

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



Využití HPLC v chirálních separacích VII.

Diplomová práce

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

Konzultant diplomové práce: Mgr. Ondřej Horáček

Hradec Králové, 2022

Kristýna Štilcová

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 dne 10.05.2022

.....

Mé poděkování patří **doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, PhD.** za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracování této diplomové práce, konzultantovi **Mgr. Ondřeji Horáčkovi** za cenné připomínky při experimentální práci v laboratoři a ochotu, **RNDr. Bohumírovi Grünerovi, CSc.** z Ústavu anorganické chemie AV ČR za poskytnutí analyzovaných látek a panu **doc. Ing. Michalovi Kohoutovi, PhD.** z Ústavu organické chemie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze za poskytnutí chinidinových kolon.

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu GA UK 168120 a projektu SVV 260 547.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Studentka: Kristýna Štilcová

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

Konzultant diplomové práce: Mgr. Ondřej Horáček

Název diplomové práce: Využití HPLC v chirálních separacích VII.

Klastrové sloučeniny bóru jsou anorganické, synteticky připravené, trojrozměrné, klecovité struktury. Boranové klastry, které jsou tvořené pouze atomy bóru a vodíku jsou zcela symetrické sloučeniny. Jejich symetrie může být narušena endoskeletární či exoskeletární substitucí za vzniku některých chirálních sloučenin. Karborany, podskupina klastrových sloučenin bóru, obsahují ve své struktuře alespoň jeden atom uhlíku, který se účastní exoskeletární substituce. Mezi chirální sloučeniny patří také metallakarborany obsahující ve své struktuře atom kobaltu (bis(dikarbolidy)) a 7,8-dikarba-*nido*-undekaboráty, které byly studovány v této práci. Díky specifickým vlastnostem jako je vysoká lipofilita, metabolická stabilita a delokalizovaný negativní náboj, mohou být tyto látky využity pro izosterní substituci fenylu v molekulách farmakoforů. Z důvodu velkého významu chiralit ve farmacii a stoupajícího zájmu o kobalt bis(dikarbolidy) a 7,8-dikarba-*nido*-undekaboráty je potřeba stanovit vhodné podmínky pro jejich chirální separaci. Separace těchto látek již byla studována v minulosti za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie a β -cyklodextrinu jako chirálního selektoru. Účelem této práce byla chirální separace karboranů s použitím polysacharidových a chinidinových chirálních selektorů. Polysacharidy se řadí mezi neúčinnější chirální selektory a chinidinové selektory jsou díky svému kladnému náboji vhodné pro separaci aniontů. Bylo dosaženo alespoň částečné separace třinácti z dvaceti jedna analytů a byly stanoveny podmínky pro separaci kobalt bis(dikarbolidů) a 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Student: Kristýna Štilcová

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

Consultant: Mgr. Ondřej Horáček

Title of Thesis: The employment of HPLC in the field of chiral separations VII.

Boron clusters are inorganic, synthetically prepared, three-dimensional, cage-like structures. Boron cluster compounds which are made only of boron and hydrogen atoms are completely symmetrical. Their symmetry can be disrupted by endo- or exoskeletal substitution resulting in chiral compounds. Carboranes, subgroup of the boron cluster compounds, contain at least one carbon atom in their structure and usually include exoskeletal substitution. Therefore, the metallacarboranes containing cobalt bis(dicarbollides) and 7,8-dicarba-*nido*-undecaborates that have been studied can be found among these chiral structures. Thanks to the specific properties such as high lipophilicity, metabolic stability and delocalized negative charge, the studied compounds can be used as isosteric substitution of phenyl ring in pharmacophores. Due to the growing interest in cobalt bis(dicarbollides) and 7,8-dicarba-*nido*-undecaborates and the importance of chirality in pharmacy, suitable conditions for chiral separation need to be determined. The separation of these substances has been studied in the past using high performance liquid chromatography and β -cyclodextrin chiral selectors. The focus of this study was the chiral separation of carboranes using polysaccharide and quinidine chiral selectors. Polysaccharides are among the most effective chiral selectors while quinidine selectors are suitable for the separation of anions due to the positive charge. At least partial chiral separation was achieved in thirteen out of twenty-one analytes as well as successfully determining suitable conditions for separation of cobalt bis(dicarbollides) and 7,8-dicarba-*nido*-undecaborates.

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT.....	5
1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 CHIRÁLNÍ SEPARACE	9
2.1.1 <i>Izomerie</i>	9
2.1.2 <i>Význam chiraloty v přírodě a ve farmacii</i>	10
2.1.3 <i>Mechanismus chirální separace</i>	13
2.1.4 <i>Přímá metoda chirální separace</i>	15
2.1.5 <i>Nepřímá metoda chirální separace</i>	15
2.1.6 <i>Reverzní mód v chirální HPLC</i>	16
2.1.7 <i>Polárně-organický mód v chirální HPLC</i>	16
2.1.8 <i>Normální mód v chirální HPLC</i>	16
2.1.9 <i>Superkritická fluidní chromatografie v chirálních separacích</i>	17
2.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	18
2.2.1 <i>Úvod</i>	18
2.2.2 <i>Princip chromatografie a vybrané chromatografické charakteristiky</i>	18
2.2.3 <i>Instrumentace</i>	20
2.3 CHIRÁLNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE	21
2.3.1 <i>Polysacharidové CSP</i>	22
2.3.2 <i>Chidininové/Chininové CSP</i>	23
2.3.3 <i>Cyklodextrinové CSP</i>	24
2.3.4 <i>Cyklofruktanové CSP</i>	25
2.3.5 <i>Crown-etherové CSP</i>	26
2.3.6 <i>Donor-akceptorové (Pirklovy) CSP</i>	27
2.3.7 <i>Makrocyclické ATB</i>	27
2.3.8 <i>Ligand-výměnné (a iontově výměnné) CSP</i>	28
2.3.9 <i>Proteinové CSP</i>	29
2.4 KLASTROVÉ SLOUČENINY BÓRU.....	30
2.4.1 <i>Vlastnosti</i>	30
2.4.2 <i>Využití</i>	34

3 CÍL PRÁCE.....	37
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
4.1 PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY A CHEMIKÁLIE	38
4.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ A MOBILNÍCH FÁZÍ	41
4.3 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY	41
4.4 SEZNAM ANALYTŮ	42
5 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	45
5.1 POLYSACHARIDOVÉ CHIRÁLNÍ SELEKTORY	45
5.1.1 Chirální selektor: tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulózy.....	45
5.1.2 Chirální selektor: tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylozy.....	53
5.2 CHINIDINOVÉ CHIRÁLNÍ SELEKTORY	56
5.2.1 Chirální kolona: MK 373.....	56
5.2.2 Chirální kolona: SW 061	58
5.2.3 Chirální kolona: MK 391.....	59
5.2.4 Chirální kolona: SW 069	60
5.2.5 Chirální kolona: QN AX tBU.....	61
5.2.6 Porovnání chinidinových kolon:	63
6 ZÁVĚR	68
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	69
8 SEZNAM OBRÁZKŮ	69
9 SEZNAM TABULEK.....	72
10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73

1 Úvod

Klastrové sloučeniny bóru jsou anorganické, syntetické látky, jejichž trojrozměrná struktura je tvořena atomy bóru a vodíku. Náhradou alespoň jednoho atomu bóru atomem uhlíku vznikají karborany, významná podskupina boranových klastrů. Boranové klastry skládající se pouze z atomů bóru a vodíku jsou vysoce symetrické sloučeniny. Tato symetrie může být narušena exoskeletární či endoskeletární substitucí, což vede k chiralitě některých skupin karboranů. Použití boranových klastrů v medicíně bylo po dlouhou dobu omezeno pouze na bórovou neutronovou záchyťovou terapii, která se využívá v léčbě nádorových onemocnění. Díky svým jedinečným vlastnostem jako je hydrofobicita a vysoká metabolická stabilita lze boranové klastry využít k modifikaci farmakoforů, kdy v molekulách již známých léčiv nahrazují obvykle fenylové skupiny.

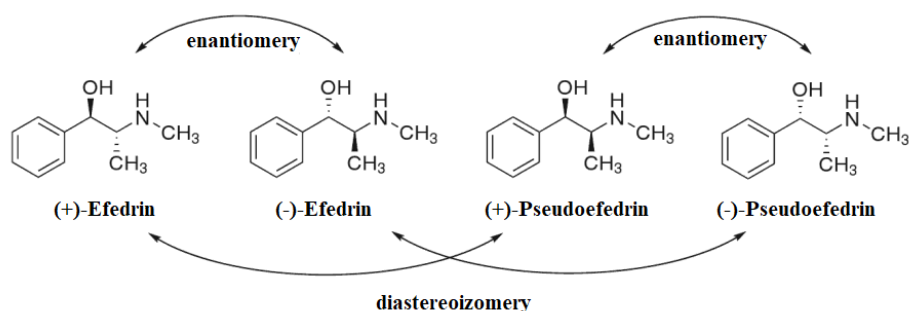
Pro chirální separaci těchto sloučenin se nejčastěji využívá metoda kapilární elektroforézy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). V této práci je studován vliv polysacharidových a chinidinových chirálních selektorů na účinnost enantioseparace v systému HPLC a jsou porovnány rozdílné způsoby navázání polysacharidových chirálních selektorů na silikagel.

2 Teoretická část

2.1 Chirální separace

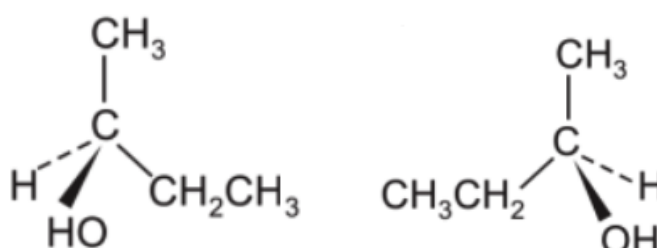
2.1.1 Izomerie

Izomery jsou molekuly o stejném sumárním vzorci, které se odlišují uspořádáním atomů v molekule (konstituční izomery) či v prostoru (prostorové izomery). Konstitučními izomery jsou molekuly lišící se uspořádáním uhlovodíkových řetězců, typem funkčních skupin nebo umístěním násobných vazeb v molekule. Prostorové izomery, tzv. stereoizomery, se liší uspořádáním atomů v prostoru. K tomuto rozdílnému uspořádání dochází na tzv. chirálních centrech, jejichž přítomnost udává chiralitu dané molekuly. Nejčastějším centrem chiralidy organických sloučenin je atom uhlíku s čtyřmi různými substituenty. Stereoizomery rozdělujeme na enantiomery a diastereoizomery. Enantiomery jsou vzájemně neztotožnitelné zrcadlové obrazy, mající v achirálním prostředí stejné fyzikální a chemické vlastnosti. Liší se však ve směru otáčení polarizovaného světla, kdy enantiomery stáčeující rovinu polarizovaného světla po směru hodinových ručiček jsou označovány (+) a enantiomery stáčeující rovinu polarizovaného světla proti směru hodinových ručiček jsou označovány (-). Směs enantiomerů v poměru 1:1 se nazývá racemická směs a není opticky aktivní. Z důvodu identických fyzikálně-chemických vlastností enantiomery nelze separovat pomocí achirálních chromatografických metod. Molekuly diastereoizomerů nejsou svými zrcadlovými obrazy a obsahují dvě či více chirálních center. V případě že se diastereoizomery liší konfigurací pouze na jednom chirálním centru, jedná se epimery. Díky rozdílným chemickým a fyzikálním vlastnostem je možné diastereoizomery izolovat v achirálních podmínkách [1,2,3]. Vztah mezi stereoizomery efedrinu a pseudoefedrinu znázorňuje Obrázek č.1.



Obrázek č.1 Struktury izomerů efedrinu a pseudoefedrinu, převzato a upraveno z [4]

Výsledná konfigurace molekuly v prostoru je na chirálních centrech značena stereochemickými deskriptory, nejčastěji *R* a *S*. Konfigurace substituentů na chirálním centru podle klesající priority ve směru hodinových ručiček je označována *R* (podle lat. *rectus*=pravý), označení *S* (lat. *sinister*=levý) je pro skupiny chirálního centra které jsou uspořádány dle klesající priority proti směru hodinových ručiček (Obrázek č.2). Priorita řazení skupin chirálního centra se řídí protonovým číslem jednotlivých substituentů dle Cahn-Ingold-Prelogova pravidla [1,2]. Další typ stereochemických deskriptorů *L* a *D* vychází z Fisherovy projekce, využívané při popisu struktury aminokyselin a sacharidů [1].

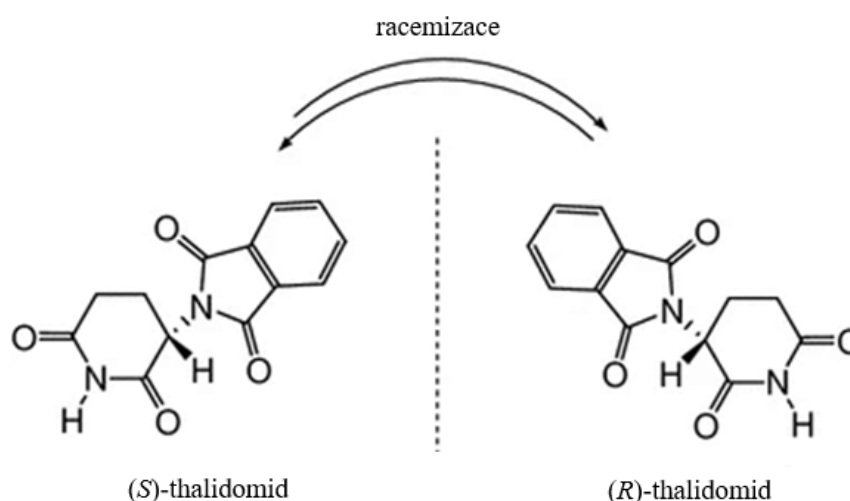


Obrázek č.2 Struktury (*S*)-butanolu (vlevo) a (*R*)-butanolu (vpravo),
převzato a upraveno z [5]

2.1.2 Význam chiralita v přírodě a ve farmacii

Chiralita je přirozeným jevem vyskytujícím se v přírodě. Mezi chirální látky se řadí mnoho biologických sloučenin včetně proteinů, enzymů, sacharidů a hormonů. Na rozdíl od abiotických chirálních látek se většina přírodních asymetrických sloučenin vyskytuje dominantně v jedné enantiomerní formě. Typickým příkladem jsou aminokyseliny vyskytující se jako *L*-izomery a sacharidy přírodního původu ve formě *D*-izomerů [2,6]. Důsledkem chirálního prostředí živých organismů je rozdílné chování enantiomerů xenobiotik v lidském těle. Jelikož farmakokinetické procesy jako je absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování často upřednostňují jeden z páru enantiomerů, mohou být u enantiomerů stejného léčiva pozorovány odlišné biologické vlastnosti [6,7]. Častým jevem je odlišná farmakologická aktivita páru enantiomerů, kdy pojem eutomer označuje farmakologicky aktivnější izomer, zatímco jeho opak je nazýván distomer. Distomer může rovněž vykazovat aktivitu odlišnou, způsobovat vedlejší účinky, působit jako antagonist a či způsobovat toxicitu [7,8].

Zvláště fatálním případem odlišné aktivity enantiomerů a jejich toxicity byla v polovině 20. století thalidomidová aféra, kdy byl lék thalidomid podáván těhotným ženám jako sedativum. Užívání thalidomidu vedlo k závažným malformacím embryí, které byly způsobené teratogenním působením (*S*)-enantiomeru. Jelikož je (*S*)-enantiomer v lidském těle racemizován, nelze vyloučit teratogenní působení ani při podání neškodného (*R*)-enantiomeru (Obrázek č.3) [6,9].



Obrázek č.3 Struktura thalidomidu, převzato a upraveno z [9]

Z důvodu zvyšujících se požadavků na bezpečnost a účinnost léčiv vydala FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA) v roce 1992 pokyny pro přísnější hodnocení jednotlivých enantiomerů a pro vývoj nových chirálních léčiv, které upřednostňují přípravu enantiomerně čistých sloučenin oproti racemátům [6,8,10]. V důsledku těchto nařízení se farmaceutické firmy začaly zabývat takzvaným chiral-switchingem. Tento pojem byl zaveden Agranatem a Canerem v roce 1999 [11] a vyjadřuje vznik enantiomerně čisté látky z chirálního léčiva, které bylo dříve vyvinuto jako racemát nebo směs diastereoizomerů. Příklady léčiv, u kterých byl proveden chiral-switching zobrazuje Tabulka č. 1. Potenciálními výhodami zavedení chiral-switchingu jsou [12]:

- a) Lepší terapeutický index z důvodu zvýšené účinnosti a selektivity a snížení počtu vedlejších účinků
- b) Snížená tendence vzniku lékových interakcí
- c) Rychlejší nástup účinku
- d) Redukce dávky

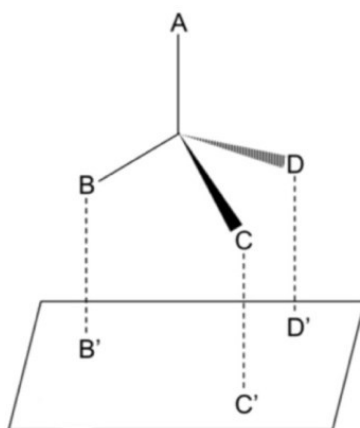
Nesteroidní protizánětlivé léčivo ibuprofen bylo jako první z této skupiny převedeno na enantiomerně čistou verzi. Důvodem byl důkaz více než stonásobné aktivity (*S*)-enantiomeru jako inhibitoru enzymu cyklooxygenázy 1 oproti (*R*)-enantiomeru [12]. V některých případech může samostatná studie enantiomerní aktivity odhalit také nové biologické působení. Příkladem tohoto jevu je (*S*)-fluoxetin vykazující terapeutické účinky v prevenci migrény, zatímco u racemického léku se tyto účinky nevyskytují [7]. Přítomnost obou enantiomerů v racemické směsi může být ovšem v některých případech prospěšná, to lze vysvětlit farmakodynamickými či farmakokinetickými interakcemi mezi párem enantiomerů, jejichž následkem je prevence toxicity jednoho enantiomeru enantiomerem druhým. Příkladem je molekula labetalolu, jejíž izomer dilevalol byl stažen z trhu z důvodu zvýšené hepatotoxicity ve srovnání s jeho racemickou směsí [6]. Ačkoliv ne vždy přinese použití čistého enantiomeru terapeutický přínos, počet nových stereochemických léčiv patentovaných v poslední době stále roste [7].

Tabulka č.1 Příklady léčiv a jejich chiral-switchingu [6]

Léčivo	Enantiomer	Stereochemie	Působení enantiomeru
ofloxacin	levofloxacin	(<i>S</i>) (-) -ofloxacin	antibakteriální
ibuprofen	dexibuprofen	(<i>S</i>) (+) - ibuprofen	protizánětlivé
ketoprofen	dexketoprofen	(<i>S</i>) (-) -ketoprofen	protizánětlivé
omeprazol	esomeprazol	(<i>S</i>) (-) -omeprazol	inhibitor protonové pumpy
cetirizin	levocetirizin	(<i>R</i>) (-) - cetirizin	H-1 antihistaminikum
citalopram	escitalopram	(<i>S</i>) (+) - citalopram	antidepresivum (SSRI)

2.1.3 Mechanismus chirální separace

Mechanismus chirální separace lze popsat pomocí modelu třibodové interakce, který byl poprvé představen v roce 1933 Easonem a Stedmanem [13]. V původní interpretaci tohoto modelu bylo uvedeno, že pro úspěšné chirální rozpoznávání jsou vyžadovány alespoň tři na konfiguraci závislé, přitažlivé interakce mezi chirálním selektorem a chirálním substrátem (Obrázek č.4). Mnohdy byl ovšem opomíjen čtvrtý požadavek týkající se přístupnosti k receptoru, který je často přístupný pouze z jedné strany [14]. Ačkoliv je v dnešní době již známo že na enantioseparaci se podílejí jak síly přitažlivé, tak odpudivé, tento model je pro svůj příznivě ilustrační charakter stále používán [1,2,15]. Molekulární interakce uplatňující se v enantioseparaci popisuje Tabulka č. 2. Chirální separace enantiomerů probíhá za tvorby reverzibilních diastereoizomerních komplexů (přímá metoda) nebo ireverzibilních diastereoizomerů (nepřímá metoda) [1].



Obrázek č. 4 Třibodový interakční model chirální separace, převzato a upraveno z [16]

Tabulka č .2 Typy interakcí v chirální separaci [17]

typ interakce	charakter interakce	síla interakce
coulombické síly	přitažlivé i odpudivé	velmi silné
vodíková vazba	přitažlivá	velmi silná
stérické stínění	repulzní	velmi silné
π-π	přitažlivé	silné
ion-dipól	přitažlivé	silné
dipól-dipól	přitažlivé	střední
dipól-indukovaný dipól	přitažlivé	slabé
disperzní interakce	přitažlivé	slabé

2.1.4 Přímá metoda chirální separace

Při přímé metodě dochází k tvorbě přechodných diastereoizomerních komplexů mezi enantiomery a chirálním selektorem, které se liší stabilitou. Pro provedení přímé separace existují dva různé způsoby. První způsob využívá chirálních aditiv mobilní fáze (CMPA, chiral mobile-phase-additive mode). Při této metodě dochází ke tvorbě diastereoizomerních komplexů přímo v mobilní fázi a je možné použít achirální stacionární fáze. Uplatnění této metody v HPLC je omezeno nižší selektivitou, chirální čistotou selektoru, vznikem systémových píků a inkompatibilitou chirálních aditiv s určitými detektory. CMPA je však metodou volby pro separaci enantiomerů pomocí kapilární elektroforézy. Druhým a v současné době preferovaným způsobem přímé separace je použití chirálních stacionárních fází (CSP). Chirální selektory mohou být na chromatografický nosič fyzikálně adsorbované či kovalentně vázané. Mobilní fáze při využití CSP je achirální. Diastereoizomerní komplexy vznikají při migraci analytu kolonou, kde jsou jednotlivé enantiomery zadržovány za použití vhodné CSP. Tento způsob je využíván pro analytickou i preparativní separaci, nevýhodou jsou ovšem vysoké investice na pořízení kolon [1,15,17]. Nejčastěji používané typy CSP jsou popsány v kapitole 2.3.

2.1.5 Nepřímá metoda chirální separace

Druhým způsobem chirální separace je metoda nepřímá neboli chirální derivatizace. Principem této metody je tvorba diastereoizomerů, vznikajících reakcí analytu (X) v *R* či *S* konfiguraci a opticky čistého derivatizačního činidla (CDR) [1].



Diastereoizomery lze následně separovat pomocí achirální chromatografie v reverzním módu. Výhodou nepřímé metody je nepotřebnost finančně náročných chirálních stacionárních fází, což je ovšem kompenzováno vyšší časovou náročností a pracností této metody [1,2,18].

2.1.6 Reverzní mód v chirální HPLC

Za použití klasického reverzního módu (RP) je vyžadováno použití mobilní fáze (MF) vodné či pufrované, zpravidla ve směsi s acetonitrilem nebo s vodou mísitelnými alkoholy (methanol, ethanol). Jako aditiva upravující iontovou sílu či jako pufrů se využívají látky z řad anorganických (sírany, fosforečnany, chloristany) nebo organických (octany, citronany). Interakce působící v reverzním módu jsou vodíkové vazby, iontové reakce, hydrofóbní vazby, vazby dipól-dipól, inkluze, π - π a stérické interakce. MF složené z organického rozpouštědla a pufru mají vliv na vznik vodíkových vazeb, π - π interakcí, vazby dipól-dipól, stérických a hydrofobních interakcí mezi analyzovanou látkou a chirální stacionární fází. Retenci analytu lze ovlivnit pomocí změny poměru organického modifikátoru. Použitím acetonitrilu jako organické složky MF na místo methanolu je obvykle dosaženo vyšší eluční síly. Při úpravě pH MF lze kromě retence ovlivnit i selektivitu enantioseparace. Z těchto důvodů je výsledek separace nejčastěji korigován úpravou pH či změnou organického modifikátoru. Při separaci analytů o kyselém charakteru jsou používány kyselé MF, které brání disociaci analytů a vzniku iontových interakcí s povrchem nosiče SF. Bazické analyty je nutné analyzovat s využitím MF o $\text{pH} > 7$ [17].

2.1.7 Polárně-organický mód v chirální HPLC

V polárně-organickém módu (PO) je MF složena ze směsi organických rozpouštědel (methanol, acetonitril) s přidavkem organické kyseliny (kyselina octová, mravenčí, trifluoroctová) a zásady (triethylamin, diethylamin, ethylendiamin). Selektivita je dána interakcemi mezi stanovovaným analytem a CSP. Na chirální separaci se podílejí vodíkové vazby, π - π interakce, iontové interakce a stérické interakce. Při tomto módu je možné snadno uskutečnit detekci s využitím hmotnostní spektrometrie [17].

2.1.8 Normální mód v chirální HPLC

Při využití normálního módu (NP) obsahuje MF nepolární organická rozpouštědla (pentan, hexan, heptan) a modifikátory MF (alkoholy, acetonitril, ethery, chlorované uhlovodíky). Nejčastěji používanou směsí je směs *n*-alkanů (heptan, hexan) s přidavkem nižších alkoholů (ethanol). V případě separace bazických či kyselých analytů se používá přídavek aminů (triethylamin) či kyselin (octová, trifluoroctová) v množství 0,01-1,0 % [17].

Na retenci, rozlišení a selektivitu má významný vliv koncentrace a druh alkoholu v MF. Hodnoty retence a rozlišení se obvykle snižují se zvyšující se koncentrací alkoholu v MF. Stereoselektivita separace je ovlivněna strukturou modifikátoru MF a stericnými efekty mezi analytem a CSP. Proces separace je zde uskutečňován dipólovými a π - π interakcemi. Společně s polárně-organickým módem je normální mód vhodný zejména pro separaci neutrálních molekul [17].

2.1.9 Superkritická fluidní chromatografie v chirálních separacích

Alternativní technikou k HPLC pro enantioseparaci léčiv se v posledních letech stala superkritická fluidní chromatografie (SFC, supercritical fluid chromatography). Oproti HPLC v normálním módu poskytuje SFC díky své vyšší difuzivitě a nižší viskozitě až pětikrát rychlejší separace. SFC využívá jako MF superkritickou či téměř superkritickou tekutinu, nejčastěji CO₂. Výhodami použití CO₂ je nehořlavost, nízká cena, a především šetrnost k životnímu prostředí. Pro eluci polárních látek jsou využívány polární pomocná rozpouštědla (methanol, ethanol, acetonitril). Do pomocného rozpouštědla se dále pro zvýšení účinnosti přidávají aditiva, například kyselina trifluoroctová či isopropylamin. Pro chirální separace v SFC se využívá metoda přímé separace s využitím CSP. Tato metoda je používána jak pro analytickou, tak pro preparativní separaci enantiomerů [19,20].

2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

2.2.1 Úvod

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je v dnešní době jednou z nejrozšířenějších analytických separačních metod. Hlavní předností této metody je možnost současné kvalitativní i kvantitativní analýzy separovaných látek, vysoká selektivita a vysoká citlivost. Pro analýzu pomocí HPLC stačí pouze malé objemy vzorků a s pomocí automatického dávkovače (autosampleru) je možné metodu zcela automatizovat [16]. Jednotlivé analyty jsou charakterizovány signály (píky), které jsou vyobrazeny v grafickém záznamu separace – chromatogramu [17].

2.2.2 Princip chromatografie a vybrané chromatografické charakteristiky

Princip chromatografické metody je založen na ustanovování rovnováhy analyzovaných látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi – stacionární a mobilní. Stacionární fáze (SF) je tvořena tuhou či kapalnou látkou a je umístěna ve formě sorbentu v chromatografické koloně, kde probíhá separace. MF je kapalina protékající kolonou, která je do chromatografického systému přiváděna pomocí vysokotlakého čerpadla. Analyty s vyšší afinitou ke SF jsou více zadržovány a eluují se později než analyty s nižší afinitou ke SF. Eluci lze provést pomocí MF o konstantním složení (isokratická eluce) či využitím MF o měnícím se složení (gradientová eluce). Použití isokratické eluce je vhodné v případě látek o podobných fyzikálně-chemických vlastnostech, v případě rozdílných vlastností se využívá eluce gradientová [17].

Retenční čas (t_R) je kvalitativní veličinou označující dobu od nástřiku vzorku na kolonu po dosažení maxima píku. Míru afinity analytu ke SF určuje retenční faktor (k). Jedná se o bezrozměrnou veličinu a vypočítá se dle Vzorce č.1, kde t_0 je mrtvý retenční čas [17,21]. Mrtvým časem rozumíme čas, který je potřeba pro eluci nezadržované látky [22].

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

Vzorec. č. 1 Vzorec pro výpočet retenčního faktoru

Čas, který analyt stráví ve stacionární fázi je označován jako redukovaný retenční čas t'_R . Vypočítá se dle Vzorce č.2 odečtením mrtvého času od retenčního času [17].

$$t'_R = t_R - t_0$$

Vzorec č.2 Vzorec pro výpočet redukovaného retenčního času

Distribuce analytů mezi SF a MF je vyjádřena pomocí distribuční (rozdělovací) konstanty K_D , kde c_s je koncentrace analytu ve SF a c_m je koncentrace analytu v MF (Vzorec. č.3). Čím vyšší je hodnota distribuční konstanty, tím větší je afinita analytu ke stacionární fázi a tím větší je retenční faktor [17].

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

Vzorec č.3 Vzorec pro výpočet distribuční konstanty

Schopnost rozdělení dvou látek je popisována selektivitou. Tato veličina se dle Vzorce č.4 vypočítá poměrem retenčních faktorů k_1 a k_2 , či poměrem redukovaných retenčních časů separovaných látek. Separace roste se zvyšující se selektivitou a pro rozdělení analytů je nutná hodnota vyšší než 1 [17,23].

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

Vzorec č.4 Vzorec pro výpočet selektivity

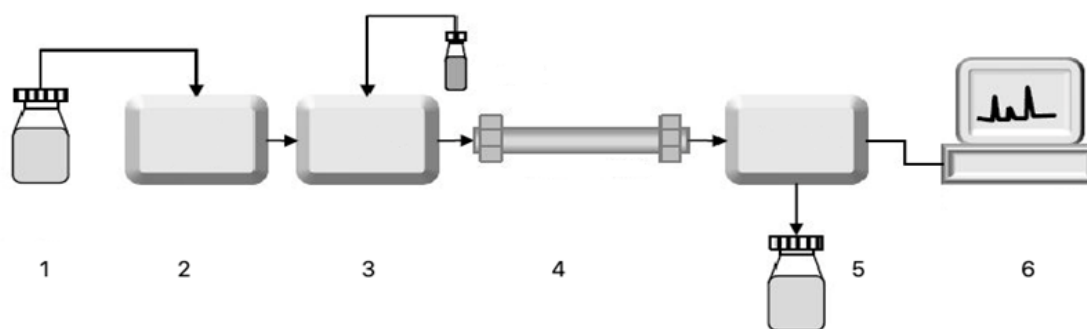
Veličina, která popisuje separaci píků je rozlišení. Rozlišení patří mezi bezrozměrné veličiny a vypočítá se dle Vzorce č. 5 jako podíl rozdílu retenčních časů (t_R) a součtu šířek píků v polovině výšky (w_h). Míra separace je pomocí rozlišení charakterizována lépe než v případě selektivity, protože zahrnuje ve výpočtu i šířky píku [17, 22].

$$R = 1,18 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_1 + w_2}$$

Vzorec č.5 Vzorec pro výpočet rozlišení

2.2.3 Instrumentace

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf se skládá z několika částí, které znázorňuje schéma na Obrázku č.5. Mobilní fáze je čerpána ze zásobníků (1) pomocí vysokotlakého čerpadla (2). Vzorky jsou nastříkovány na kolonu ručně či automaticky za pomoci dávkovače (3). Automatické dávkovače jsou v dnešní době preferovány především pro urychlení pracovního procesu a vyšší reprodukovatelnost dávkovaného objemu. MF se vzorky prochází kolonou (4) kde dochází k separaci směsi a jednotlivé látky jsou detekovány pomocí vhodného detektoru (5). V současné době se používá mnoho typů detektorů, například spektrofotometrické či hmotnostní. Signál z detektoru je pomocí chromatografického softwaru v PC (6) převeden na příslušný chromatogram [17].



Obrázek č.5 Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu
(1-zásobníky MF, 2-vysokotlaké čerpadlo, 3-dávkovací zařízení, 4-kolona, 5-detektor,
6-PC pro vyhodnocení dat), převzato a upraveno z [24]

2.3 Chirální stacionární fáze

Pro úspěšnou chirální separaci je klíčový správný výběr chirální stacionární fáze. Volba selektoru se odvíjí od preferovaného mechanismu separace, separačního módu a vlastností stanovovaného analytu. Chirální selektory lze rozdělit dle původu na přírodní, semisyntetické a syntetické, přičemž nejvíce používané jsou CSP semisyntetické a syntetické [17]. V Tabulce č.3 jsou uvedeny nejpoužívanější typy CSP.

Tabulka č.3 Přehled nejvíce používaných CSP, druhů interakcí, separačních podmínek a typů analytů [1, 17, 25, 26, 27, 28, 29]

CSP	Stanovovaný analyt	Typy interakcí	Separací mód
Polysacharidy	objemná skupina v blízkosti chirálního centra	vodíkové můstky, π - π interakce, dipól-dipól, Van der Waalovy síly, sterické, inkluzivní komplexy	NP, RP, PO
Chinidiny	kyselé chirální látky, N-derivatizované aminoskupiny	vodíkové vazby, vazby dipól-dipól, π - π interakce, Van der Waalovy síly, sterické vlivy	NP, RP, PO
Cyklodextriny	planární skupina, aromatická skupina	vodíkové můstky, inkluzivní komplexy	NP, RP, PO
Cyklofruktany	primární aminoskupina, aromatická skupina	vodíkové můstky	NP, RP, PO
Crown-ethery	primární aminoskupina	vodíkové můstky, inkluzivní komplexy	NP, RP, PO
Donor-akceptorové (Pirklovy)	objemná skupina v blízkosti chirálního centra, skupina poskytující vodíkové můstky, aromatická skupina	vodíkové můstky, π - π interakce, dipól-dipól	NP
Makrocyclická ATB	objemná skupina v blízkosti chirálního centra, skupina poskytující vodíkové můstky	vodíkové můstky, π - π interakce, dipól-dipól, ion-dipól, iontové interakce, hydrofóbní vazby, sterické efekty	NP, RP, PO
Ligand-výměnné	dvě až tři elektron donorové funkční skupiny v analytu	koordinací vazby	NP, RP, PO
Proteinové	ionizovatelná skupina, aromatický kruh	hydrofóbní interakce, elektrostatické interakce	RP

2.3.1 Polysacharidové CSP

Nejčastěji používanými zástupci polysacharidů pro CSP jsou celulóza a amyulóza. Celulóza je polymer s lineární strukturou tvořenou D-(+) glukózovými jednotkami spojenými β -1,4-glykosidickou vazbou. Struktura amyulózy je helikální s D-(+) glukózovými jednotkami navzájem spojenými α -1,4-glykosidickou vazbou (Obrázek č.6) [25, 26]. Spirálovité uspořádání jednotek ve struktuře amyulózy poskytuje více chirálních center pro rozlišení enantiomerů, díky tomu je dosaženo lepších výsledků separace pomocí amyulózy [25].

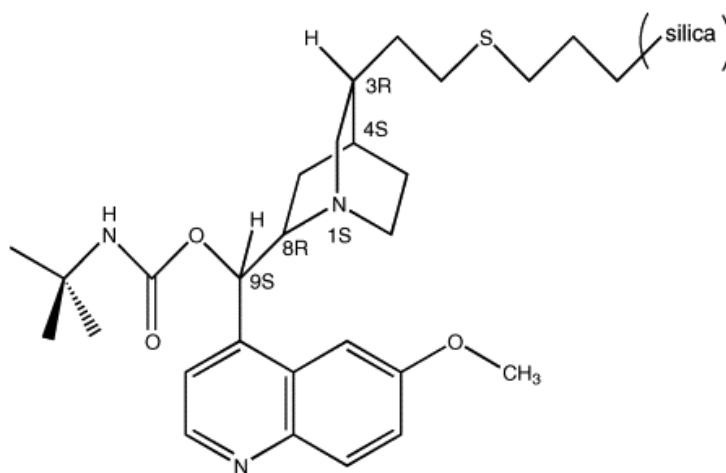


Obrázek č.6 Struktura derivátů celulózy (vlevo) a amyulózy (vpravo), převzato a upraveno z [30]

Při použití přírodních polysacharidů je problémem jejich nízká selektivita. Z tohoto důvodu se pro chirální separaci používají polysacharidové deriváty, především karbamáty a estery [1]. Nejlepších výsledků separace bylo dosaženo za použití 3,5-dimethylfenylkarbamátů [26]. Polysacharidové CSP mohou být na povrchu nosiče nanášené (tzv. coating) či kovalentně navázané (imobilizované). Nevýhodou použití selektorů nanášených na nosič je nižší tepelná stabilita kolon a rozpouštění polymerní vrstvy při nesprávném výběru rozpouštědla MF. Stabilitu těchto CSP lze zvýšit imobilizací selektoru [31]. Častým problémem imobilizovaných selektorů je ovšem jejich snížená chirální rozpoznávací schopnost. Nižší schopnost enantioseparace je způsobená narušením pravidelné struktury polysacharidu imobilizací [32]. U některých analytů byla při použití imobilizovaného selektoru (tris(3-chlor-5-methylfenylkarbamát) amyulózy) pozorována změna v pořadí eluce enantiomerů, příkladem takových látek je ketoprofen [31] či naproxen [33]. Stacionární fáze na bázi polysacharidů patří mezi nejpoužívanější CSP díky jejich vysoké separační schopnosti širokého spektra analytů [30].

2.3.2 Chidininové/Chininové CSP

Chinidinové CSP jsou tvořené karbamáty chininu a chinidinu, kovalentně imobilizovanými na silikagel. Chinin a chinidin jsou sloučeniny obsahující planární chinolin a rigidní kruh chinuklidinu, které jsou spojeny pomocí sekundárního, methyl-alkoholového můstku (Obrázek č.7). Struktura s pěti stereogenními centry může poskytnout velmi dobrý základ pro chirální rozpoznávání analytů [34]. Vysoce bazická terciální aminoskupina v chinuklidinovém kruhu je za použití slabě kyselých MF protonována a stává se iontoměničovým místem [27,35]. Je zde tak přítomen retenční mechanismus iontové výměny pro separaci kyselých chirálních látek, jako například N-derivatizovaných aminokyselin, α -aryloxyalkylkarboxylových a α -arylalkylkarboxylových kyselin. Pro separaci N-derivatizovaných aminokyselin jsou výhodné především CSP založené na chirálních selektorech s objemnými substituenty na karbamátové funkci, zatímco u α -aryloxyalkylkarboxylových a α -arylalkylkarboxylových kyselin je dosaženo vyšší enantioselektivity při CSP s aromatickými karbamátovými substituenty. Pro mechanismus iontové výměny je nezbytná ionizace kyselých funkčních skupin chirálních analytů, ta zajišťuje interakci s kladně nabitou chinuklidinovou částí chirálního selektoru. Z tohoto důvodu mohou být CSP chinidinového typu klasifikovány jako slabé chirální anxy [27]. Slabá povaha iontoměniče umožňuje použití všech separačních módů, separace kyselých analytů byla však prováděna především za využití polárně-organického módu [35,36]. Při normální fázi se tyto selektory chovají jako Pirklovy CSP, jenž jsou popisovány v kapitole 2.3.6. [34,37].



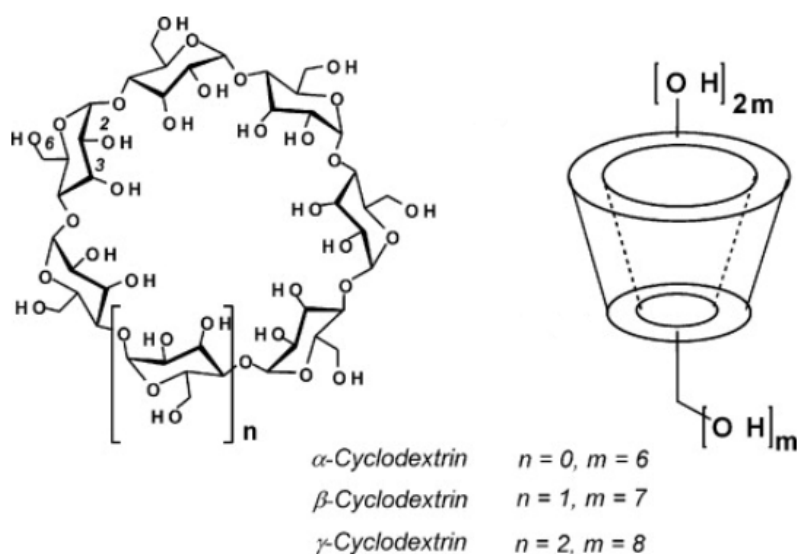
Obrázek č.7 Struktura chirálního selektoru chinidinkarbámatu [38]

Povrch chinidinových selektorů CSP, přesněji chininikarbamátových derivátů, je složen z vysokoenergetických enantioselektivních a nízkoenergetických neselektivních adsorpčních míst. Chirální separace je možná především díky silným interakcím mezi chirálním analytem a selektivními místy, o síle podobné polárním či vodíkovým interakcím. Počet neselektivních míst je značně vyšší než selektivních, to vysvětluje poměrně nízkou hodnotu selektivity. Určité množství chirálních center může působit jako neselektivní místa v závislosti na typu a složení MF [38, 39]. Specifická vlastnost chininu a chinidinu jsou jejich kvazi-enantiomerní vlastnosti, díky nimž jsou často označovány jako „pseudo-enantiomery“. Tato vlastnost se může projevit opačným pořadím eluce jednotlivých enantiomerů, což může být výhodné například při stopové analýze [34].

2.3.3 Cyklodextrinové CSP

Cyklodextriny jsou skupinou cyklických oligosacharidů, které byly izolovány jako degradační produkt škrobu. Škrob je rozkládán hydrolyzou pomocí enzymu cyklodextringlykosyltransferázy, který je produkován různými skupinami bakterií. Cyklodextriny jsou tvořeny glukózovými jednotkami, které jsou navzájem spojeny α -1,4-glykosidickými vazbami. Spojením glukózových jednotek vzniká struktura svým tvarem připomínající komolý kužel (kavitu) (Obrázek č.8). Vnitřní část kavity je lipofilního charakteru a vnější část je hydrofilní z důvodu přítomnosti volných hydroxylových skupin na širším i užším okraji její struktury. Hydroxylové skupiny mohou být derivatizovány za vzniku etherů, esterů či karbamátů, čímž je možno měnit chemicko-fyzikální vlastnosti, rozpustnost i samotnou chirální diskriminaci cyklodextrinů. Chirální separace v reverzní fázi probíhá za tvorby inkluzního komplexu, kdy molekula analytu vstupuje alespoň částečně do cyklodextrinového kruhu. Tento děj se nejčastěji uskutečňuje ve vodě či ve směsi vody s jiným polárním rozpouštědlem. Analyt je uvnitř kavity stabilizován přítomností disperzních, van der Waalsových či vodíkových vazeb [1,17,26].

Dle počtu glukózových jednotek od sebe můžeme rozlišit tři nejvýznamnější zástupce této skupiny. α -cyklodextrin obsahuje šest glukózových jednotek, β -cyklodextrin sedm jednotek a γ -cyklodextrin je látka s osmi jednotkami. Výběr cyklodextrinů o vhodné velikosti je klíčový pro vznik inkluzního komplexu a následnou separaci daného analytu. Pro separaci molekul obsahujících jeden cyklus je používán α -cyklodextrin, substituovaná fenylová a naftalenová jádra jsou separována pomocí β -cyklodextrinů a separace objemných molekul (např. steroidů) probíhá s využitím γ -cyklodextrinů [1,26].

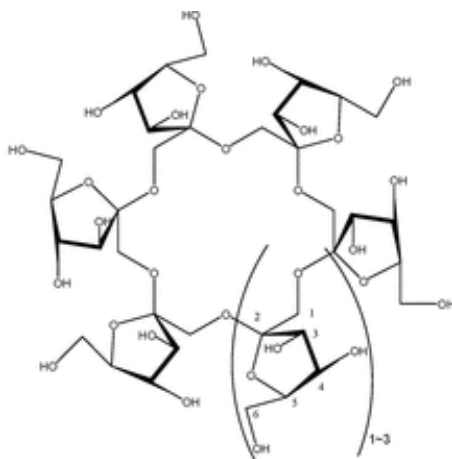


Obrázek č. 8 Struktura cyklodextrinů a odvozených CSP, převzato a upraveno z [15]

2.3.4 Cyklofruktanové CSP

Cyklofruktany jsou sloučeniny produkované působením aktivního enzymu cykloinulo-oligosacharidové fruktanotransferázy či fermentací inulinu pomocí specifických organismů [26,40]. Jedná se o cyklické látky ze skupiny oligosacharidů, které jsou tvořeny z šesti nebo sedmi $\beta(2 \rightarrow 1)$ vázaných D-fruktofuranózových jednotek (Obrázek č.9). Počet jednotek fruktózy v molekule je označován zkratkami CF6, CF7 a CF8. Enantiosektivita je zpravidla vyšší u derivatizovaných než u nativních cyklofruktanů. Chirální separace probíhá za tvorby komplexů, jenž jsou formovány pomocí vodíkových vazeb, dipól-dipól, ion-dipól a π - π interakcí [26,29].

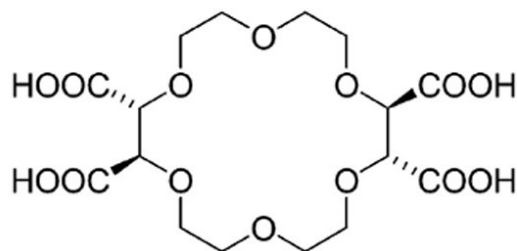
Hlavní předností těchto CSP je jejich schopnost separovat analyty kyselé, bazické i neutrální povahy. Zvláště výhodné je využití alifaticky substituovaných derivátů CF6 pro separaci primárních aminů [26,29].



Obrázek č. 9 Struktura cyklofruktanu, převzato a upraveno z [40]

2.3.5 Crown-etherové CSP

Crown-ethery jsou skupinou synteticky připravených makrocyclických polyetherů, v jejichž struktuře nacházíme ethylenoxidové můstky ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$). Dle počtu těchto můstků se následně odvíjí velikost výsledné molekuly (Obrázek č.10). Nativní crown-ethery jsou samy o sobě achirální sloučeniny. Chirální vlastnosti získávají až díky zavedení chirální molekuly do jejich struktury. Často používané chirální molekuly jsou například kyselina vinná či 1,1'-binaftyl. Crown-etherové CSP jsou využívány především pro jejich schopnost separovat enantiomery obsahující primární aminoskupinu. Enantiomery α -aminokyselin a primárních aminů jsou obvykle separovány pomocí etherů obsahujících 1,1'-binaftyl. Sloučeniny obsahující kyselinu vinnou jsou využívány pro enantioseparaci primárních a sekundárních aminosloučenin, či u sloučenin které ve své struktuře aminoskupinu neobsahují. Pro separaci je podstatné kyselá pH mobilní fáze (1-3,5), kdy mezi protonizovaným primárním aminem a volnými elektronovými páry etherových kyslíků dochází k tvorbě vodíkových můstků a diastereoizomerního komplexu [1,17,29,41].



Obrázek č.10 Struktura crown-etherů, převzato a upraveno z [42]

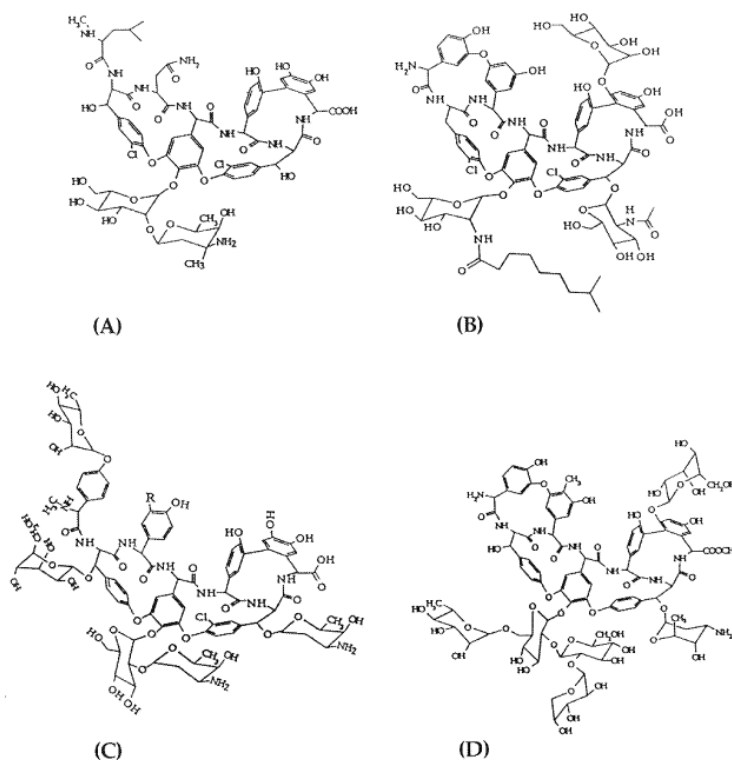
2.3.6 Donor-akceptorové (Pirklovy) CSP

Donor-akceptorové CSP jsou známé taktéž pod názvem brush-type selektory či Pirklovy selektory. Základem donor-akceptorových CSP jsou nízkomolekulární, neutrální, syntetické, chirální molekuly. Tato skupina je charakteristická přítomností π -donorových (př. naftalenový kruh) a π -akceptorových skupin (př. dinitrofenylový kruh), pomocí kterých dochází k tvorbě donor-akceptorových vazeb. Z důvodu důležitosti těchto interakcí je separace prováděna s výhodou za normálního módu. Charakteristickým je pro tyto selektory princip reciprocity, podle které jsou funkce selektoru a analytu zaměnitelné (pokud je chirální selektor A schopen separovat analyt B, pak analyt B je schopen separovat enantiomery látky A) [1,29]. Výhodou použití tohoto typu CSP je jejich kompatibilita se širokou škálou rozpouštědel používaných jako MF a vysoká teplotní stabilita [29].

2.3.7 Makrocyclické ATB

Zástupci makrocyclických antibiotik se dělí dle jejich struktur do čtyř skupin: ansamyciny, polypeptidy, glykopeptidy a aminoglykosidy. Pro chirální separace se nejčastěji využívají makrocyclická antibiotika ze skupiny glykopeptidů – teikoplanin, avoparcin, vankomycin a ristocetin A [29,43]. Struktura glykopeptidických selektorů je tvořena aglykonovým “košíkem“ skládajícím se z makrocyclického kruhu a peptidického řetězce, s různým počtem navázaných sacharidových jednotek [17]. Sacharidové jednotky připojené k aglykonovému “košíku“ mohou volně rotovat a zaujímat tak různé orientace [29,43]. Zatímco teikoplanin a ristocetin A obsahují čtyři makrocykly, vankomycin má ve své struktuře pouze tři makrocykly (Obrázek č.11) [17].

Díky vysokému počtu funkčních skupin ve struktuře těchto látek existuje vysoká pravděpodobnost tvorby přechodných diastereomerních komplexů a následná chirální separace analytů [17]. Chromatografickým nosičem tohoto typu CSP je převážně silikagel a lze při jejich použití pracovat ve všech režimech chromatografické eluce. Nejčastěji se ale díky vyšší účinnosti používá reverzní a polárně-organický režim [1]. Jelikož struktura glykopeptidů obsahuje vysoký počet chirálních center a ionizovatelných skupin, k interakcím s analytem dochází pomocí mnoha mechanismů [17,26].



Obrázek č.11 Chemické struktury makrocyclických antibiotik: vankomycin (A), teikoplanin (B), avoparcin (C), ristocetin (D) [43]

2.3.8 Ligand-výměnné (a iontově výměnné) CSP

Chirální separace ligandové výměny je založena na tvorbě ternárních koordinačních komplexů mezi chirálními funkčními ligandy a centrálním kovovým iontem (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}). Výsledné komplexy jsou stabilizovány pomocí dipól-dipól, sterických a vodíkových vazeb. Tento druh separace je omezen na analyty s nejméně dvěma elektron poskyujícími skupinami, jako jsou látky ze skupiny aminokyselin, hydroxykyselin a aminoalkoholů [15,17,26].

Pro separaci se používá CSP nebo MF s přidavkem chirálního selektoru a centrálního kovového iontu [15,17,26]. Mezi tyto CSP řadíme např. *N,N*-dimethyl-L-fenylalanin, L-hydroxyprolin a L-leucin [17]. Nejčastěji separované látky na tomto druhu CPS jsou α -aminokyseliny a α -hydroxykarboxylové kyseliny [15].

2.3.9 Proteinové CSP

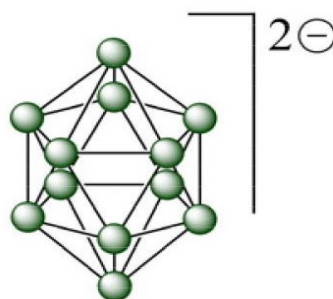
Proteiny jsou makromolekulární látky s přirozenou stereoselektivitou a velkým povrchem obsahujícím řadu stereogenních center a vazebných míst. Pro separaci kyselých i neutrálních látek je používán α -kyselý glykoprotein a surový ovomukoid, cellobiohydroláza je preferována u bazických analytů a lidský sérový albumin pro separaci kyselých analytů. Měření pomocí proteinových CSP vyžaduje použití reverzního módu, opatrnost ohledně teploty, pH a množství organického rozpouštědla v MF. Všechny tyto aspekty mohou způsobit nevratnou denaturaci proteinů či negativně ovlivnit separační schopnosti kolony. Výhodou proteinových CSP je kompatibilita s hmotnostní spektrometrickou detekcí za použití vodných či vodno-organických MF [1,15,29].

2.4 Klastrové sloučeniny bóru

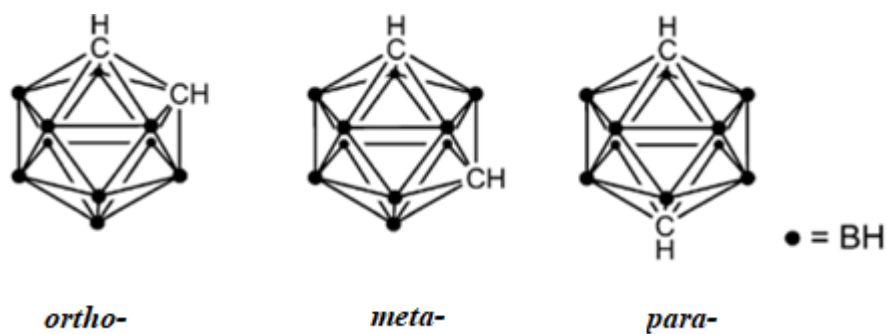
Klastrové sloučeniny bóru (BCC) jsou anorganické, syntetické látky, jejichž specifické vlastnosti jsou již řadu let předmětem zkoumání. Použití těchto látek bylo po dlouhou dobu omezeno pouze na bórovou neutronovou záchytovou terapii, která se využívá v léčbě invazivních maligních nádorů mozku. Omezené využití bylo způsobeno především nedostatečnou znalostí jejich fyzikálních vlastností a komplikovanou chemickou syntézou. Nyní však vědci zkoumají další možnosti využití BCC, především jejich zavedení do molekuly léčiva k modifikaci farmakoforu [44,45].

2.4.1 Vlastnosti

Bór, jakožto hlavní stavební prvek bórových klastrů, se nachází ve 13. skupině periodické soustavy prvků s elektronovou konfigurací $1s^2 2s^2 2p^1$. Na rozdíl od organických sloučenin, jejichž struktury se skládají z řetězců, mají BCC trojrozměrnou polyedrickou klecovitou strukturu [46]. Atomy bóru tvoří tříštrédové vazby, ve kterých tři atomy sdílejí pouze jeden elektronový pár a vzniká tak delokalizovaný záporný náboj, zodpovědný za výslednou aromaticitu sloučenin [47]. Nejjednodušší strukturou BCC je ikosaedrický dodekaborátový anion $(B_{12}H_{12})^{2-}$ který je tvořen pouze atomy bóru a vodíku (Obrázek č.12). BCC skládající se pouze z atomů bóru a vodíku jsou vysoce symetrické molekuly. Pomocí exoskeletární či endoskeletární substituce lze ovšem symetrii narušit, což může vést ke vzniku některých chirálních sloučenin [47,48]. Nejvíce rozšířená je podskupina karboranů, ve kterých je minimálně jeden atom bóru nahrazen atomem uhlíku [46,48]. Karborany se vyskytují ve 3 různých izomerních formách *ortho*-, *meta*-, *para*-, v závislosti na poloze dvou atomů uhlíku v klastru (Obrázek č.13) [46,49,50].

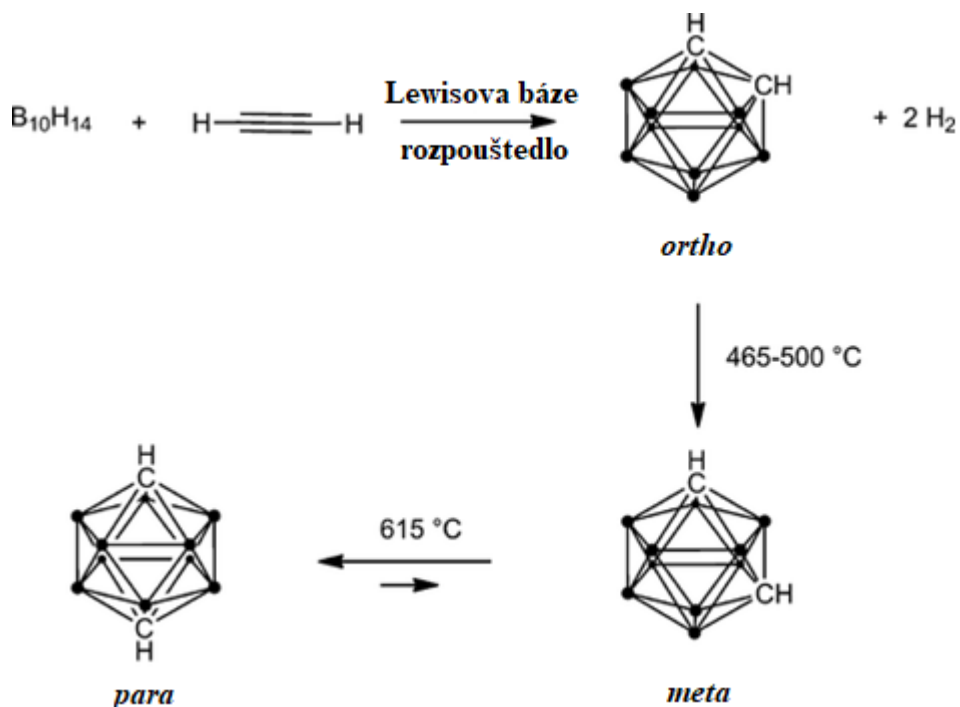


Obrázek č.12 Struktura dodekaborátu $(B_{12}H_{12})^{2-}$, převzato a upraveno z [46]



Obrázek č.13 Izomerní formy sloučenin karboranů, převzato a upraveno z [50]

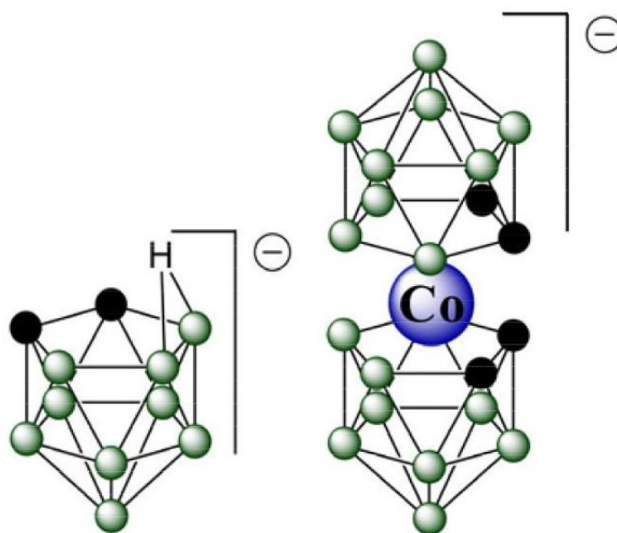
První zástupce karboranů byl syntetizován roku 1963 reakcí dekaboranu s acetylenem v přítomnosti slabé Lewisovy báze za vzniku odpovídajícího *ortho*-karboranu. Tepelnou izomerizací *ortho*-karboranu za inertních podmínek lze získat *meta*- a *para*-karboranové izomery (Obrázek č. 14). Dnes jsou již jednotlivé izomery karboranů komerčně dostupné, což eliminuje používání toxického a výbušného dekaboranu při jejich syntéze v laboratoři [50,51,52].



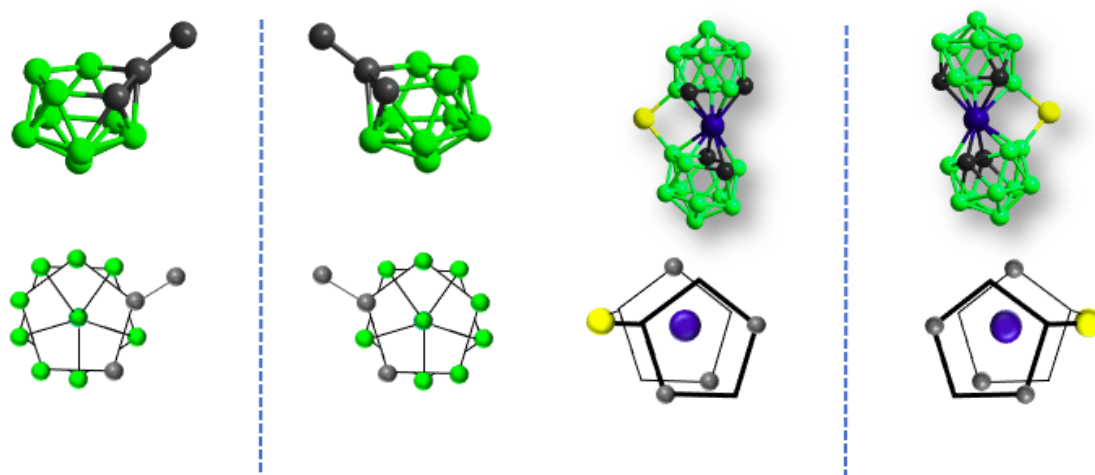
Obrázek č. 14 Syntéza karboranových izomerů, převzato a upraveno z [50]

Počet atomů bóru a delokalizovaných elektronů ve struktuře je zodpovědný za výsledný tvar a velikost BCC [47]. Karborany se dělí dle počtů elektronů v klastru do několika strukturních typů, a to *closo-*, *nido-*, *arachno-*, *hypno-* a *klado-* [47,50,53]. Podrobněji budeme pokračovat ve výčtu vlastností pouze u prvních dvou skupin. Zástupci karboranů se všemi dvanácti vrcholy a „uzavřeným“ uspořádáním jsou označeny předponou *closo-*. Předností *closo*-karboranů je vynikající chemická a tepelná stabilita [47]. Karborany s jedním chybějícím vrcholem jsou označeny předponou *nido-*. *Nido*-karborany jsou anionty se schopností vytvářet komplexy s kovovými kationty zvané metallakarborany (Obrázek č.15). Metallakarborany jsou koordinační sloučeniny skládající se ze dvou *nido*-karboranů a centrálního kovového kationtu. Nejvíce studovaným zástupcem metallakarboranů je 3-kobalt-bis(1,2-dikarbolid) ($[3,3\text{-Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$) obsahující kobaltnatý kationt, zkráceně COSAN⁻ [46].

Chiralitu těchto látek zobrazuje Obrázek č. 16. V případě skupiny *nido*-karboranů je chiralita odvozena z asymetrie klece vyvolané exoskeletární substitucí. Chiralita kobalt (bis)dikarbolidů je způsobena odlišnou polohou dvou *nido*-karboranových klecí v prostoru [54].



Obrázek č.15 Struktury sloučenin *nido*-karboranu ($\text{C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{12})^-$ (vlevo) a metallakarboranu $[\text{Co}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$ (vpravo), převzato a upraveno z [46]



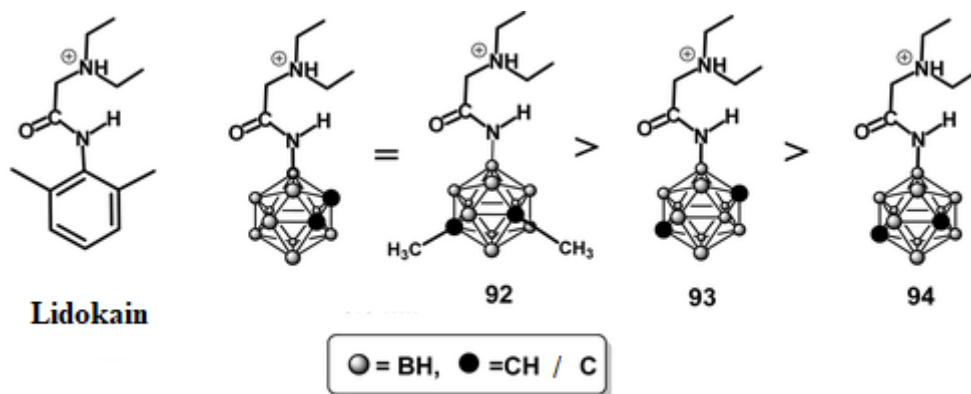
Obrázek č.16 Zobrazení chirální struktury *nido*-karboranů (vlevo) a kobalt (bis)dikarbolidů (vpravo), převzato a upraveno z [54]

Charakteristickou vlastností BCC je jejich acidita. Protony na atomech uhlíku v klastru mají kyselý charakter a mohou být snadno deprotonizovány za vzniku nukleofilů. Acidita závisí na typu izomeru klastru a klesá v pořadí *ortho*-, *meta*-, *para*-. Vysoká acidita CH skupiny v *ortho*-karboranech je daná vyšší elektronegativitou sousedního atomu uhlíku ve srovnání s vrcholy bóru v ostatních izomerech. Z důvodu nízké elektronegativity boru nacházíme v klastrech málo polarizované vazby B-H. Díky této skutečnosti se borohydridy účastní dihydrogenových vazeb na místo vodíkových. Dihydrogenové vazby jsou ovšem slabší než klasické vodíkové vazby, dochází k odpuzování okolních molekul vody a z tohoto důvodu je pozorována hydrofobní povaha BCC [46,48,50,52]. Důvodem vysoké biologické stability BCC je jejich čistě syntetický původ, neexistuje tedy dostatek enzymatických systémů schopných metabolizovat tyto látky [46,48].

2.4.2 Využití

Ikosahedrické karborany jsou nově vznikající skupinou látek s potenciální aplikací při designu moderních léčiv, kdy molekuly karboranů nahrazují fenylovou či heterocyklickou skupinu uvnitř již známého léčiva [55]. K tomuto využití jsou karborany vhodné zejména díky jejich vysoké hydrofobicitě, která je využívána pro navození požadované biologické aktivity a k usnadnění transportu molekul léčiv přes buněčné membrány [44]. Téměř dvojnásobná velikost struktur karboranů oproti fenylové skupině a možnost trojrozměrného připojení substituentů na atomy bóru je činí výhodnějšími při návrhu léčiv oproti benzenovým systémům [50]. Další výhodou aktivních látek na bázi bóru je jejich vysoká biologická stabilita dána jejich abiotickým původem [52].

Příkladem vzniku nových inovativních léčiv je skupina borokainů, která byla vytvořena náhradou dimethylfenylu izomery karboranu v molekule lokálního anestetika lidokainu (Obrázek č.17). U takto vzniklých analogů došlo ke zlepšení a prodloužení anestetických účinků oproti původnímu léčivu. Zvýšená aktivita oproti původnímu léčivu byla pozorována především u analogů 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu a 1,7-dimethyl-1,7-dikarba-*closo*-dodekaboranu [52].

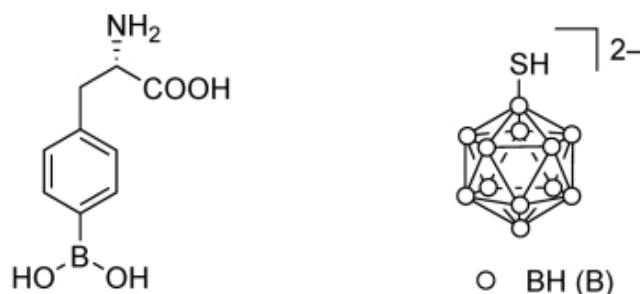


Obrázek č.17 Struktura lidokainu a jeho analogů borokainů, převzato a upraveno z [48]

Deriváty metallakarboranů silně a selektivně inhibují proteázy viru lidské imunodeficiency (HIV), enzymu nezbytného pro životní cyklus HIV. Tyto sloučeniny působí doposud neznámým mechanismem a vykazují účinnost i vůči rezistentním virovým kmenům. Interakce metallakarboranů s aktivním místem enzymu je uskutečněna pomocí nekonvenčních dihydrogenových vazeb [47,56].

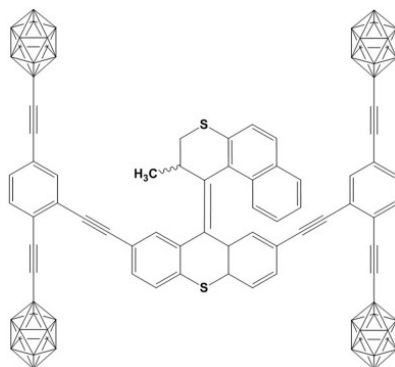
Díky antibiofilmové aktivitě a nízkému předpokladu tvorby lékové rezistence, mají klastrové sloučeniny bóru potenciál také pro využití v antimikrobní terapii. Jako první se antimikrobní aktivitě boranových klastrů věnoval Totani et al., který studoval aktivitu derivátů *ortho*- a *nido*-karboranů. Touto studií byla prokázána aktivita proti gram pozitivním bakteriím a houbám u skupiny hydrofilních derivátů *nido*-karboranů, především u zástupců obsahujících lipofilní alkylové skupiny nebo *o*-karboranovou klec. Mechanismus antimikrobní aktivity boranových klastrů probíhá poškozením buněčné stěny bakterií či inhibicí metabolických drah patogenů [46].

Vznik sloučenin obsahujících karborany byl velmi významný také pro použití v bórové neutronové záchytové terapii (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT). BNCT je radiační metoda pro léčbu rakoviny, zejména neléčitelných maligních nádorů mozku glioblastoma multiforme [56]. Principem BNCT je jaderná štěpná reakce izotopu ^{10}B , který je cíleně dodáván do nádorových buněk a následně ozáren neutrony o vhodné energii. Jádro izotopu ^{10}B absorbuje neutron za vzniku excitovaného jádra ^{11}B , které se rozpadá a emituje částici α ($^4\text{He}^{2+}$) a ion $^7\text{Li}^{3+}$ s vysokou kinetickou energií. Přenos energie těchto silně nabitých částic pak proniká do DNA či RNA nádorových buněk a ničí je. Výhodou BNCT je minimalizace cytotoxicity vůči okolním tkáním, jelikož takto nabitě částice se mohou pohybovat pouze v rozmezí průměru jedné buňky [51]. Pro dosažení úspěšného výsledku léčby musí být BNCT činidla schopna dodat do cílové buňky dostatečné množství ^{10}B , přibližně 20–35 μg na 1 gram nádorové tkáně. Mezi nejčastěji používaná činidla v BNCT se řadí *L*-*para*-dihydroxyborylphenylalanin (BPA) a merkaptoundekahydro-*closo*-dodekaborát disodný (BSH) (Obrázek č.18) [57].



Obrázek č.18 Činidla používaná v BNCT: *L*-*para*-dihydroxyborylphenylalanin (vlevo) a merkaptoundekahydro-*closo*-dodekaborát disodný (vpravo) [57]

Karborany mohou být dále využity pro nahrazení fullerenů při přípravě nanonosičů sloužících ke kontrolovanému transportu léčiv (Obrázek č.19). Použitím karboranů lze vyřešit problém s fotoaktivitou a nízkou rozpustností fullerenových derivátů, která znemožňuje získání čistých produktů. *Para*-karborany, stejně tak jako fullereny, vykazují vysokou sférickou symetrii a aromaticitu. Mezi další výhody karboranů patří schopnost funkcionalizace vrcholů klece [53].



Obrázek č. 19 První nanonosič na bázi karboranu [53]

Komplex $\text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{IV}}$ bis(dikarbolidu) lze využít pro optimalizaci vlastností solárních článků citlivých na barvivo (DSC, dye-sensitized solar cells). Solární články citlivé na barvivo jsou nové potenciální solární zdroje elektrické energie, jejichž výhodou je nízká cena a snadná výroba. Oproti dříve používanému aniontovému redoxnímu páru I^-/I_3^- jsou komplexy $\text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{IV}}$ bis(dikarbolidu) nekorozivní, což významně rozšiřuje možnost výběru barviv a materiálů elektrod. Dalšími výhodnými vlastnostmi komplexu $\text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{IV}}$ bis(dikarbolidu) je rychlost redoxního potenciálu, rychlý transport hmoty a rychlá regenerace barviva [58]. Bórové klastry se využívají také jako luminiscenční materiály pro tvorbu organických světlo emitujících diod (OLED), kdy jsou jejich klecovité struktury zavedeny do komplexu iridia [53].

3 Cíl práce

Cílem této práce je testování vlivu experimentálních podmínek na chirální separaci kobalt bis(dikarbolidů) a 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů s využitím polysacharidových a chinidinových CSP v HPLC. Následně budou kolony porovnány a v případě polysacharidových CSP bude diskutován vliv způsobu navázání chirálního selektoru na stacionární fázi.

4 Experimentální část

4.1 Přístroje, pomůcky, chromatografické kolony a chemikálie

Přístroje:

K chromatografické separaci byl použit kapalinový chromatograf LC 20 A Prominence (Schimadzu, Kyoto, Japonsko), jehož komponenty jsou: odplyňovač (typ DGU 20 A3), dvě vysokotlaká čerpadla (typ LC 20 AD), autosampler (typ SIL-20 AC), řídicí jednotka (typ CMB-20), detektor (typ SPD-M20A), kolonový prostor (typ CTO-20AC) a software LabSolutions 5.3 (Schimadzu, Kyoto, Japonsko).

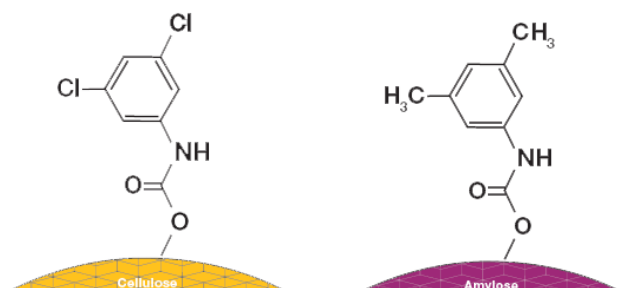
Dále jsme pracovali s acidimetrem (Acidimetr 333, Drupta, Praha, Česká republika), analytickými váhami (Kern, Unipro-Alpha, Praha, Česká republika), spektrofotometrem (UV-2401, Schimadzu, Japonsko), ultrazvukovou lázní (Ecoson, Praha, Česká republika) a vakuovou filtrací (Supelco, USA).

Pomůcky:

laboratorní sklo (odměrné válce, odměrné baňky, kádinky, skleněná tyčinka), pipety, špičky, vialky

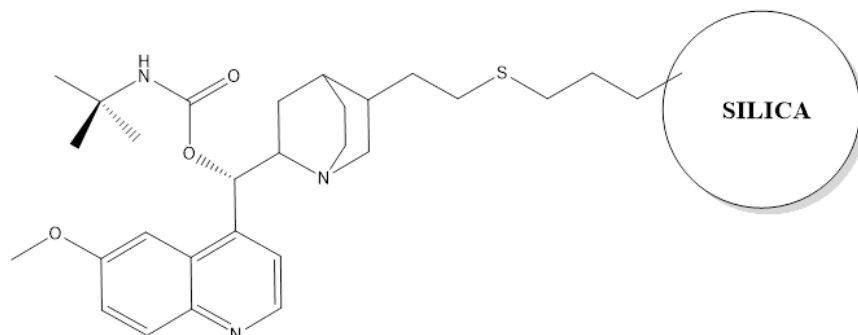
Chromatografické kolony:

Pro enantioseparace bórových klastrů byly použity kolony s polysacharidovými chirálními selektory i-Cellulose-5 (tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulózy, velikost částic 5 μ m, 4.6 x 250 mm) a i-Amylose-1 (tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylozy, velikost částic 5 μ m, 4.6 x 250 mm) (Phenomenex®) (Obrázek č.20).

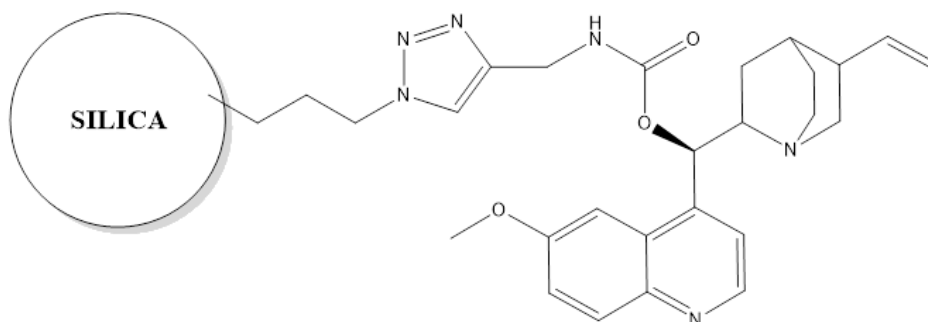


Obrázek č.20 Struktury kolony i-Cellulose-5 (vlevo) a i-Amylose-1 (vpravo), převzato a upraveno z [59]

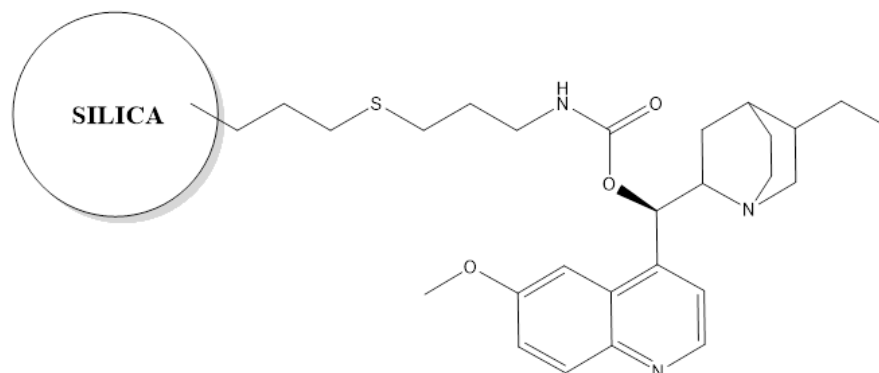
Druhým typem testovaných chirálních selektorů byly chinidinové kolony, poskytnuty doc. Ing. Michalem Kohoutem PhD. (Ústav organické chemie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze). Struktury použitých kolon zobrazují Obrázky č. 21-25.



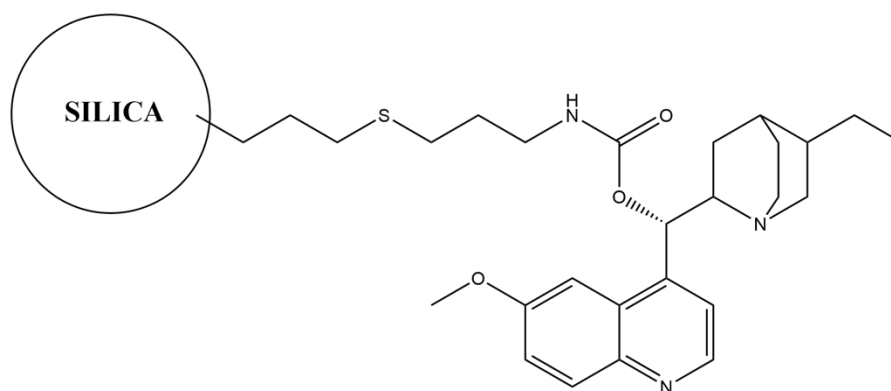
Obrázek č.21 QN AX tBu, terc-butyl-carbamoyl-CHINIDIN,
velikost částic 5 μm , 150 x 4.6 mm



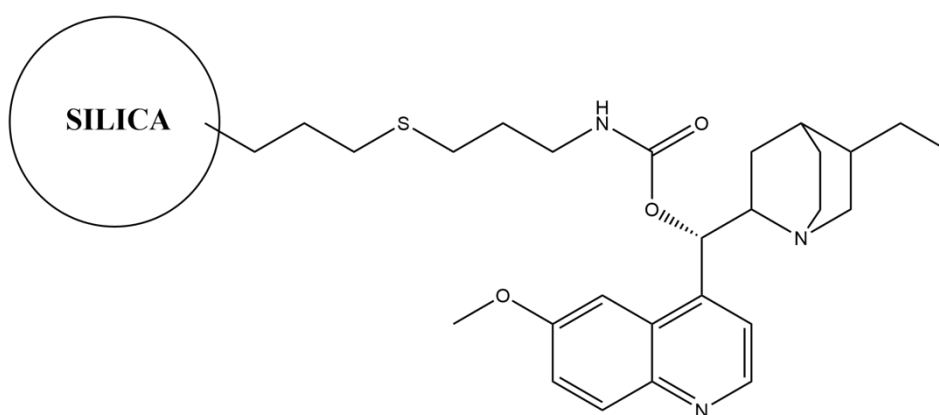
Obrázek č.22 MK 373 (216 $\mu\text{mol/g}$ silikagelu), triazol-methyl-carbamoyl-CHINIDIN,
velikost částic 5 μm 150 x 4.6 mm



Obrázek č.23 MK 391 (253 $\mu\text{mol/g}$ silikagelu), Allyl-carbamoyl-DIHYDROCHINIDIN
velikost částic 5 μm ,150 x 4.6 mm



Obrázek č.24 SW 061 (286 μmol /g silikagelu),
Allyl-carbamoyl-DIHYDROCHINIDIN, velikost částic 5 μm 150 x 4.6 mm



Obrázek č.25 SW 069 (157 μmol /g silikagelu),
Allyl-carbamoyl-DIHYDROCHINIDIN, velikost částic 5 μm , 150 x 4.6 mm

Chemikálie:

Organická rozpouštědla methanol (MeOH) a acetonitril (ACN) byla pořízena od firmy Merck (Praha, Česká republika). Aditiva mobilní fáze chloristan sodný (NaClO_4), chlorid sodný (NaCl), triethylamin (TEA), kyselina octová (AcA), octan amonný (AcNH_4) pochází také od firmy Merck (Praha, Česká republika). Kyselina trifluorooctová (TFAcA), trifluorooctan amonný (TFAcNH₄), hydroxid amonný (NH_4OH) a hexobarbital ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$) byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika). 2-amino-2-(hydroxy-methyl)-1,3-propandiol (Tris) pochází od firmy LachNer (Neratovice, Česká republika). Ultračistá voda byla získána pomocí systému Millipore, Merck-Millipore (Německo).

4.2 Příprava vzorků a mobilních fází

Příprava vzorků

Analyzované látky byly rozpuštěny v acetonitrilu a po jejich přípravě uchovávány v ledničce při teplotě 4–7 °C. Vzorek hexobarbitalu byl připraven rozpuštěním v methanolu. Všechny vzorky byly filtrovány přes 0,45 µm polyvinylidenfluoridové filtry a jejich výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Analyzované deriváty boranových klastrů byly laskavě poskytnuty RNDr. Bohumírem Grünerem, CSc. (Akademie věd ČR). Systematické názvy a strukturní vzorce analytů jsou uvedeny v Seznamu analytů 4.4.

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byly připraveny smísením odpovídajících objemů organického rozpouštědla (MeOH, ACN) s vodným roztokem pufru nebo soli. Vodná složka MF byla připravena rozpuštěním odpovídajícího množství aditiva MF v ultračisté vodě, tak abychom získali 50 mM roztok. U vodné složky MF obsahující TEA nebo Tris byla následně upravena hodnota pH na požadovanou hodnotu. Vodné roztoky byly filtrovány pomocí vakua přes nylonové filtry o velikosti pórů 0,45 µm a odplyněny ultrazvukovou lázní.

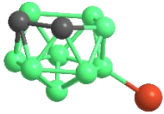
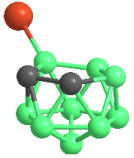
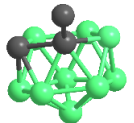
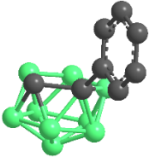
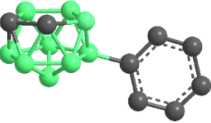
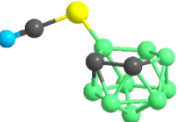
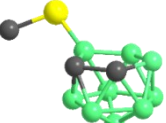
4.3 Chromatografické podmínky

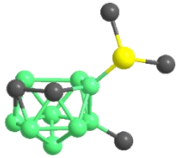
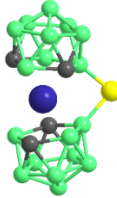
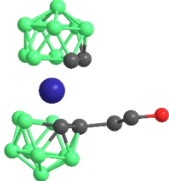
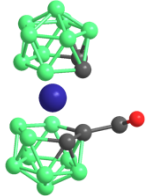
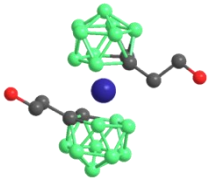
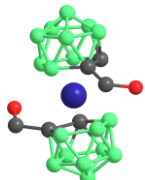
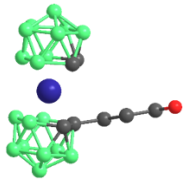
Průtok mobilní fáze při měření byl 1 ml/min a objem nastříkovaného vzorku byl 1 µl. Chromatografické eluce probíhala za isokratických podmínek a teplota termostatu byla temperována na 25 °C. Zástupci *nido*-karboranů byly detekovány při vlnové délce 220 nm, látky ze skupiny metallakarboranů byly detekovány při vlnové délce 254 nm. Separační schopnost kolon byla ověřována pomocí hexobarbitalu, který sloužil jako referenční látka. Analýzy probíhaly především v reverzním módu. V případě polárně-organického módu byly použity MF o složení MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) a MeOH/TFAcA/TFAcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w).

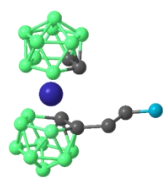
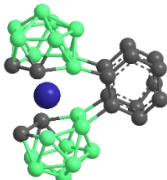
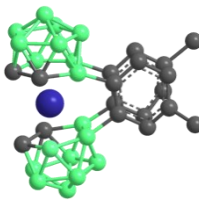
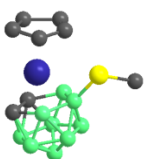
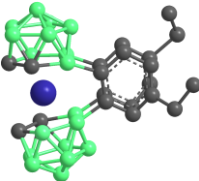
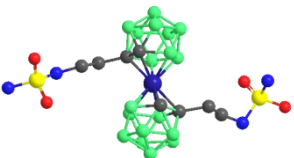
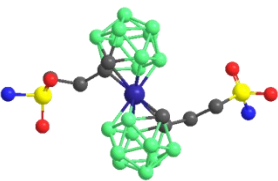
4.4 Seznam analytů

Tabulka č.4 Seznam analytů s jejich systematickým názvem a strukturním vzorcem.

V tabulce jsou atomy uhlíku znázorněny černou barvou, atomy bóru zelenou barvou, atomy bromu oranžovou barvou, atomy kyslíku červenou barvou, atomy dusíku modrou barvou, atomy kobaltu tmavě modrou barvou a atomy síry žlutou barvou.

Název vzorku	Systematický název	Strukturní vzorec
E1	[5-Br-7,8- <i>nido</i> -C ₂ B ₉ H ₁₁] ⁻	
9E1	[9-Br-7,8- <i>nido</i> -C ₂ B ₉ H ₁₁] ⁻	
E2	[7-Me-7,8- <i>nido</i> -C ₂ B ₉ H ₁₁] ⁻	
E4	[7-Ph-7,8- <i>nido</i> -C ₂ B ₉ H ₁₁] ⁻	
5E4	[5-Ph-7,8- <i>nido</i> -C ₂ B ₉ H ₁₁] ⁻	
E5	[9-NCS-7,8- <i>nido</i> -C ₂ B ₉ H ₁₁] ⁻	
E6	[9-MeS-7,8- <i>nido</i> -C ₂ B ₉ H ₁₁] ⁻	

5-ME-11-ZW	5-Me-11-Me ₂ S-7,8- <i>nido</i> -C ₂ B ₉ H ₁₁	
F9	[6,6'-μ-S-(1,7-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -2,2'-Co] ⁻	
HOEt	[1-(HOC ₂ H ₄)-Co(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂] ⁻	
HOMe	[1-(HOCH ₂)-Co(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂] [(CH ₃) ₃ NH]	
(HOEt)₂	[1,1'-(HOC ₂ H ₄) ₂ -Co(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂] ⁻	
(HOMe)₂	[1,1'-(HOCH ₂) ₂ -Co(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂] ⁻	
HOPr	[1-(HOC ₃ H ₆)-Co(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂] ⁻	

H₂NEt	$[1-(\text{H}_2\text{NC}_2\text{H}_4)_2\text{-Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2]^-$	
bisPHE	$[8,4',8',4\text{-}\mu\text{-bis}(\text{Phe})_2\text{-Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2]^-$	
bisTOL₂	$4,8',4',8\text{-}\mu\text{-(C}_6\text{H}_3\text{CH}_3)_2\text{-(1,2-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2\text{-3,3'-Co(III)]Cs}$	
CPENT	$4\text{-MeS-3-C}_5\text{H}_5\text{-Co-(1,2-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})$	
bisEtPHE	$[4,8',4',8\text{-}\mu\text{-(C}_6\text{H}_3\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{-(1,2-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2\text{-3,3'-Co(III)]Cs}$	
DiEtAmSULF	$[(1,1'\text{-H}_2\text{NS(O)}_2\text{NH-(CH}_2)_2\text{-1,2-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2\text{-3,3'-Co}](\text{H}_3\text{C})_4\text{N}$	
DiEtSULFON	$[(1,1'\text{-H}_2\text{NS(O)}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-1,2-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2\text{-3,3'-Co}](\text{H}_3\text{C})$	

5 Výsledky a diskuse

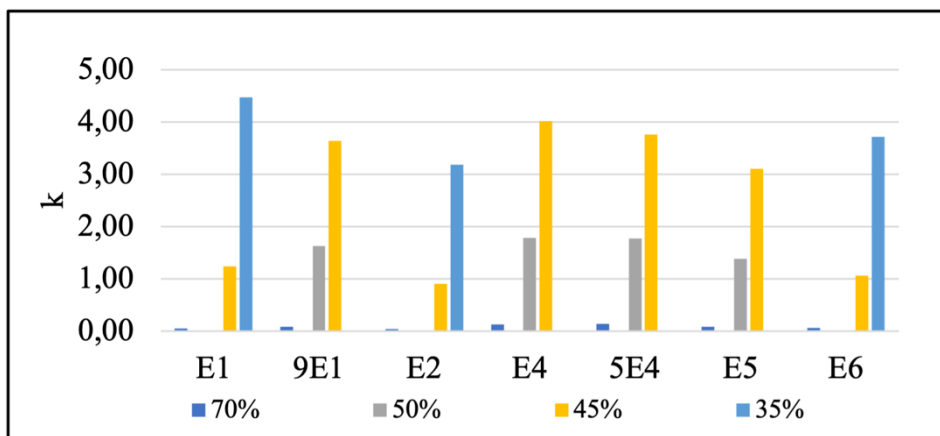
5.1 Polysacharidové chirální selektory

5.1.1 Chirální selektor: tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulózy

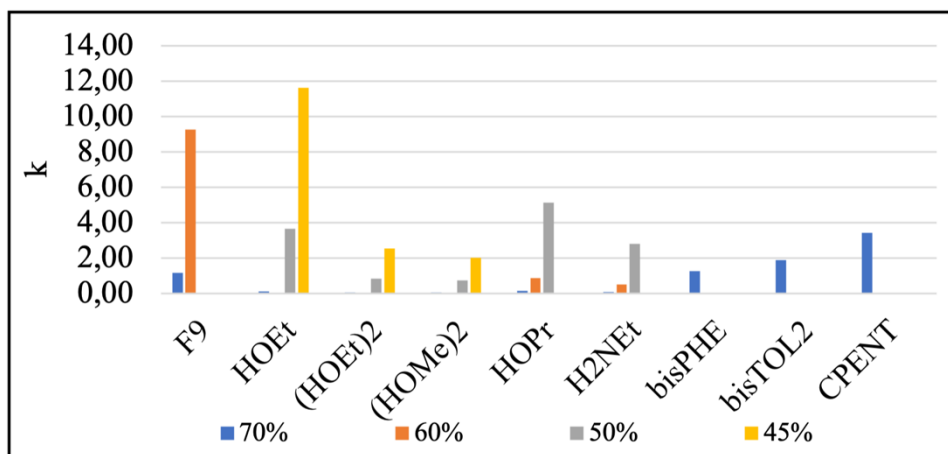
Nejprve byly zkoumány separační schopnosti kolony s chirálním selektorem tris(3,5-dichlorofenylkarbamátem) celulózy imobilizovaným na silikagelové matici. Separační možnosti této kolony byly zkoumány pomocí několika mobilních fází o různém složení, kdy bylo postupováno od nejvyšší koncentrace organického rozpouštědla ke koncentraci nejnižší. Současně s poměrem organické a vodné složky se měnila i koncentrace aditiv MF, které zde byly přítomny pouze ve vodné složce. Jako první byly testovány MF s přísadkou anorganických aditiv. Eluovány zde byly všechny zkoušené látky, avšak k separaci došlo pouze u látek ze skupiny kobalt bis(dikarbolidů). Při měření s MF o složení MeOH-50 mM NaClO₄ a MeOH-50 mM NaCl bylo dosaženo náznaku separace analytu CPENT. Za použití MF MeOH/NaClO₄ (70/30) (v/v) byl analyt CPENT eluován v retenčního čase 14 minut s náznakem separace (rozlišení 0,06). Rozlišení nepatrně vzrostlo na 0,11 při využití MF MeOH/ 50 mM NaCl (70/30) (v/v). U všech analytů byly se snižujícím se procentem MeOH v MF pozorovány zvyšující se hodnoty retenčního faktoru, související s vyšším zadržováním analytů na SF. Tuto skutečnost zobrazují Obrázky č. 26 a 27. Například snížením obsahu MeOH v MF MeOH/ 50 mM NaClO₄ z 70 % na 60 %, došlo u analytu F9 až k osminásobnému zvýšení retenčního faktoru z hodnoty 1,17 na 9,26.

Poté bylo provedeno měření s MF, ve kterých byl MeOH nahrazen méně polárním acetonitrilem (ACN). V MF ACN-50 mM NaClO₄ i ACN-50 mM NaCl byl separován aniontový zástupce kobalt bis(dikarbolidů) F9. K separaci enantiomerů tohoto analytu došlo u MF s poměrem organické a vodné složky (60/40) (v/v) a (50/50) (v/v). Nejvyšší dosažené rozlišení analytu F9 bylo 1,44 za použití MF ACN/ 50 mM NaCl (50/50) (v/v) s dobou separace 27 minut. V tomto případě došlo k separaci téměř na základní linii. Při využití MF s ACN a aditivem NaCl byla pozorována kromě separace analytu F9 i částečná separace analytů (HOEt)₂ a bisPHE. Dihydroxyetylový derivát bis(dikarbolidů) (HOEt)₂ byl prvně separován při MF ACN/ 50 mM NaCl (40/60) (v/v) s rozlišením 0,41; avšak snížením obsahu ACN v MF o 5 % se hodnota rozlišení zvýšila dvojnásobně na 0,85. Touto změnou došlo ovšem i ke zvýšení retenčního faktoru z hodnoty 3,25 na 8,66.

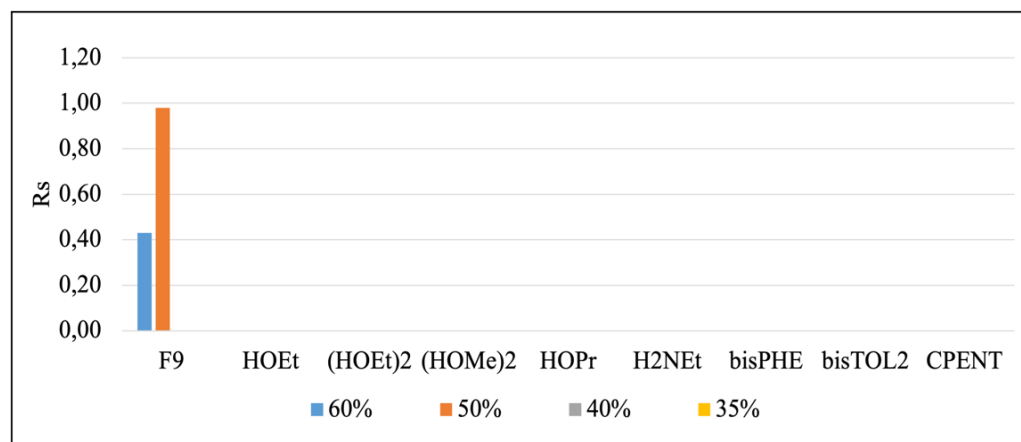
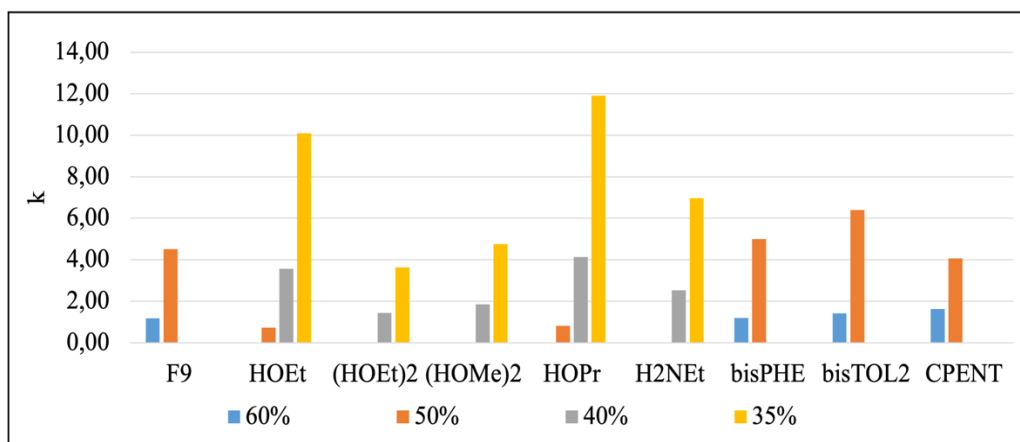
Náznak separace analytu bisPHE byl pozorován za použití MF ACN/ 50 mM NaCl (50/50) (v/v) s hodnotou rozlišení 0,37. Retenční faktor testovaných analytů vykazoval společně s rozlišením zvyšující se tendenci se snižujícím se obsahem organického rozpouštědla v MF (Obrázek č.28 a 29). Chromatogramy analytů F9, bisPHE a (HOEt)₂ jsou zobrazeny na Obrázku č. 30 a 31. Při srovnání MF s anorganickými aditivami, bylo dle počtu uskutečněných separací na této koloně nejvýhodnější použití MF ACN-50 mM NaCl.



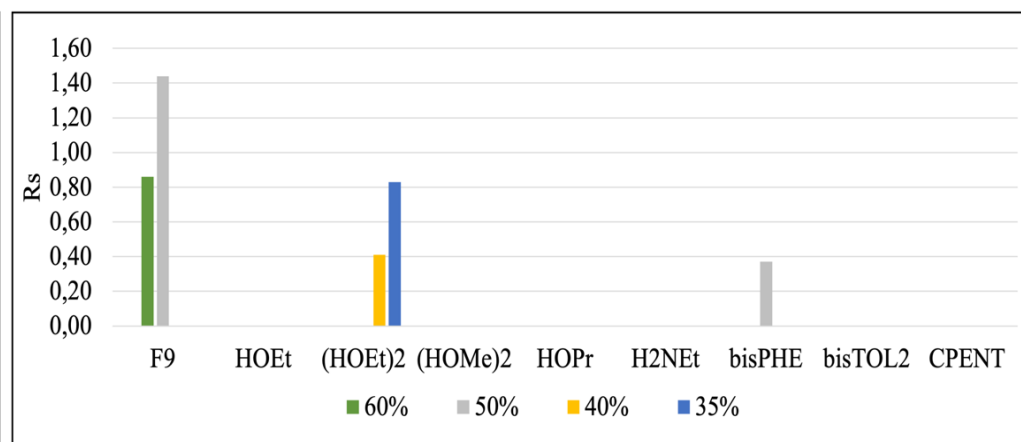
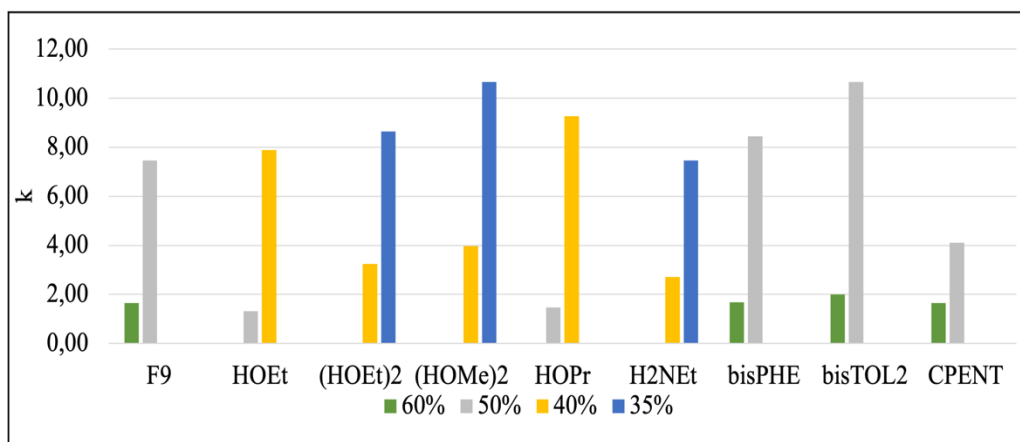
Obrázek č.26 Graf závislosti retenčního faktoru 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů na % MeOH/ 50mM NaClO₄ v MF



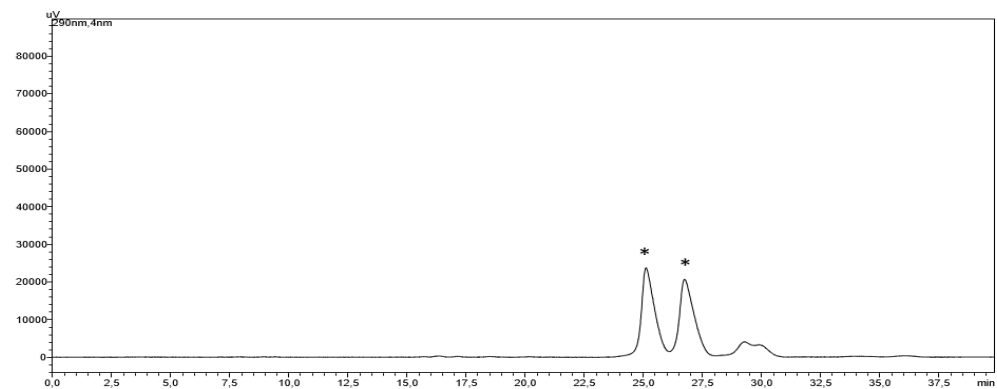
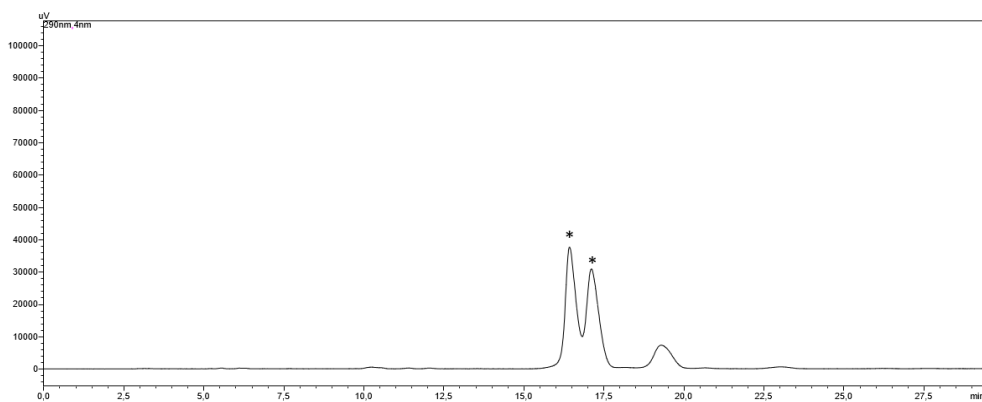
Obrázek č.27 Graf závislosti retenčního faktoru kobalt bis(dikarbonylů) na % MeOH/ 50mM NaClO₄ v MF



Obrázek č.28 Grafy závislosti retenčních faktorů kobalt bis(dikarbolidů) (vlevo) a rozlišení (vpravo) na % ACN/ 50 mM NaClO₄ v MF

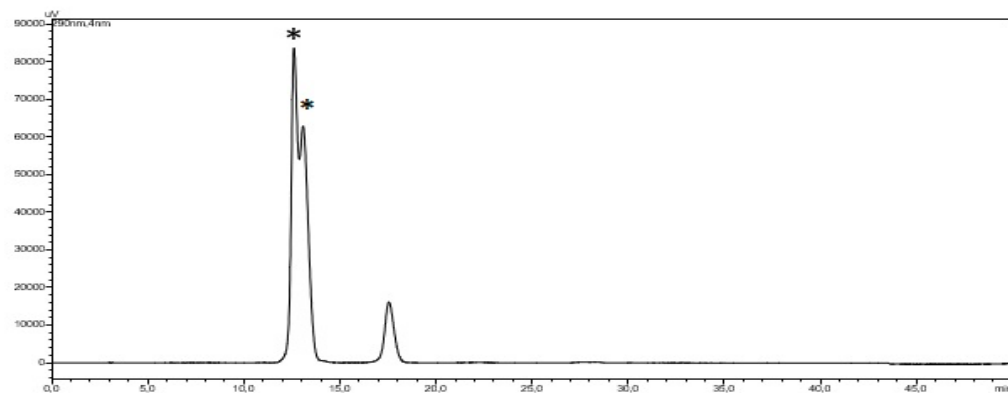
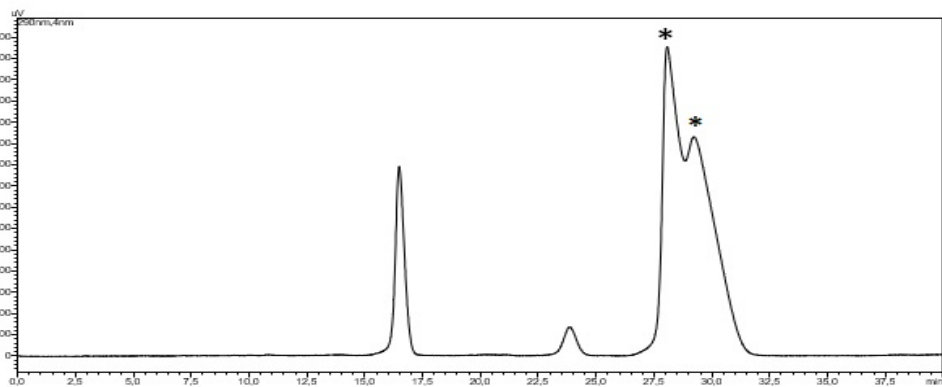


Obrázek č.29 Grafy závislosti retenčních faktorů kobalt bis(dikarbolidů) (vlevo) a rozlišení (vpravo) na % ACN/ 50 mM NaCl v MF



Obrázek č.30 Chromatogramy analytu F9 za podmínek ACN/ 50 mM NaClO₄ (50/50) (v/v) (vlevo) a ACN/ 50 mM NaCl (50/50) (v/v) (vpravo).

Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.



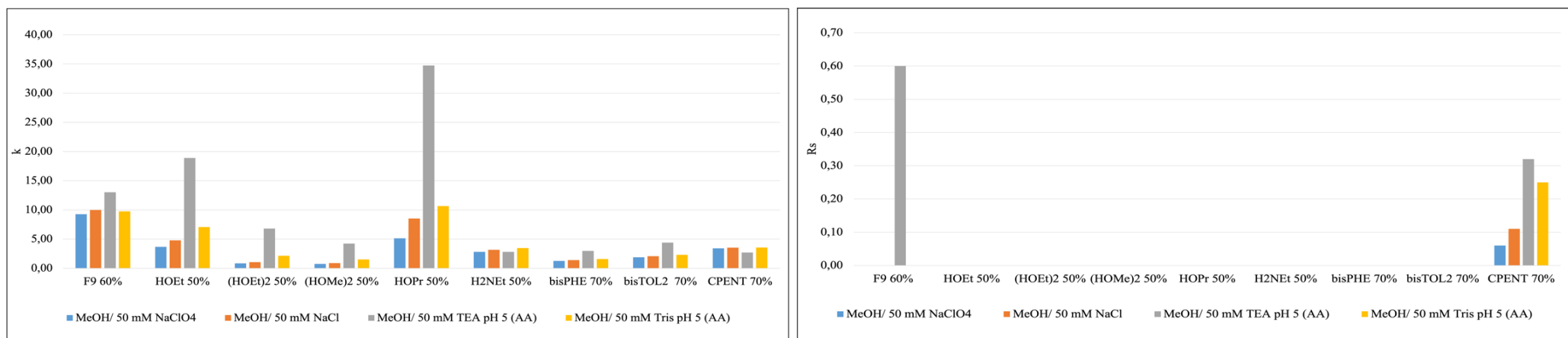
Obrázek č.31 Chromatogramy vzorku bisPHE za podmínek ACN/ 50 mM NaCl (50/50) (v/v) (vlevo) a vzorku (HOEt)₂ za podmínek ACN/ 50 mM NaCl (40/60) (v/v) (vpravo). Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.

Dále byly testovány MF obsahující organická aditiva mobilní fáze triethylamin (TEA) a 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris), jejichž pH bylo upraveno na hodnotu 5 pomocí kyseliny octové. Organická aditiva MF byla použita pro zlepšení tvarů píků a zamezení jejich chvostování. MF obsahující TEA či Tris formuje neutrální iontový pár s negativně nabitým klastrem a analyty tak mohou lépe interagovat s chirálním selektorem. Použitím těchto MF došlo k eluci všech analytů, ovšem stejně jako při použití anorganických aditiv MF zde také nebyl separován žádný vzorek ze skupiny 7,8-dikarbamido-undekaborátů. Při použití MF o složení MeOH/ 50 mM TEA pH 5 a MeOH/ 50 mM Tris pH 5 došlo přidáním protiiontu k nárůstu retenčního faktoru analytů oproti předchozím MF o složení MeOH/ 50 mM NaClO₄ a MeOH/ 50 mM NaCl. Hodnota retenčního faktoru analytu HOPr v MF MeOH/ 50 mM TEA pH 5 vzrostla oproti výsledkům MF MeOH/ 50 mM NaClO₄ až na sedminásobek. Podobně bylo dosaženo téměř čtyřnásobného zvýšení retence analytu HOEt. Z Obrázku č.32 je patrné, že k nárůstu retence při účasti protiiontů došlo především u MF s TEA. Výjimkou tohoto tvrzení byly analyty H₂Net a CPENT jejichž retenční faktor byl nejvyšší u MF MeOH/50mM Tris pH 5. Látka H₂Net má v těchto podmínkách charakter zwitteriontu a díky tomu nedochází ke změnám její retence jako u ostatních analytů. Využitím MF MeOH/ 50 mM TEA pH 5 byl částečně separován vzorek CPENT a F9. Rozdělení analytu CPENT v MF MeOH/ 50 mM TEA pH 5 (70/30) (v/v) proběhlo s rozlišením 0,32. Pro rozdělení píku analytu F9 bylo v MF MeOH/ 50 mM TEA pH 5 výhodnější snížení poměru organické fáze ze (70/30) (v/v) na (60/40) (v/v), kdy došlo ke zvýšení hodnoty rozlišení z 0,17 na 0,60. V MF MeOH/ 50 mM Tris pH 5 došlo k náznaku separace pouze u analytu CPENT o rozlišení 0,25.

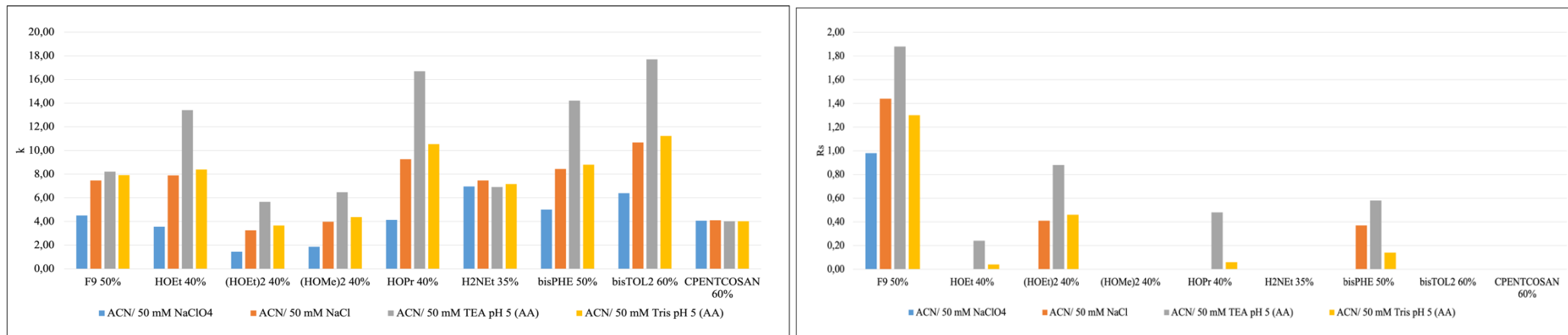
Náhradou MeOH za ACN v MF s organickými aditivami bylo dosaženo vyššího počtu separovaných látek (Obrázek č.33). Došlo zde k rozdělení analytů F9, HOEt, HOEt₂, HOPr a bisPHE v MF ACN/ 50 mM TEA pH 5 i ACN/ 50 mM Tris pH 5. Rozlišení separovaných látek bylo obecně vyšší v MF ACN/ 50 mM TEA pH 5 než v MF ACN/ 50 mM Tris pH 5. Příkladem tohoto tvrzení je analyt F9, který byl separován až na základní linii v MF ACN/ 50 mM TEA pH 5 s rozlišením 1,88; v MF ACN/ 50 mM Tris pH 5 došlo ke snížení rozlišení na hodnotu 1,30.

Taktéž jako v MF o složení MeOH/ 50 mM TEA pH 5 i zde působilo na rozlišení vzorků příznivě snížení koncentrace organické složky v MF. Tuto skutečnost zobrazují chromatogramy analytu F9 na Obrázku č.34, kdy snížením obsahu ACN v MF ACN/ 50 mM TEA pH 5 o 10 % došlo ke zvýšení rozlišení z 1,3 na 1,88. Monohydroxylové sloučeniny HOEt a HOPr společně s dihydroxylovou sloučeninou (HOEt)₂ byly nejlépe separovány při 40 % koncentraci ACN v MF ACN / 50 mM TEA pH 5. V MF o složení ACN/ 50 mM TEA pH 5 byly vzorky obecně eluovány s vyššími retenčními faktory oproti MF ACN/ 50 mM Tris pH 5. Vyšší retence v MF obsahujících TEA je dána vyšší hydrofobicitou iontového páru. Jelikož se nám pomocí ACN podařilo separovat více vzorků, můžeme ACN označit jako rozpouštědlo s vyšším potenciálem pro separaci těchto látek na koloně s chirálním selektorem tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulózy. Ze získaných výsledků se jako nejvýhodnější jevila MF o složení ACN/ 50 mM TEA pH 5. Použití MF s přísadkou anorganických aditiv bylo vyhodnoceno jako méně výhodné, stejně tak jako použití organického aditiva Tris.

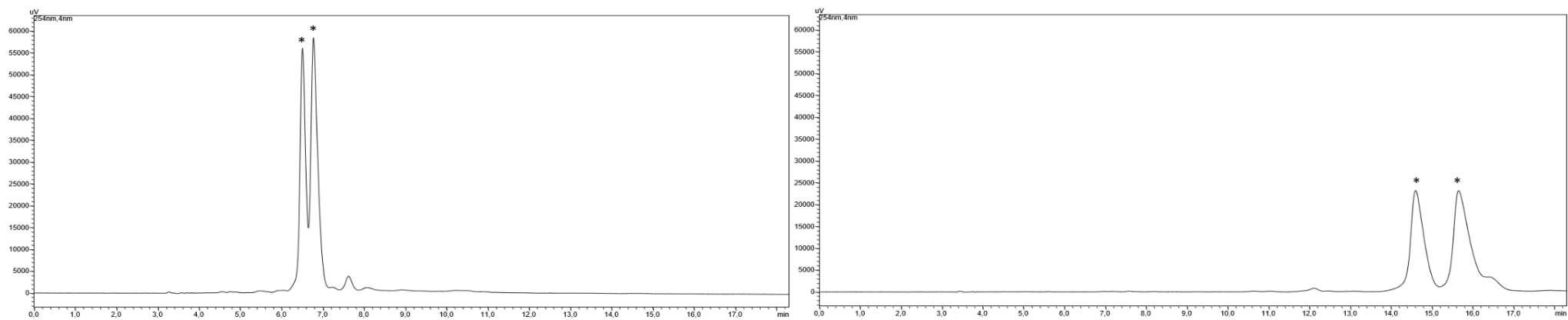
Získané výsledky byly poté porovnány s výsledky předchozí diplomové práce Jany Marvalové, která jako chirální selektor použila tris(3,5-dimethylkarbamát) celulózy. Při porovnání těchto dvou chirálních selektorů bylo použití imobilizovaného chirálního selektoru tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulózy méně výhodné. V případě tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulózy došlo k rozdělení pěti analytů oproti chirálnímu selektoru tris(3,5-dimethylkarbamát) celulózy který umožnil separaci sedmi analytů [60].



Obrázek č.32 Grafy závislosti retenčních faktorů kobalt bis(dikarbolidů) (vlevo) a rozlišení (vpravo) na typu aditiva v MF s MeOH



Obrázek č.33 Grafy závislosti retenčních faktorů kobalt bis(dikarbolidů) (vlevo) a rozlišení (vpravo) na typu aditiva v MF s ACN

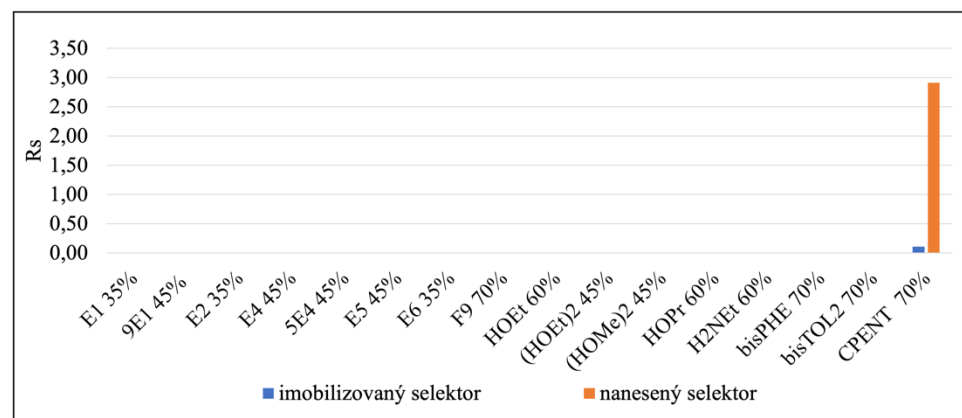
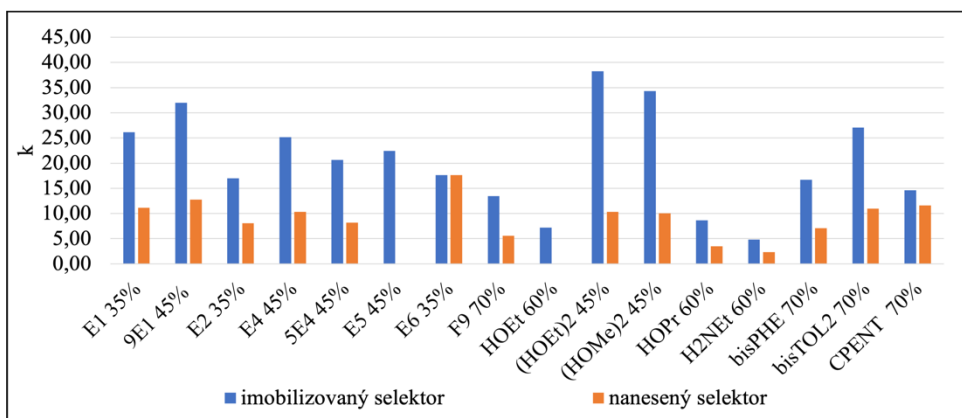


Obrázek č.34 Chromatogramy analytu F9, MF ACN/TEA pH 5 (60/40) (v/v) (vlevo) a (50/50) (v/v) (vpravo). Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.

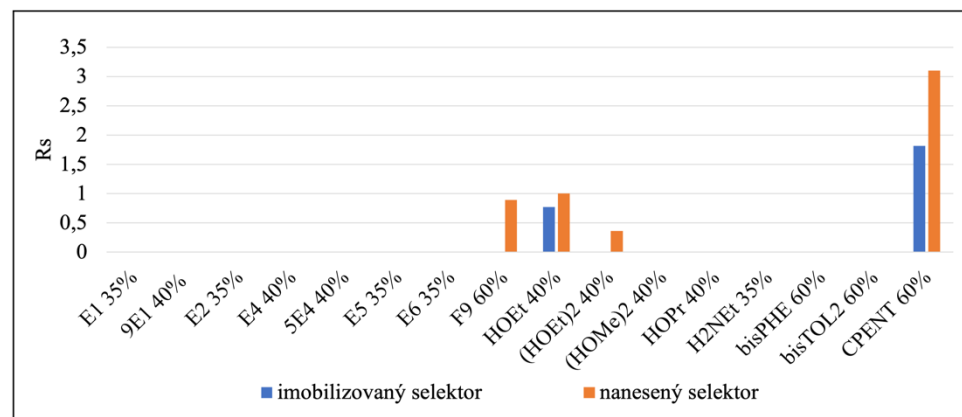
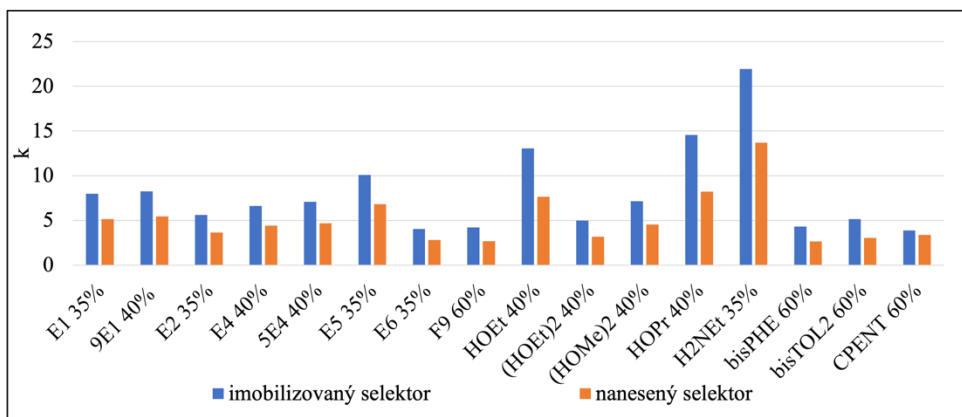
5.1.2 Chirální selektor: tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylózy

Druhým testovaným chirálním selektorem na bázi polysacharidů byl tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylózy imobilizovaný na silikagelové matrici. Při tomto experimentu byly použity MF MeOH-50 mM NaClO₄ a ACN-50 mM NaClO₄ o různém poměrovém složení. Tyto MF byly zvoleny z důvodu nejlepších výsledků separace při použití chirálního selektoru naneseného na silikagel [60]. Využitím kolony s imobilizovaným selektorem byl separován analyt CPENT. K náznaku dělení CPENT došlo za podmínek MF MeOH/ 50 mM NaClO₄ (70/30) (v/v) a kompletní separace tohoto analytu proběhla v MF ACN/ 50 mM NaClO₄ (60/40) (v/v). Dále došlo k náznaku separace analytu HOEt v MF ACN/ 50 mM NaClO₄ (40/60) (v/v). Výhodnější bylo použití MF o složení ACN/ 50 mM NaClO₄, kdy měly látky nižší retenční časy a vyšší rozlišení než u MF s MeOH.

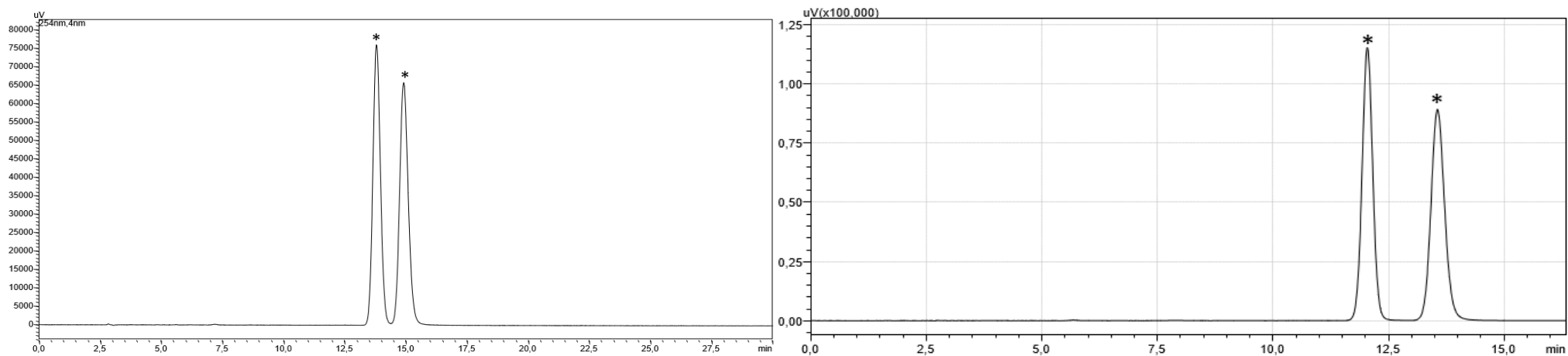
Poté byly porovnány získané hodnoty s výsledky předchozí diplomové práce, kde byl chirální selektor tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylózy nanesený na silikagel. Ani při jednom způsobu navázání selektoru nedošlo k separaci analytů ze skupiny 7,8-dikarbano-undekaborátů, je zde tedy hodnocena separace pouze kobalt bis(dikarbolidů). Při porovnání obou způsobů navázání selektoru na silikagel (Obrázek č.35 a 36) je patrné, že hodnoty retenčního faktoru při naneseném selektoru byly nižší než u selektoru imobilizovaného. Z důvodu nižších retenčních faktorů a vyššího počtu separovaných látek je výhodnější použití selektoru naneseného. Hodnoty rozlišení byly vyšší u selektoru naneseného. Toto tvrzení potvrzuje analyt CPENT, který byl pomocí selektoru naneseného separován s rozlišením 3,10. V případě selektoru imobilizovaného bylo rozlišení CPENT 1,82 (Obrázek č.37) [60]. Je zde tak potvrzena teorie, že narušením pravidelné spirálovité struktury amylózy při imobilizaci dochází ke snížení schopnosti separace [32].



Obrázek č.35 Grafy závislosti retenčních faktorů (vlevo) a rozlišení (vpravo) na selektoru imobilizovaném či naneseném na silikagelu, MF o složení MF MeOH/ 50 mM NaClO₄ [60]. Název analytu obsahuje procentuální vyjádření obsahu MeOH v MF.



Obrázek č.36 Grafy závislosti retenčních faktorů (vlevo) a rozlišení (vpravo) na selektoru imobilizovaném či naneseném na silikagelu, MF o složení MF ACN/ 50 mM NaClO₄ [60]. Název analytu obsahuje procentuální vyjádření obsahu ACN v MF.



Obrázek č.37 Chromatogramy analytu CPENT za použití selektoru imobilizovaného s MF ACN/ 50 mM NaClO₄ (60/40) (v/v) (vlevo) a selektoru naneseného s MF ACN / 50 mM NaClO₄ (60/40) (v/v) (vpravo) [60]. Enantiomery jsou v chromatogramech označeny hvězdičkou.

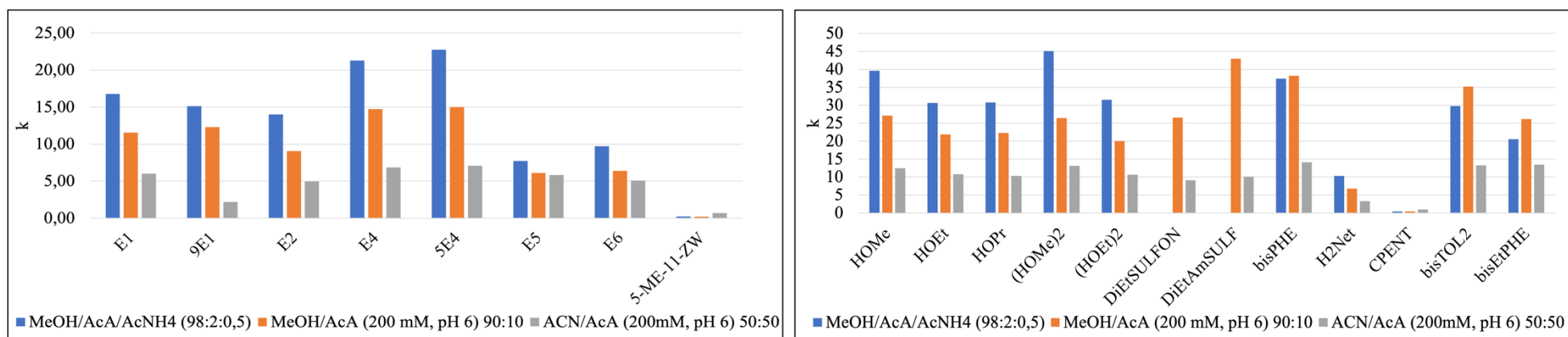
5.2 Chinidinové chirální selektory

Druhým typem chirálních selektorů, které jsme používali při našem měření byly chinidinové kolony. V průběhu měření pomocí těchto kolon došlo k eluci všech zkoušených vzorků. K separaci došlo opět pouze u zástupců kobalt bis(dikarbolidů). Jedinou výjimkou byl analyt E4, zástupce 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů, k jehož náznaku separace došlo u kolony QN AX tBU.

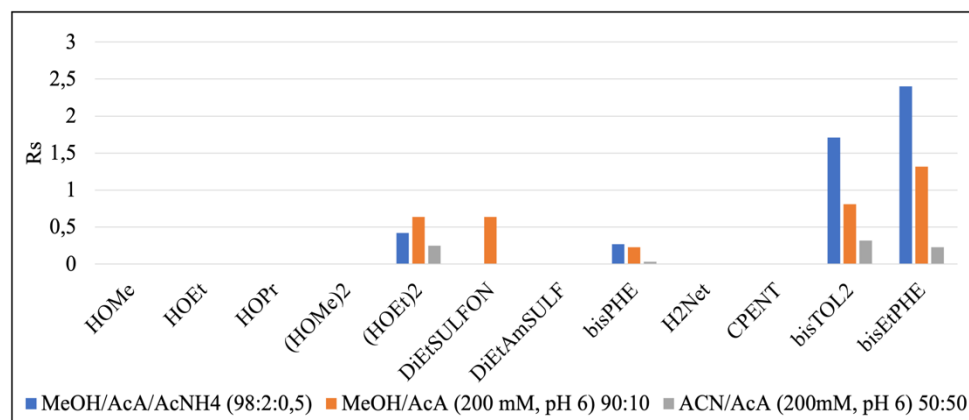
5.2.1 Chirální kolona: MK 373

Jako první byla dle doporučení výrobce kolony připravena MF o složení MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) ve které se objevil náznak separace pěti analytů. Poté jsme zkusili zaměnit MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) za MF MeOH/TFAcA/TFAcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w). Použití MF MeOH/TFAcA/TFAcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) bylo zcela nevhodné, protože došlo k nadměrnému zadržování analytů na koloně díky vyšší hydrofobicitě trifluoroctanu amonného. Následně byla s dobrými výsledky použita MF MeOH/ AcA (200mM, pH 6) (90:10) (v/v) jejíž pH bylo upraveno pomocí NH₄OH. Použití této MF bylo doporučeno výrobcem, pokud nedojde k dostatečným či žádným separacím v podmínkách MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w). Dále jsme zkoumali ideální poměrové složení MF sestávající se z ACN/AcA (200mM, pH 6). Jako nejvýhodnější poměr byl vyhodnocen ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v) pro jeho dobré eluční a separační vlastnosti.

Retenční faktor eluovaných látek dosahoval nejvyšších hodnot u MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w), s výjimkou analytů bisPHE, bisTOL₂, bisEtPHE, 5-ME-11-ZW a CPENT (Obrázek č. 38). Na této koloně bylo separováno pět analytů, přičemž látky bisTOL₂ a bisEtPHE byly separovány až na základní linii s hodnotou rozlišení nad 1,5. Při separaci se podařilo oddělit nečistoty eluované mezi enantiomery, které vznikly v průběhu syntézy. Nejvyššího rozlišení analytů bylo dosaženo použitím MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w). Toto tvrzení ovšem nepotvrzuje látka (HOEt)₂, jejíž rozlišení bylo nejvyšší v MF MeOH/ AcA (200mM, pH 6) (90:10) (v/v) (Obrázek č.39).



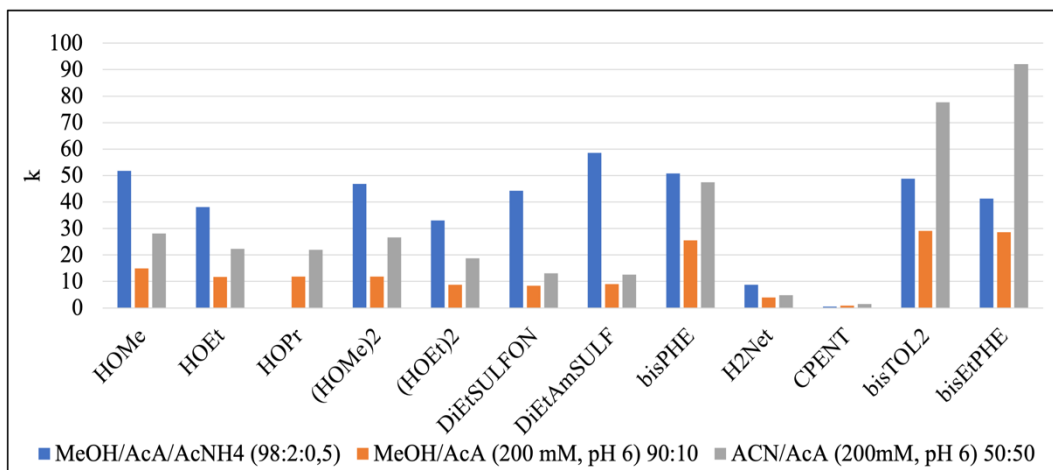
Obrázek č. 38 Grafy závislosti retenčních faktorů 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů (vlevo) a kobalt bis(dikarbolidů) (vpravo) na složení MF, kolona MK 373. U analytů DiEtSULFON a DiEtAmSULF v MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) nebylo dosaženo eluce do 90 minut.



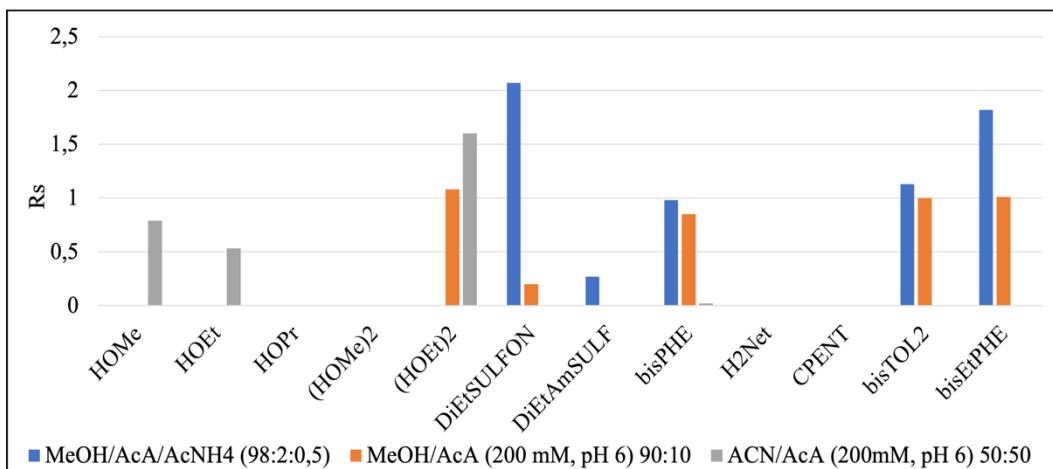
Obrázek č.39 Graf závislosti rozlišení kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona MK 373

5.2.2 Chirální kolona: SW 061

Na koloně SW 061 byly pozorovány vyšší retenční faktory oproti předešlé koloně MK 373. Retenční faktor byl stejně jako u předchozí kolony nejvyšší v MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) s výjimkou látek 5-ME-11-ZW, CPENT, bisTOL₂ a bisEtPHE, které byly nejvíce zadržovány při MF ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v) (Obrázek č.40). Pomocí této kolony bylo dosaženo separace osmi látek, přičemž analyty (HOEt)₂, DiEtSULFON a bisEtPHE byly separovány na základní linii. Nejvyšších hodnot rozlišení bylo dosaženo v MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) (Obrázek č.41). Jediným analytem, který byl alespoň částečně separován za použití všech třech MF byl bisPHE.



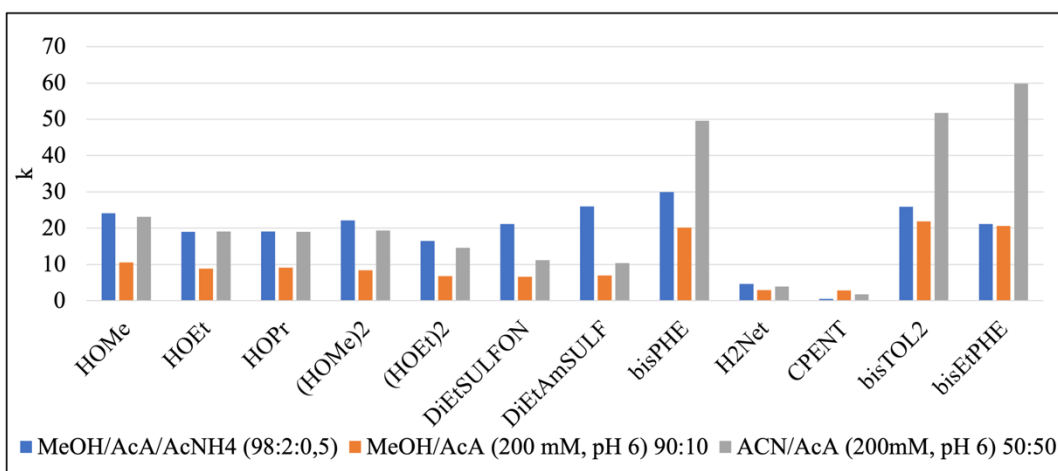
Obrázek č.40 Graf závislosti retenčního faktoru kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona SW 061



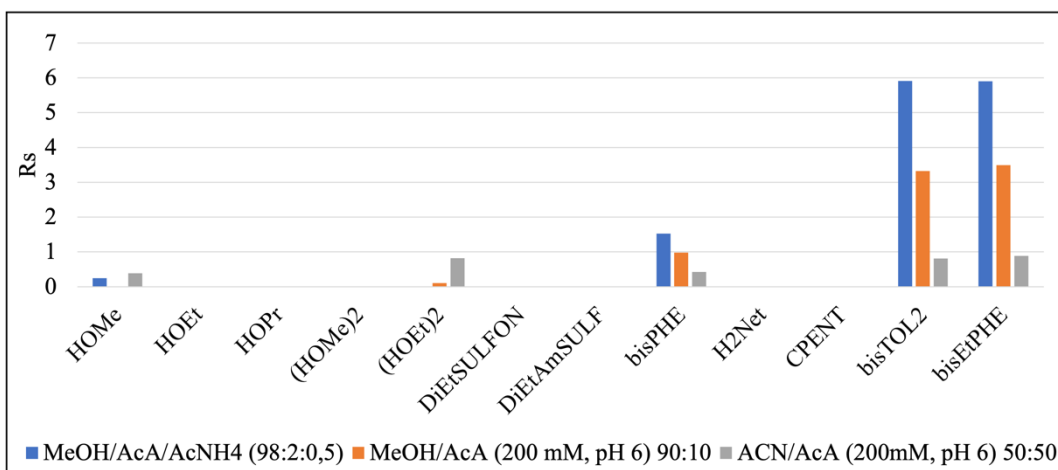
Obrázek č.41 Graf závislosti rozlišení kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona SW 061

5.2.3 Chirální kolona: MK 391

Na Obrázku č. 42 lze vidět, že retenční faktory většiny analytů dosahovaly nejvyšších hodnot při použití MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w). Výjimkou byly látky bisPHE, bisTOL₂ a bisEtPHE, které byly zadržovány nejvíce při MF ACN/AcA (200 mM, pH 6) (50:50) (v/v). Na této koloně došlo k náznaku separace látek HOME a (HOEt)₂, jejichž rozlišení bylo menší než 1. K separaci s hodnotou rozlišení nad 1,5 došlo u analytů bisPHE, bisTOL₂ a bisEtPHE v MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) (Obrázek č.43).



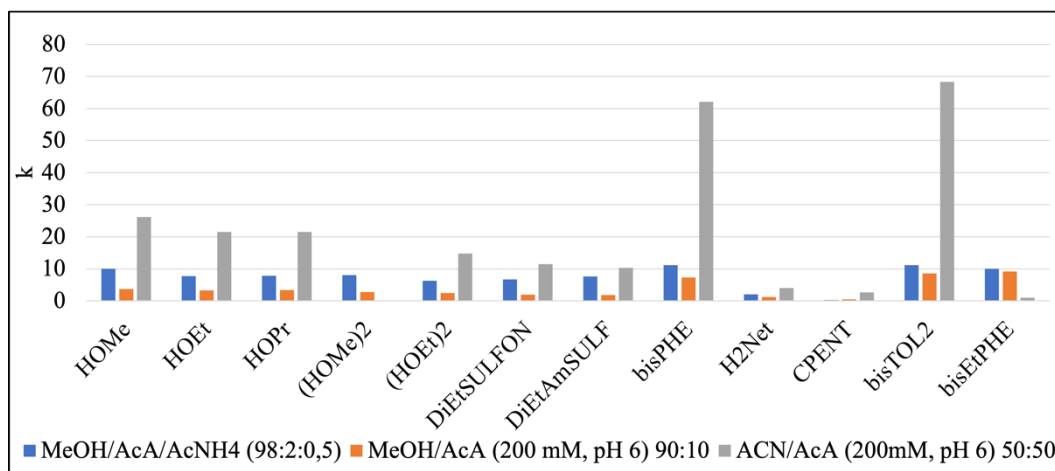
Obrázek č.42 Graf závislosti retenčního faktoru kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona MK 391



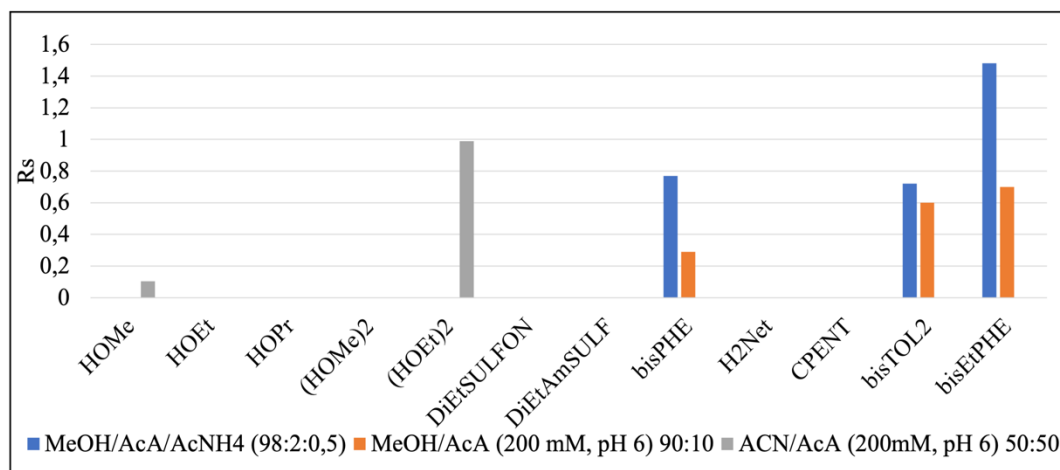
Obrázek č.43 Graf závislosti rozlišení kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona MK 391

5.2.4 Chirální kolona: SW 069

Další testovanou kolonou byla SW 069. Tato kolona vykazovala až na výjimky nejnižší retenční faktory ze všech použitých chinidinových kolon. Hodnoty retenčních faktorů byly v tomto případě nejvyšší při MF o složení ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v) (Obrázek č.44). Nižší retenční faktory měla tentokrát MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) u níž došlo k nejvyšším hodnotám rozlišení. Použitím MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) došlo k separaci vzorku bisEtPHE až na základní linii. Dále za použití této kolony došlo k částečné separaci analytů HOME, (HOEt)₂, bisPHE a bisTOL₂ (Obrázek č.45).



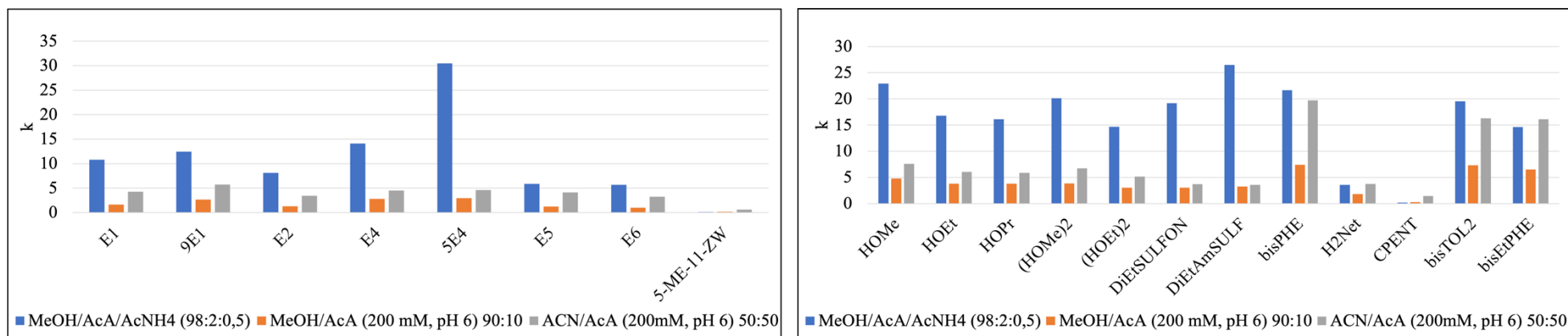
Obrázek č.44 Graf závislosti retenčního faktoru kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona SW 069



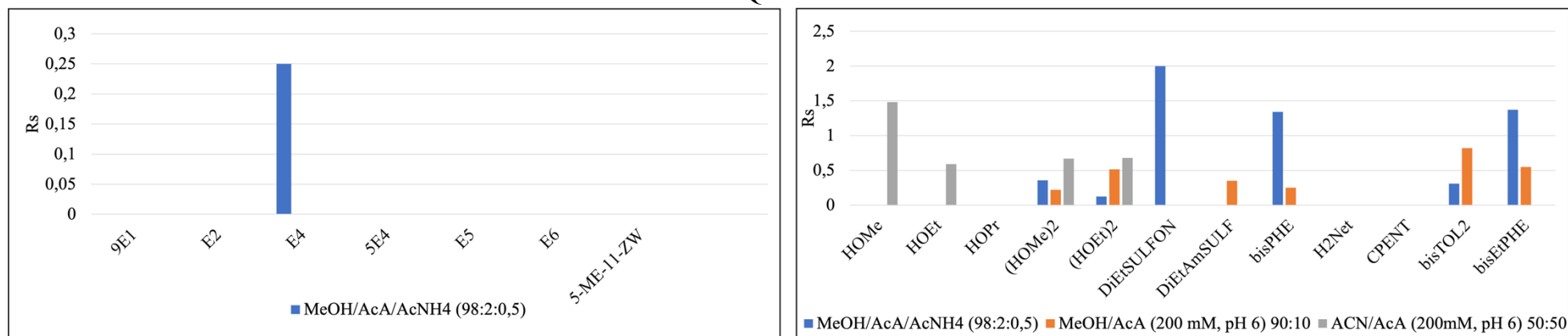
Obrázek č.45 Graf závislosti rozlišení kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona SW 069

5.2.5 Chirální kolona: QN AX tBU

Jako poslední proběhlo testování kolony QN AX tBU. Retenční faktor byl obecně nejvyšší u MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5). Výjimkou byly látky CPENT, H₂Net, bisEtPHE a 5-Me-11-ZW, jejichž retenční faktory byly nejvyšší při MF ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v) (Obrázek č.46). Použitím této kolony došlo k enantioseparaci deseti vzorků, včetně zástupce 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů E4. Látky HOME a DiEtSULFON byli separovány až na základní linii (Obrázek č.47). Zástupce skupiny 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů E4 byl separován s rozlišením 0,25 v MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w).



Obrázek č.46 Grafy závislosti retenčních faktorů 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů (vlevo) a kobalt bis(dikarbolidů) (vpravo) na složení MF, kolona QN AX tBU



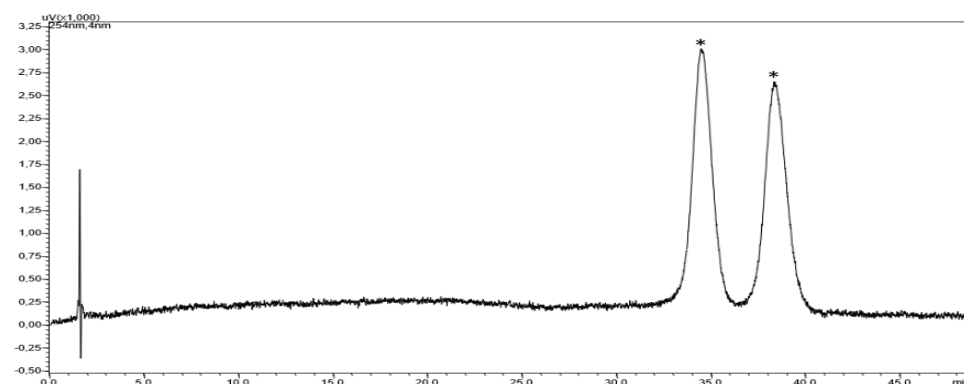
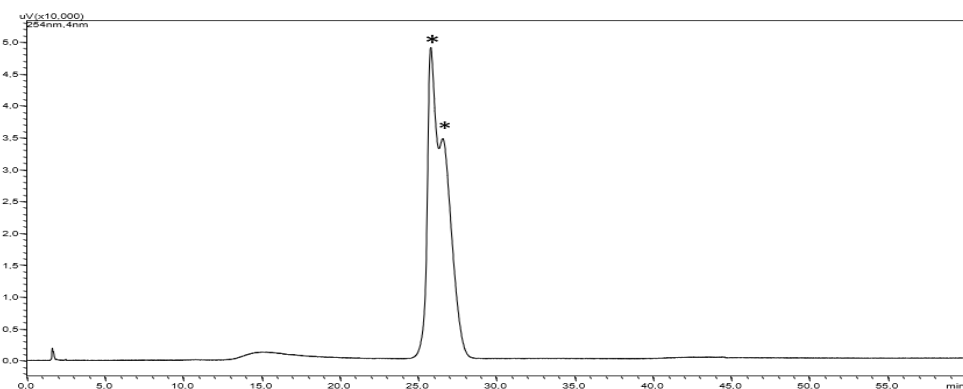
Obrázek č. 47 Grafy závislosti rozlišení 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů (vlevo) a kobalt bis(dikarbolidů) (vpravo) na složení MF, kolona QN AX tBU

5.2.6 Porovnání chinidinových kolon:

Při závěrečném srovnání všech chinidinových kolon byla jako nejvýhodnější vyhodnocena kolona QN AX tBu, za jejíž použití došlo k separaci nejvyššího počtu látek a jako jediná byla schopna náznaku separace u látky ze skupiny 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů. Velice dobré separace bylo dosaženo též u kolony MK 391 pomocí které došlo k rozlišení nad 1,5 u enantiomerů analytů bisPHE, bisTOL₂ a bisEtPHE. Ačkoliv tato kolona nemá nejlepší výsledky separace pro všechny analyty, jeví se jako vhodná pro separaci bisarylenových kobalt bis(dikarbolidů). Můžeme tedy předpokládat, že se zde uplatnil pozitivní vliv skupiny allyl- ve struktuře chirálního selektoru, účastníci se π - π interakcí. Při srovnání kolon SW 061 a SW 069 bylo dosaženo více chirálních separací u kolony SW 061, obsahující 268 μ mol chirálního selektoru na 1 g silikagelu oproti koloně SW 069, která obsahuje pouze 157 μ mol/g silikagelu. Vyšší obsah chirálního selektoru se pozitivně projevil na zlepšení rozlišení, retenční faktory byly ovšem až pětinasobně vyšší. Kolona MK 373, v jejíž struktuře je chirální selektor navázán přes triazolovou skupinu, byla schopna separovat pět analytů ze skupiny kobalt bis(dikarbolidů). Stejného počtu rozdělených látek bylo dosaženo i použitím kolony MK 391, ve které je chirální selektor navázán přes thioetherovou skupinu. Použitím kolony MK 391 bylo oproti koloně MK 373 dosaženo separací o vyšším rozlišení a nižších retenčních faktorech, což dokazuje výhodnější navázání chirálního selektoru tímto způsobem. Při navázání chirálního selektoru kolony QN AX tBU z odlišné strany než u kolony MK 391 bylo pozorováno vyšší množství uskutečněných enantioseparací oproti koloně MK 391. Nicméně rozlišení bylo až pětinasobně vyšší při použití kolony MK 391, a to u analytů bisTOL₂ a bisEtPHE. Nejlepší podmínky pro separaci vzorků za použití chinidinových chirálních selektorů jsou zobrazeny v Tabulce č.5. Reprezentativní chromatogramy separovaných vzorků zobrazují Obrázky č.48-53.

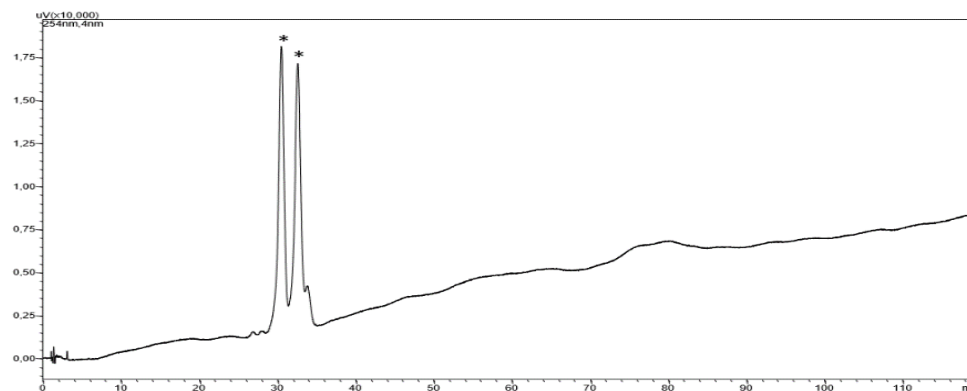
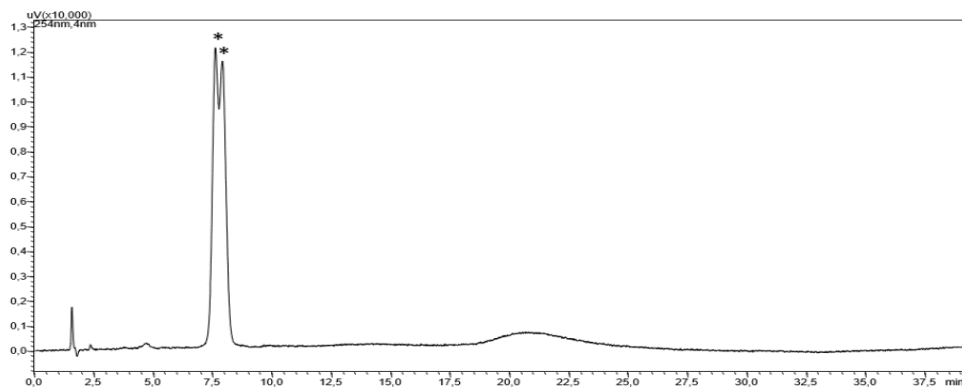
Tabulka č.5 Nejlepší podmínky pro separaci vzorků pomocí chinidinových kolon

analyt	k1	Rs
QN AX tBu MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w)		
E4	14,10	0,25
DiEtSULFON	19,19	2,00
QN AX tBu MeOH/AcA (200 mM, pH 6) (90:10) (v/v)		
DiEtAmSULF	3,28	0,35
QN AX tBu ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v)		
HOMe	7,61	1,48
HOEt	6,08	0,59
(HOMe) ₂	6,73	0,67
SW 061 ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v)		
(HOEt) ₂	18,73	1,60
MK 391 MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w)		
bisPHE	29,96	1,53
bisETPHE	21,18	5,90
bisTOL ₂	25,90	5,91



Obrázek č.48 Chromatogramy analytu E4 (vlevo) a DiEtSULFON (vpravo) kolona QN AX tBu, MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w).

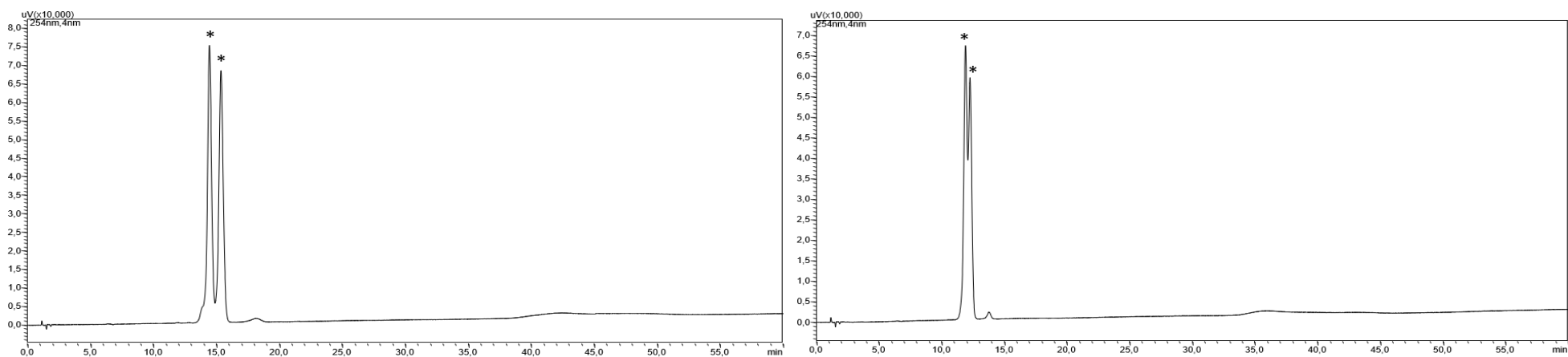
Enantiomery jsou v chromatogramech označeny hvězdičkou.



Obrázek č.49 Chromatogramy analytu DiEtAmSULF, kolona QN AX tBu, MF MeOH/AcA (200 mM, pH 6) (90:10) (v/v) (vlevo)

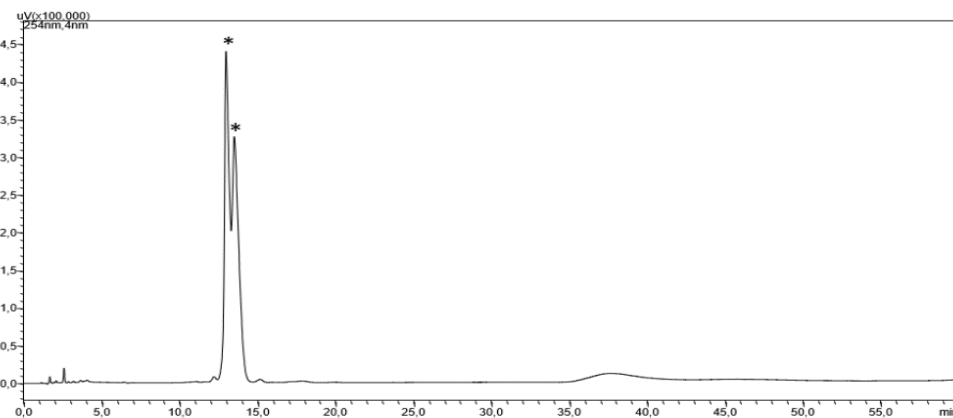
a analytu (HOEt)₂, kolona SW 061, MF ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v) (vpravo).

Enantiomery jsou v chromatogramech označeny hvězdičkou.



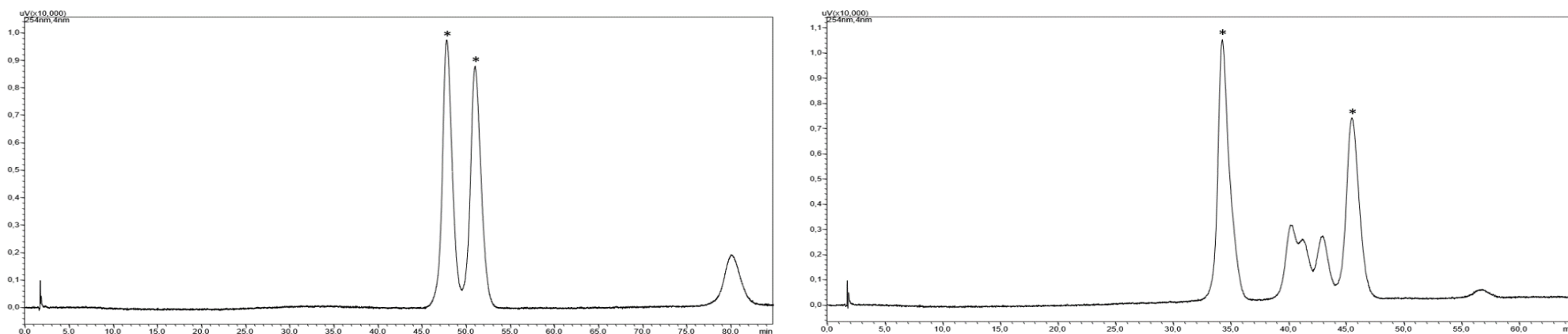
Obrázek č.50 Chromatogramy analytu HOME (vlevo) a HOEt (vpravo), kolona QN AX tBu, MF ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v).

Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.



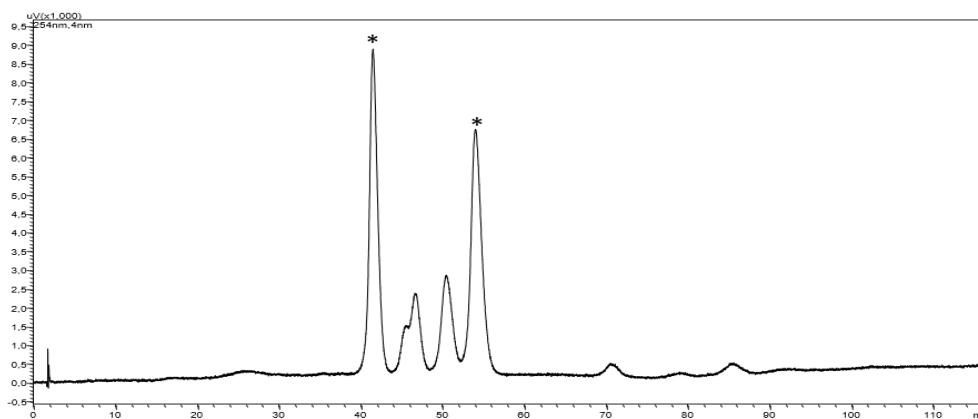
Obrázek č. 51 Chromatogram analytu (HOME)₂, kolona QN AX tBu, MF ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v).

Enantiomery jsou v chromatogramu označené hvězdičkou.



Obrázek č.52 Chromatogramy analytu bisPHE (vlevo) a bisEtPHE (vpravo), kolona MK 391, MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w).

Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.



Obrázek č.53 Chromatogram analytu bisTOL₂, kolona MK 391, MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w).

Enantiomery jsou v chromatogramu označené hvězdičkou.

6 Závěr

V této diplomové práci jsem se zabývala vlivem odlišných chirálních selektorů na účinnost separace látek ze skupiny bis(dikarbolidů) a 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů v systému HPLC.

V případě polysacharidových CSP bylo dosaženo lepších výsledků chirální separace u kolony celulózové. To je pravděpodobně dáno rozdílným uspořádáním amyložových a celulózových jednotek v prostoru. Nejvýhodnější MF při měření s celulózovou kolonou byla MF o složení ACN/ 50mM TEA pH 5. Při měření pomocí obou polysacharidových CSP byly pozorovány rostoucí hodnoty retenčních faktorů a rozlišení, se snižujícím se procentem organické složky v MF. Při porovnání způsobů navázání chirálního selektoru u amyložové kolony, byl pro naše analyty výhodnější selektor nanesený na silikagel. Použitím selektoru naneseného bylo dosaženo separací o vyšším rozlišením a kratšími retenčními časy než u selektoru imobilizovaného. Nízká schopnost separace imobilizovaných CSP je dána pravděpodobně narušením polysacharidové struktury v průběhu imobilizace. Enantioseparace pomocí chinidinových CSP byla testována na různých kolonách v reverzním a polárně-organickém módu. Jako nejvýhodnější kolona pro separaci našich analytů byla označena kolona QN AX tBu, jejímž použitím bylo dosaženo nejvyššího počtu separovaných analytů a jako na jediné se objevil náznak separace analytu ze skupiny 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů. V podmínkách kolony QN AX tBu s MF o složení MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) bylo dosaženo prvního případu rozdělení na základní linii analytu DiEtSULFON, látky důležité směrem k výzkumu inhibitorů karbonické anhydrázy.

Tato práce doplňuje předchozí diplomovou práci o cenná data na dalším typu polysacharidových chirálních stacionárních fází. Při srovnání výsledků obou experimentů je nejlepším chirálním selektorem pro separaci kobalt bis(dikarbolidů) tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulózy nanesený na silikagel. Dále má práce přináší nové poznatky o chirálních separacích na iontoměničových chirálních stacionárních fázích. Část dat byla využita pro sepsání publikace, která byla přijata do časopisu Journal of Chromatography A (IF 4,759) [61].

7 Seznam použitých zkratek

ACN acetonitril
BCC klastrové sloučeniny bóru
BNCT bórová neutronová záchyťová terapie
CSP chirální stacionární fáze
HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MeOH methanol
MF mobilní fáze
NP normální mód
PO polárně-organický mód
RP reverzní mód
SF stacionární fáze
SFC superkritická fluidní chromatografie
TEA triethylamin
Tris 2-amino-2-(hydroxy-methyl)-1,3-propandiol

8 Seznam obrázků

Obrázek č.1 Struktury izomerů efedrinu a pseudoefedrinu, převzato a upraveno z [4]
Obrázek č.2 Struktury (*S*)-butanolu (vlevo) a (*R*)-butanolu (vpravo), převzato a upraveno z [5]
Obrázek č.3 Struktura thalidomidu, převzato a upraveno z [9]
Obrázek č. 4 Tříbodový interakční model chirální separace, převzato a upraveno z [16]
Obrázek č.5 Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu, převzato a upraveno z [24].
Obrázek č.6 Struktura derivátů celulózy (vlevo) a amyulózy (vpravo), převzato a upraveno z [30]
Obrázek č.7 Struktura chirálního selektoru chinidinkarbámatu [38]
Obrázek č. 8 Struktura cyklodextrinů a odvozených CSP, převzato a upraveno z [15]
Obrázek č. 9 Struktura cyklofruktanu, převzato a upraveno z [40]
Obrázek č.10 Struktura crown-etherů, převzato a upraveno z [42]
Obrázek č.11 Chemické struktury makrocyclických antibiotik: vankomycin(A), teikoplanin(B), avoparcin (C), ristocetin (D) [43]

Obrázek č.12 Struktura dodekaborátu $(B_{12}H_{12})^{2-}$, převzato a upraveno z [46]

Obrázek č.13 Izomerní formy sloučenin karboranů, převzato a upraveno z [50]

Obrázek č. 14 Syntéza karboranových izomerů, převzato a upraveno z [50]

Obrázek č.15 Struktury sloučenin *nido*-karboranu $(C_2B_{10}H_{12})^-$ (vlevo) a metallakarboranu $[Co(C_2B_9H_{11})^{2-}]$ (vpravo), převzato a upraveno z [46]

Obrázek č.16 Zobrazení chirální struktury *nido*-karboranů (vlevo) a kobalt (bis)dikarbolidů (vpravo), převzato a upraveno z [54]

Obrázek č.17 Struktura lidokainu a jeho analogů borokainů, převzato a upraveno z [48]

Obrázek č.18 Činidla používaná v BNCT: *L-para*-dihydroxyborylfenylalanin (vlevo) a merkaptoundekahydro-*closo*-dodekaborát disodný (vpravo) [57]

Obrázek č. 19 První nanonosič na bázi karboranu [53]

Obrázek č.20 Struktury kolony *i*-Cellulose-5 (vlevo) a *i*-Amylose-1 (vpravo), převzato a upraveno z [59]

Obrázek č.21 QN AX *t*Bu, *tert*-butyl-carbamoyl-CHINIDIN, velikost částic 5 μ m, 150 x 4.6 mm

Obrázek č.22 MK 373 (216 μ mol /g silikagelu), triazol-methyl-carbamoyl-CHINIDIN, velikost částic 5 μ m 150 x 4.6 mm

Obrázek č.23 MK 391 (253 μ mol/g silikagelu), Allyl-carbamoyl-DIHYDROCHINIDIN, velikost částic 5 μ m ,150 x 4.6 mm

Obrázek č.24 SW 061 (286 μ mol /g silikagelu), Allyl-carbamoyl-DIHYDROCHINIDIN, velikost částic 5 μ m 150 x 4.6 mm

Obrázek č.25 SW 069 (157 μ mol /g silikagelu), Allyl-carbamoyl-DIHYDROCHINIDIN, velikost částic 5 μ m, 150 x 4.6 mm

Obrázek č.26 Graf závislosti retenčního faktoru 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů na % MeOH/ 50mM NaClO₄ v MF

Obrázek č.27 Graf závislosti retenčního faktoru kobalt bis(dikarbolidů) na % MeOH/ 50mM NaClO₄ v MF

Obrázek č.28 Grafy závislosti retenčních faktorů kobalt bis(dikarbolidů) (vlevo) a rozlišení (vpravo) na % ACN/ 50 mM NaClO₄ v MF

Obrázek č.29 Grafy závislosti retenčních faktorů kobalt bis(dikarbolidů) (vlevo) a rozlišení (vpravo) na % ACN/ 50 mM NaCl v MF

Obrázek č.30 Chromatogramy analytu F9 za podmínek ACN/ 50 mM NaClO₄ (50/50) (v/v) (vlevo) a ACN/ 50 mM NaCl (50/50) (v/v) (vpravo). Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.

Obrázek č.31 Chromatogramy vzorku bisPHE za podmínek ACN/ 50 mM NaCl (50/50) (v/v) (vlevo) a vzorku (HOEt)₂ za podmínek ACN/ 50 mM NaCl (40/60) (v/v) (vpravo). Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.

Obrázek č.32 Grafy závislosti retenčních faktorů kobalt bis(dikarbolidů) (vlevo) a rozlišení (vpravo) na typu aditiva v MF s MeOH

Obrázek č.33 Grafy závislosti retenčních faktorů kobalt bis(dikarbolidů) (vlevo) a rozlišení (vpravo) na typu aditiva v MF s ACN

Obrázek č.34 Chromatogramy analytu F9, MF ACN/TEA pH 5 (60/40) (v/v) (vlevo) a (50/50) (v/v) (vpravo). Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.

Obrázek č.35 Grafy závislosti retenčních faktorů (vlevo) a rozlišení (vpravo) na selektoru imobilizovaném či naneseném na silikagelu, MF o složení MF MeOH/ 50 mM NaClO₄ [60]. Název analytu obsahuje procentuální vyjádření obsahu MeOH v MF.

Obrázek č.36 Grafy závislosti retenčních faktorů (vlevo) a rozlišení (vpravo) na selektoru imobilizovaném či naneseném na silikagelu, MF o složení MF ACN/ 50 mM NaClO₄ [60]. Název analytu obsahuje procentuální vyjádření obsahu ACN v MF.

Obrázek č.37 Chromatogramy analytu CPENT za použití selektoru imobilizovaného s MF ACN/ 50 mM NaClO₄ (60/40) (v/v) (vlevo) a selektoru naneseného s MF ACN / 50 mM NaClO₄ (60/40) (v/v) (vpravo) [60]. Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.

Obrázek č. 38 Grafy závislosti retenčních faktorů 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů (vlevo) a kobalt bis(dikarbolidů) (vpravo) na složení MF, kolona MK 373. U analytů DiEtSULFON a DiEtAmSULF v MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w) nebylo dosaženo eluce do 90 minut.

Obrázek č.39 Graf závislosti rozlišení kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona MK 373

Obrázek č.40 Graf závislosti retenčního faktoru kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona SW 061

Obrázek č.41 Graf závislosti rozlišení kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona SW 061

Obrázek č.42 Graf závislosti retenčního faktoru kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona MK 391

Obrázek č.43 Graf závislosti rozlišení kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona MK 391

Obrázek č.44 Graf závislosti retenčního faktoru kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona SW 069

Obrázek č.45 Graf závislosti rozlišení kobalt bis(dikarbolidů) na složení MF, kolona SW 069

Obrázek č.46 Grafy závislosti retenčních faktorů 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů (vlevo) a kobalt bis(dikarbolidů) (vpravo) na složení MF, kolona QN AX tBU

Obrázek č. 47 Grafy závislosti rozlišení 7,8-dikarba-*nido*-undekaborátů (vlevo) a kobalt bis(dikarbolidů) (vpravo) na složení MF, kolona QN AX tBU

Obrázek č.48 Chromatogramy analytu E4 (vlevo) a DiEtSULFON (vpravo) kolona QN AX tBu, MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w). Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.

Obrázek č.49 Chromatogramy analytu DiEtAmSULF, kolona QN AX tBu, MF MeOH/AcA (200 mM, pH 6) (90:10) (v/v) (vlevo) a analytu (HOEt)₂, kolona SW 061, MF ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v) (vpravo). Enantiomery jsou v chromatogramech označené hvězdičkou.

Obrázek č.50 Chromatogramy analytu HOME (vlevo) a HOEt (vpravo), kolona QN AX tBu, MF ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v)

Obrázek č. 51 Chromatogram analytu (HOME)₂, kolona QN AX tBu, MF ACN/AcA (200mM, pH 6) (50:50) (v/v).

Obrázek č.52 Chromatogramy analytu bisPHE (vlevo) a bisEtPHE (vpravo), kolona MK 391, MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w).

Obrázek č.53 Chromatogram analytu bisTOL₂, kolona MK 391, MF MeOH/AcA/AcNH₄ (98:2:0,5) (v/v/w).

9 Seznam tabulek

Tabulka č.1 Příklady léčiv a jejich chiral-switchingu [6]

Tabulka č.2 Typy interakcí v chirální separaci [17]

Tabulka č.3 Přehled nejvíce používaných chirálních CSP, druhů interakcí, separačních podmínek a typů analytů [1, 17, 25, 26, 27,28, 29]

Tabulka č.4 Seznam analytů s jejich systematickým názvem a strukturním vzorcem.

Tabulka č.5 Nejlepší podmínky pro separaci vzorků pomocí chinidinových kolon

10 Seznam použité literatury

- [1] SNYDER, L. R.; et al. *Introduction to modern liquid chromatography*. Third Ed., Wiley, Hoboken New Jersey 2010. ISBN 978-470-6754-0.
- [2] NGUYEN, L. A.; et al. Chiral Drugs: An Overview. *Int. J. Biomed. Sci.*, **2006**, 2, 85–100.
- [3] MCMURRY, J. E. *Organic Chemistry*, 8. vyd.; Cengage Learning: Boston 2008; 142-173. ISBN 978-0-8400-5444-9.
- [4] GUO-QIANG, L.; QI-DONG, Y., JIE-FEI, Ch. (Eds) *Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action*, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey 2011. ISBN 978-0-470-58720-1.
- [5] KALSI, P. *Stereochemistry Conformation and Mechanism*. New Age International, 2008. ISBN 8122423566.
- [6] KASPRZY-HORDERN, B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39(11), 4466-4503.
- [7] MAIER, N. M.; et al. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 906, 3-33.
- [8] ZHANG, Y.; et al. Enantioselective chromatography in drug discovery. *Drug discovery today*, **2005**, 10.8: 571-577.
- [9] BLASER, H. Chirality and its implications for the pharmaceutical industry. *Rendiconti Lincei*, **2013**, 24.3: 213-216.
- [10] GAL, J. Molecular Chirality: Language, History, and Significance. *Differentiation of Enantiomers I*. Cham: Springer International Publishing, **2013**, 340, 1-20.
- [11] AGRANAT, I.; CANER, H. Intellectual property and chirality of drugs. *Drug discovery today*, **1999**, 4.7: 313-321.
- [12] CALCATERRA, A.; et al. The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2018**, 147, 323-340.
- [13] EASSON, L. H.; STEDMAN, E. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochem. J.*, **1933**, 27.4: 1257.
- [14] WILCOX, P. E.; et al. Chemical Preparation of Asymmetrically Labeled Citric Acid1. *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72.11: 5019-5024.

- [15] LÄMMERHOFER, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, 814–856.
- [16] GOGOI, A.; et al. Enantiomeric recognition and separation by chiral nanoparticles. *Molecules*, **2019**, 24.6: 1007.
- [17] NOVÁKOVÁ, L.; et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi, 1.díl*, 1.vyd. Europrint a.s., Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [18] GRYBINIK, S.; BOSAKOVA, Z. An overview of chiral separations of pharmaceutically active substances by HPLC (2018–2020). *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, **2021**, 152.9: 1033-1043.
- [19] WEST, C. Recent trends in chiral supercritical fluid chromatography. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2019**, 120: 115648
- [20] PŁOTKA, J. M.; et al. Pharmaceutical and forensing drug applications of chiral supercritical fluid chromatography. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2014**, 56:74-89.
- [21] KLIMEŠ, J.; et al. *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.
- [22] *Český lékopis 2017*; Grada Publishing, a.s.; Praha, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [23] KAZAKEVICH, Y; LOBRUTTO, R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007. ISBN 978-0-471-68162-5.
- [24] CZAPLICKI, S. Chromatography in bioactivity analysis of compounds. *Column chromatogr.* **2013**, 99-122.
- [25] ALI, I.; et al. Polysaccharides chiral stationary phases in liquid chromatography. *Sep. Purif. Rev.*, **2009**, 38.2: 97-147.
- [26] SCRIBA, G. K. E. Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences: Mechanisms and modern chiral stationary phases. *Chromatographia*. **2012**, 75, 815-838.
- [27] MANDL, A.; et al. Quinine-versus carbamoylated quinine-based chiral anion exchangers: A comparison regarding enantioselectivity for N-protected amino acids and other chiral acids. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 858.1: 1-11.

- [28] HETTEGGER, H.; et al. Novel carbamoyl type quinine and quinidine based chiral anion exchangers implementing alkyne–azide cycloaddition immobilization chemistry. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1337: 85-94.
- [29] TEIXEIRA, J.; et al. Chiral Stationary Phases for Liquid Chromatography: Recent Developments. *Molecules* **2019**, *24*, 865.
- [30] TACHIBANA, K.; OHNISHI, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 906.1-2: 127-154.
- [31] CHANKVETADZE, B. Recent trends in preparation, investigation and application of polysaccharide-based chiral stationary phases for separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2020**, 122: 115709.
- [32] SHEN, J.; et al. Synthesis and application of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparation by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1363: 51-61.
- [33] MAISURADZE, M.; et al. Chromatographic and thermodynamic comparison of amylose tris (3-chloro-5-methylphenylcarbamate) coated or covalently immobilized on silica in high-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of select chiral weak acids. *J. Chromatogr. A*, **2019**, 1602: 228-236.
- [34] LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonan carbamates and their application as chiral anion exchangers. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 741.1: 33-48.
- [35] GYIMESI-FORRÁS, K.; et al. Enantiomer separation of imidazo-quinazoline-dione derivatives on quinine carbamate-based chiral stationary phase in normal phase mode. *Chirality*, **2009**, 21.1: 199-207.
- [36] KACPRZAK, K. M.; LINDNER, W. Novel Pirkle-type quinine 3, 5-dinitrophenylcarbamate chiral stationary phase implementing click chemistry. *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34.18: 2391-2396.
- [37] ARNELL, R.; et al. Adsorption behaviour of a quinidine carbamate-based chiral stationary phase: Role of the additive. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216.16: 3480-3487.

- [38] ASNIN, L.; GUIOCHON, G. Chromatographic separation of phenylpropanol enantiomers on a quinidine carbamate-type chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1091.1-2: 11-20.
- [39] GÖTMAR, G.; et al. Adsorption of the enantiomers of 2, 2, 2-trifluoro-1-(9-anthryl)-ethanol on silica-bonded chiral quinidine-carbamate. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1059.1-2: 43-52.
- [40] SUN, P., et al. Development of New HPLC Chiral Stationary Phases Based on Native and Derivatized Cyclofructans. *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 10215-10226.
- [41] PAIK, M., et al. Development and application of chiral crown ethers as selectors for chiral separation in high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1274: 1-5.
- [42] CHOI, H. J.; HYUN, M. H. Liquid chromatographic chiral separations by crown ether-based chiral stationary phases. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2007**, 30.5-7: 853-875.
- [43] WARD, T. J.; FARRIS III A.B. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review. *J. Chromatogr. A*, **2001**, *906*, 73-89.
- [44] CIANI, L.; RISTORI, S. Boron as a platform for new drug design. *Expert opin. on drug discovery*, **2012**, 7.11: 1017-1027.
- [45] SORIANO-URSÚA, M., et al. Boron-containing compounds: chemico-biological properties and expanding medicinal potential in prevention, diagnosis and therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2014**, *vol. 24*, 485–500.
- [46] FINK, K.; UCHMAN, M. Boron cluster compounds as new chemical leads for antimicrobial therapy. *Coord. Chem. Rev.*, **2021**, *431*: 213684.
- [47] HORÁKOVÁ, H.; et al. Emerging Subject for Chiral Separation Science: Cluster Boron Compounds. *Chirality*, **2011**, *23*, 307–319.
- [48] LESNIKOWSKI, Z. J. Challenges and Opportunities for the Application of Boron Clusters in Drug Design. *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 7738–7758.
- [49] ALI, F; et al. Boron chemistry for medical applications. *Molecules*, **2020**, *25.4*: 828.
- [50] SCHOLZ, M.; et al. Carbaboranes as Pharmacophores: Properties, Synthesis, and Application Strategies. *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 7035–7062.
- [51] VALLIANT, J. F.; et al. The medicinal chemistry of carboranes. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, *232*, 173-230.

- [52] LEŚNIKOWSKI, Z. J. Recent developments with boron as a platform for novel drug design. *Expert Opin. Drug Discovery*, **2016**, 11.6: 569-578.
- [53] ZHU, Y.; HOSMANE, N. S. Advanced carboraneous materials. *J. Organomet. Chem.*, **2017**, 849: 286-292.
- [54] PLEŠEK, J. The age of chiral deltahedral borane derivatives. *Inorg. Chim. Acta*, **1999**, 289.1-2: 45-50.
- [55] STOCKMANN, P., et al. New keys for old locks: Carborane-containing drugs as platforms for mechanism-based therapies. *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, 48.13: 3497-3512.
- [56] ISSA, F.; et al. Boron in drug discovery: carboranes as unique pharmacophores in biologically active compounds. *Chem. Rev.*, **2011**, 111.9: 5701-5722.
- [57] SIVAEV, I. B.; BREGADZE, V. V. Polyhedral boranes for medical applications: current status and perspectives. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, 2009.11: 1433-1450.
- [58] SPOKOYNY, A. M.; et al. Electronic Tuning of Nickel-Based Bis (dicarbollide) Redox Shuttles in Dye-Sensitized Solar Cells. *Angew. Chem.*, **2010**, 122.31: 5467-5471.
- [59] New immobilized Lux i-Amylose-1 and i-Cellulose-5 columns add enantioselectivity and solvent robustness. *Phenomenex* [online]. [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://phenomenex.blog/2017/06/20/new-immobilized-lux-i-amyllose-1-and-i-cellulose-5-columns-add-enantioselectivity-and-solvent-robustness/>
- [60] MARVALOVÁ, J. Využití HPLC v chirálních separacích VI. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2021.
- [61] HORÁČEK, O.; et al. Reversed-phase Chromatography as an effective tool for the chiral separation of anionic and zwitterionic carboranes using polysaccharide-based chiral selectors. *J. Chromatog. A*, **2022**, 463051.