaci. Zvýšením polarity mobilní fáze se látky déle zdržovaly na koloně, proto bylo také nutné prodloužit čas analýzy na 30 min.

Je vidět, že na uvedených chromatogramech jednotlivých enantiomerů se nenacházejí píky jejich druhých enantiomerů. Mé měření mohlo být ovlivněno dlouhodobými technickými problémy s přístrojem.

6. ZÁVĚR

Chirální separace látek připravených na katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy HPLC metodou probíhala v reverzním módu na koloně Chiralcel®OD-R 250x4,6 mm; 10 μm. Byly zjištěny optimální podmínky pro separaci těchto látek. Většina látek se separovala za výchozího složení mobilní fáze 25% roztoku chloristanu sodného (1 mol/l) a 75% MeOH, a to s dobou analýzy do 20 min. Pro některé látky bylo nutné tyto podmínky změnit. Například u D a L fenylalaninu-Et se prodloužil čas analýzy. Tyto látky mají spíše nepolární charakter a déle se zdržovaly na koloně. V případě D a L Alaninu-Me a D a L Valinu-Me bylo zapotřebí zvýšit polaritu mobilní fáze. Přidáním většího množství chloristanu došlo k lepší separaci. U D a L Valinu-Me zvýšením polarity mobilní fáze, došlo k delšímu zdržování látek na koloně, stouply retenční časy látek a čas analýzy byl nastaven na 30 min.

Hlavním účelem této separace bylo prokázat enantiomerickou čistotu připravených látek, a tedy stereoselektivitu použitých syntetických postupů. To bylo prokázáno tím, že na jednotlivých chromatogramech enantiomerů nejsou přítomny píky jejich druhých enantiomerů.

7. POUŽITÉ ZKRATKY

HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
CAD	Corona™ Charged Aerosol Detector
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
CSP	Chirální stacionární kolna
CD	Cyklodextriny
tR	Retenční čas

8. POUŽITÁ LITERATURA

ARORA, S. a D. Bhanot. *Introduction to High Performance Liquid Chromatography* by Lab-Training.com, 2014:40

BEESELEY, T. E. a R. P. W. SCOTT. *Chiral chromatography*. New York: J. Wiley, c1998. ISBN isbn0-471-97427-7.

BERTHOD, A., H. X. QIU, S. M. STAROVEROV, M. A. KUZNESTOV a D. W. ARMSTRONG. *Chiral Recognition with Macrocyclic Glycopeptides: Mechanisms and Applications*.

BERTHOD, A., ed. *Chiral Recognition in Separation Methods* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 2010-6-10, s. 203-222 [cit. 2020-03-19].

DOI: 10.1007/978-3-642-12445-7_7. ISBN 978-3-642-12444-0. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-12445-7_7

CRINI, G., S. FOURMENTIN, É. FENYVESI, G. TORRI, M. FOURMENTIN a N. MORIN-CRINI.

Fundamentals and Applications of Cyclodextrins. FOURMENTIN, S., G. CRINI a E. LICHTFOUSE, ed. *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018, 2018-04-27, s. 1-55 [cit. 2020-03-18].

Environmental Chemistry for a Sustainable World. DOI: 10.1007/978-3-319-76159-6_1.

ISBN 978-3-319-76158-9. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-76159-6_1

DONG, M. W. *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2006. ISBN 0-471-72789-x.

GÜBITZ, G. a M. G. SCHMID. *Chiral separations: methods and protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, c2004. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 243. ISBN 1588291502.

HYUN, M. H. a Y. J. CHO. *Chiral Separation by HPLC With Pirkle-Type Chiral Stationary Phases*. GÜBITZ, Gerald a Martin G. SCHMID. *Chiral Separations* [online]. New Jersey:

Humana Press, 2003, s. 197-206 [cit. 2020-03-17]. DOI: 10.1385/1-59259-648-7:197. ISBN 1-59259-648-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-648-7:197>

LÄMMERHOFER, M. *Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases*. *Journal of Chromatography*

A [online]. 2010, **1217**(6), 814-856 [cit. 2020-03-17]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.10.022. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309015180>

MEYERS, R. A., ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2006 [cit. 2020-02-29]. ISBN 0471976709.

NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha: Europrint, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

SNYDER, L. R., J. J. KIRKLAND a J. L. GLAJCH. *Practical HPLC method . development*. 2nd ed. New York: Wiley, c1997. 765 s. ISBN 0-471-00703-x.

SOLOMONS, T. W. Graham a Craig B. FRYHLE. *Organic chemistry*. 10th ed. Hoboken, NJ: Wiley, c2011. ISBN isbn978-0-470-40141-5(cloth). 188 s.

SUBRAMANIAN, G. *Chiral separation techniques: a practical approach*. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH, c2007. ISBN 978-3-527-31509-3.

TANG, M., J. ZHANG, S. ZHUANG a W. LIU. Development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic separation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2012, **39**, 180-194 [cit. 2020-02-29]. DOI: 10.1016/j.trac.2012.07.006. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993612002002>

WELLINGS, D. A. *A practical handbook of preparative HPLC*. Boston: Elsevier, c2006. ISBN 1-8-56-17466-2.