

# 1 ÚVOD

V posledních desetiletích dvacátého století se podařilo objevit mnoho stereoselektivních reakcí, díky kterým jsme schopni synteticky připravit čisté enantiomery řady látek, majících široké využití v nejrůznějších oblastech lidského života.

Tento způsob přípravy, tzv. asymetrická syntéza, umožňuje přímou syntézu enantiomerů za použití vhodných katalyzátorů, jimiž bývají opticky aktivní látky. Předpokladem úspěšného použití organických katalyzátorů v asymetrické syntéze je vedle jejich vhodného prostorového uspořádání i jejich dostatečná konformační stabilita (odolnost vůči racemizaci).

Mezi významné katalyzátory asymetrických reakcí patří deriváty binaftylu, jejichž použití jako asymetrických katalyzátorů je velmi rozsáhlé. Binaftyly se vyznačují pozoruhodnými vlastnostmi chirálního rozpoznávání prameníci z jejich chiralita, prostorového uspořádání a rigidní struktury. Většina molekul 1,1'-binaftylu je  $C_2$  symetrická se dvěma identickými substitučními skupinami, které bývají často umístěny v polohách 2 a 2'. Chiralita derivátů 1,1'-binaftylu je dána stericke bráněnou rotací atomů nebo skupin atomů kolem jednoduché vazby binaftylového skeletonu (axiální chiralita, atropisomery). S velikostí racemizační bariéry roste pravděpodobnost využití binaftylů v enantioseparacích [1]. Z významných zástupců 2,2'-disubstituovaných derivátů 1,1'-binaftylu lze jmenovat 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl (1,1'-bi-2,2'-naftol, OBIN, BINOL) [2-5], 2,2'-diamino-1,1'-binaftyl (BINAM) a 2,2'-bis(difenylfosfino)-1,1'-binaftyl (BINAP) [6,7]. Kromě přípravy binaftylových derivátů s nestejnými substituenty nebo substituenty lokalizovanými v různých polohách [8] se snaha organických chemiků zaměřila na posun klasické 1,1'-chirální osy do jiných poloh [9]. Důraz je vždy kladen na vytvoření stabilní chirální látky s vysokým stupněm optické čistoty.

Cyklodextriny (CD) a polysacharidy jsou přírodní oligomery a polymery, jejichž základními stavebními jednotkami jsou glukosové jednotky. CD a polysacharidy a jejich deriváty byly s úspěchem použity jako chirální stacionární fáze (CSP) pro enantioselektivní separace velkého počtu strukturně odlišných látek [10].

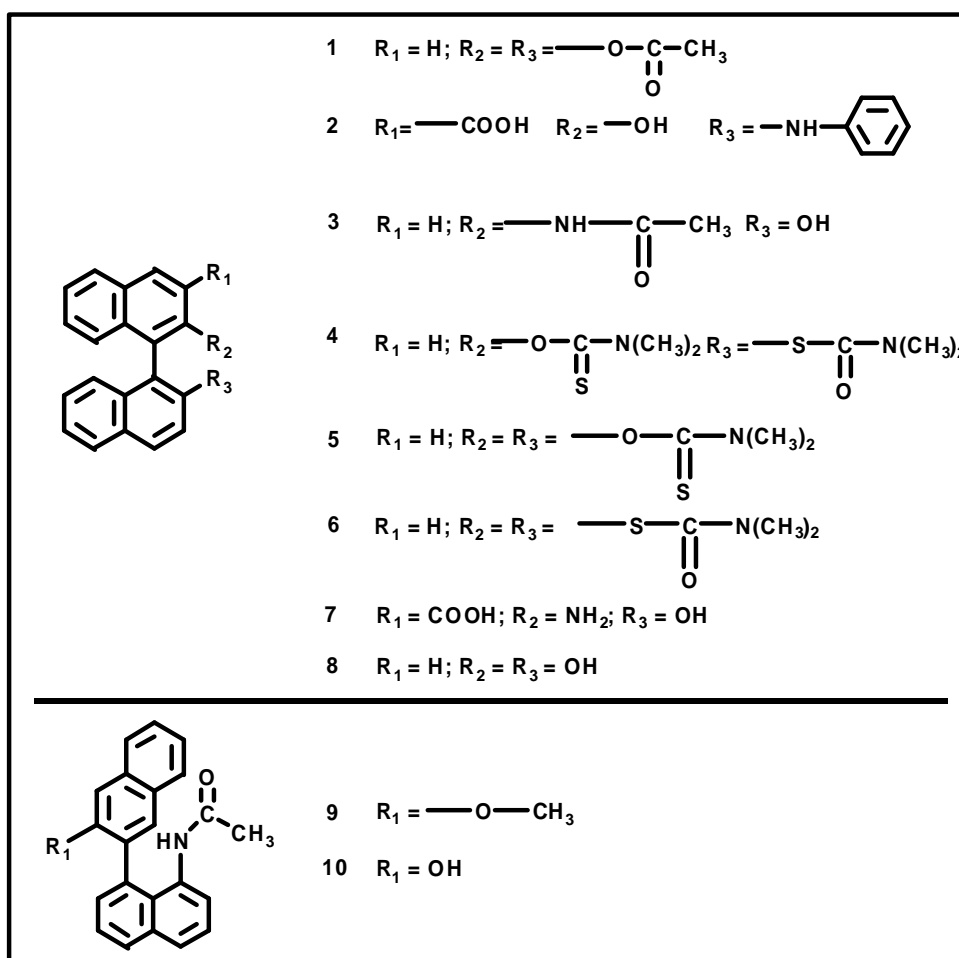
Velmi často se cyklodextrinové CSP používají v reverzním módu, kde v mechanismu enantioselektivního rozpoznávání převládá inkluze nepolární části analytu do kavity CD. Rozměry kavity  $\beta$ -CD jsou vhodné pro substituované fenylové a naftylové skupiny, a proto je retence disubstituovaných binaftylů pravděpodobná. V normálním módu jsou upřednostňovány spíše vodíkové vazby a  $\pi$ - $\pi$  interakce, zatímco v polárně-organickém módu je podstatou enantioseparace tvorba vodíkových můstků mezi chirálním analytem a funkčními skupinami nativních nebo derivatizovaných CD. [11,12] Mezi CSP na bázi polysacharidových derivátů vyniká schopnostmi chirálního rozpoznávání *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy [13,14]. Chirální rozpoznávání je založeno na stereogenním fitu enantiomerů do chirálních kavit chirálního selektoru a tato enantioselektivní interakce je stabilizována dalšími interakcemi jako jsou vodíkové vazby,  $\pi$  -  $\pi$  interakce, dipól- dipólové interakce a stérické efekty [13].

Kromě přírodních polymerních chirálních selektorů mohou poskytnout srovnatelné separační podmínky zcela syntetické polymery. Polymerní CSP mají celou řadu atraktivních znaků jako je vytvoření dobře definovaného chirálního prostředí, strukturní a chemická variabilita, nebo možnost přípravy obou enantiomerních verzí dané CSP [15]. Pro přípravu polymerních CSP byly použity nejméně čtyři postupy [16]. Tři nové syntetické polymerní CSP založené na *trans*-1,2-diaminocyklohexanu (P-CAP), *trans*-1,2-difenylethyldiaminu (P-CAP-DP) a *trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11*S*,12*S*)-11,12-dikarboxylové kyselině (DEABV) byly připraveny radikálově iniciovanou polymerizací [15,17,18]. P-CAP CSP má poměrně rigidní strukturu a neobsahuje žádné aromatické skupiny, takže v mechanismu chirálního rozpoznávání převažují H-vazby. Každý monomer stacionární fáze P-CAP-DP obsahuje dvě aromatické jednotky a konformace monomeru je flexibilní. Na chirálním rozlišení analytů se podílejí také  $\pi$ - $\pi$  interakce. DEABV CSP obsahuje množství amidových vazeb a aromatických skupin, a proto vodíkové vazby, dipolární a  $\pi$ - $\pi$  interakce hrají velkou roli v procesu chirálního rozpoznávání. Všechny tři polymerní CSP jsou vzájemně komplementární [15,17,18]. Další výhodou těchto CSP je vysoká dávkovací kapacita a možnost provádět separace v semipreparativním nebo preparativním měřítku.

Literatura týkající se binaftylových derivátů je sice velmi rozsáhlá, zabývá se především syntézou derivátů. Chromatografické separace jsou zmiňovány obvykle okrajově a přesné separační podmínky mnohdy schází. Přitom chromatografie je k rychlému zjištění čistoty připravené látky nebo k předpovězení velikosti racemizační bariéry velice vhodná. V literatuře byly zmíněny separace na amylosových nebo celulosových CSP především v normálním módu [13,19-23]. Nedávno byla publikována práce zabývající se separacemi OBINu, 2,2'-diamino-1,1'-binaftalenu a 1,1'-bi-2-naftol bis(trifluoromethansulfonátu) na nových syntetických chirálních stacionárních P-CAP, P-CAP-DP, DEABV a DPEVB [24].

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo studium chromatografického chování sady 2,2'-disubstituovaných a 2,3,2'-trisubstituovaných 1,1'-binaftyků a 3,8'-disubstituovaných 1,2'-binaftylových derivátů na třech rozdílných typech CSP, jmenovitě na bázi cyklodextrinu, derivatizované celulosy a syntetických polymerů. Na základě získaných dat byly diskutovány enantioselektivní separační mechanismy.



Obr. 1: Struktura binaftylových derivátů studovaných v předkládané disertační práci.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1 Studium vlivu experimentálních podmínek na retenci a enantioseparaci sady nově syntetizovaných disubstituovaných binaftylů

##### Separace na $\beta$ -cyklodextrinové CSP

Retenční a enantioseparační chování sady binaftylových derivátů bylo sledováno jak v normálním, tak v reverzním separačním systému. Jako první byl testován normální mód (NP) s binární mobilní fází (MF) *n*-hexan/propan-2-ol. I přes to, že retence analytů s rostoucím podílem *n*-hexanu v MF rostla, nebyl pozorován náznak enantioseparace žádného z analytů.

Reverzní separační mód byl realizován binární mobilní fází obsahující organický modifikátor (OM), kterým byl buď acetonitril (ACN), nebo methanol (MeOH), ve směsi s vodou nebo vodným roztokem triethylaminoctanového (TEAA) pufru, pH 3,0 nebo 6,0. Pokud byl ACN použit jako složka MF, všechny analyty eluovaly s mrtvým časem, proto byl nahrazen methanolem. Vysoký obsah methanolu (50 - 100 obj. %) v MF vedl ke krátké retenci bez pozorované enantioseparace. S klesajícím množstvím MeOH se prodlužovala retence analytů, která byla v některých případech doprovázena enantioseparací. V mobilní fází MeOH/voda 30/70 (*v/v*) eluovaly všechny analyty kromě látky **2** (obr. 1) v rozmezí 6 až 12 minut. Ze skupiny 1,1'-binaftylů byla částečná enantioseparace pozorována pouze u analytu **1** (viz tab. 1). Nejlepších hodnot chirálního rozlišení 8,3'-disubstituovaných-1,2'-binaftylů bylo dosaženo v mobilní fází složené z MeOH/voda 30/70 (*v/v*) a 20/80 (*v/v*) pro **9** resp. **10**.

Nahrazení vody 0,5% vodným roztokem TEAA pufru, pH 3,0 nebo 6,0, vedlo k poklesu retence zejména při nižší hodnotě pH pufru, což lze přičíst účinnějšímu omezení silanofilních interakcí analytu se silikagelovým nosičem  $\beta$ -CD. Tyto interakce jsou charakteristické pro tento typ chirálních kolon. Symetrie píků, rozlišení a účinnost kolony nebyly změnami ve složení mobilní fáze významně ovlivněny.

Tab. 1: Retenční parametry binaftylových derivátů separovaných na  $\beta$ -cyklodextrinové chirální stacionární fázi, mobilní fáze MeOH/voda, průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

MeOH/H <sub>2</sub> O (v/v)	20/80			30/70		
	<i>k</i> <sub>1</sub>	<i>R</i>	$\alpha$	<i>k</i> <sub>1</sub>	<i>R</i>	$\alpha$
<b>1</b>	2,9	0,5	1,2	0,8	0,2	1,1
<b>9</b>	2,5	0,5	1,3	1,1	0,9	1,1
<b>10</b>	2,1	2,2	1,3	1,1	0,4	1,2

### Separace na hydroxypropylether- $\beta$ -cyklodextrinové CSP

Z výsledků naměřených na  $\beta$ -CD CSP vyplývá, že tato CSP není vhodná k enantioseparaci studovaných látek. V mobilních fázích reverzního módu dochází k tvorbě silných inkluzních komplexů, které ale nemají stereodiskriminační charakter. V dalších měřeních byl použit hydroxypropylether- $\beta$ -cyklodextrin (HP- $\beta$ -CD) jako chirální selektor. Hydroxylová skupina je navázána na druhý uhlíkový atom glukosové jednotky, čímž dochází jak ke zvětšení molekuly substituovaného cyklodextrinu, tak ke zvýšení počtu interakčních možností pro analyty (stérické repulse, vodíkové vazby).

#### *Normální separační mód*

Jako první byl opět studován NP mód s obdobným složením mobilních fází jako u  $\beta$ -CD CSP. Retenční faktory analytů byly na HP- $\beta$ -CD CSP vyšší, doprovázené lepší symetrií píků než v případě  $\beta$ -CD CSP. Enantioseparace však nebyla pozorována ani na koloně HP- $\beta$ -CD. NP mód by byl vhodný pro achirální separace směsí binaftylových derivátů; ty se mohou vyskytnout během procesu asymetrické syntézy – požadovaná látka může být doprovázena dalšími vedlejšími produkty.

#### *Reverzní separační mód*

S ohledem na výsledky dosažené na  $\beta$ -CD CSP v mobilní fázi ACN/voda, nebylo toto složení MF proměřováno/studováno na HP- $\beta$ -CD CSP. Binární mobilní fáze se skládala ze směsi MeOH/voda s obsahem MeOH mezi 30 - 40 %. S rostoucím obsahem MeOH v mobilní fázi docházelo ke zkracování retence analytů a současnému potlačení enantioseparace. Retence analytů byla ve většině případů vyšší na HP- $\beta$ -CD

koloně než na  $\beta$ -CD CSP. Navzdory vyšší retenci a lepší symetrii píků nevedla měření na hydroxypropylether- $\beta$ -cyklodextrinové CSP k enantioseparaci všech analytů.

Analyt **1** jako zástupce disubstituovaných 1,1'-binaftylů byl chirálně rozdělen ve 23 minutách s hodnotou rozlišení  $R = 1,0$  a byla pozorována částečná enantioseparace analytů **2**, **4** a **8**. Oba zástupci skupiny 8,3'-disubstituovaných 1,2'-binaftylů se rozdělily v MF složené z MeOH/vody 30/70 (v/v) s hodnotami chirálního rozlišení  $R = 1,1$  pro analyt **9** a  $R = 1,9$  pro analyt **10**.

Nahrazení vody roztokem TEAA pufru, pH 3,0 nebo 6,0, mělo za následek zkrácení retence a současné zhoršení symetrie píků všech studovaných látek. Jediný analyt **9** dosáhl nejvyšší hodnoty enantiorozlišení ( $R = 1,5$ ) v MF obsahující TEAA pufr, pH 3,0. Symetrie píků této látky se ovšem zhoršila.

#### Závěr:

Chirální stacionární fáze na bázi  $\beta$ -cyklodextrinu se neosvědčily pro enantioseparace studovaných analytů – separovalo se na nich malé množství látek s poměrně nízkými hodnotami chirálního rozlišení. Tyto chirální selektory mohou být s úspěchem použity pro separace směsí binaftylových derivátů vznikajících v průběhu syntézy v reakční směsi.

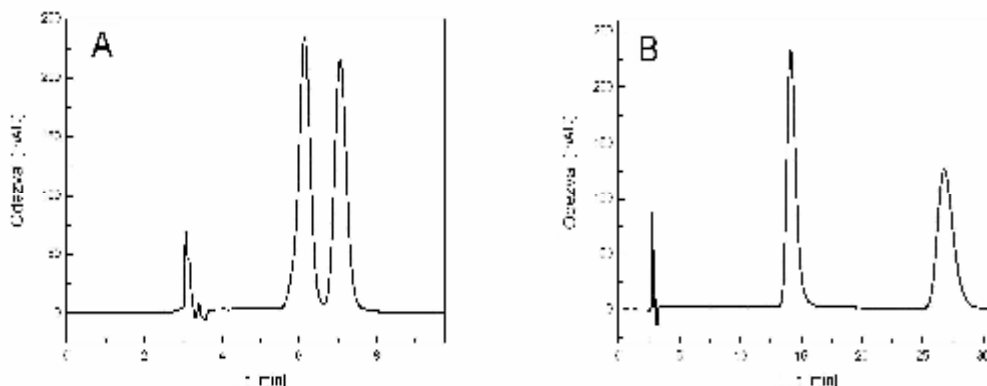
### 3.2 Chirální stacionární fáze na bázi *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy jako účinný nástroj pro HPLC separace strukturně odlišných disubstituovaných binaftylů

Mezi celulosovými CSP vyniká vysokou schopností chirálního rozpoznávání CSP založená na *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy. Vzhledem k tomu, že použitelnost pokrytých verzí celulosových CSP v mobilních fázích o různých polaritách je omezena [25], byly testovány dvě CSP na bázi *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy – jedna určena přímo pro normální separační mód a druhá pro reverzní separační mód.

#### *Normální separační mód*

Vzhledem k literárním údajům [13] byl NP mód vybrán jako první pro studium retenčního a enantioseparačního chování 1,1'- a 1,2'- binaftylových derivátů. Mobilní fáze byly tvořeny směsí *n*-hexanu a propan-2-olu v různých objemových zastoupeních. Objem propan-2-olu se pohyboval v rozmezí 5 - 80 obj. %. Vyšší zastoupení propan-2-olu v MF vedlo k nižší retenci všech analytů. Enantioseparace čtyř analytů (**1**, **4**, **9**, **10**) byla pozorována v MF složené z *n*-hexan/propan-2-olu 95/5 (v/v); z nich tři analyty se separovaly až na základní linii. Separace na základní linii analytu **4** probíhala ve velmi krátkém čase už v MF obsahující 20 % obj. propan-2-olu (obr. 2A). Oba zástupci disubstituovaných 1,2'-binaftylů vykazovaly v porovnání s 1,1'-binaftily delší retenční časy (zejména analyt **9**) a výrazně vyšší hodnoty enantiorozlišení (obr. 2B), které nebyly změnami ve složení MF výrazně ovlivňovány.





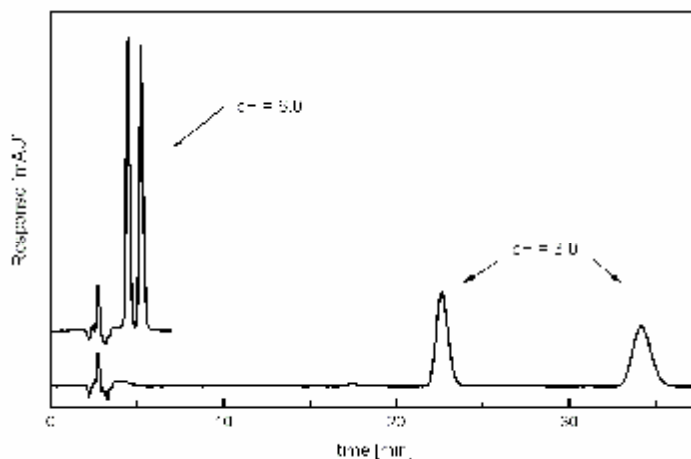
Obr. 2: Enantioseparace analytu **4** (A) a analytu **9** (B) na CSP založené na *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy. Experimentální podmínky: kolona Chiralcel OD-H, mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol 80/20 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

### *Reverzní separační mód*

Mobilní fáze v reverzním separačním módu byly tvořeny směsí acetonitrilu a vody nebo 20 mM fosfátového pufru, pH 3,0 nebo 6,0. Množství ACN se pohybovalo v rozmezí 80 – 30 obj. %. Nižší obsah ACN v mobilní fázi vedl k nárůstu retence všech analytů, zejména látky **1**, **4**, **5**, **6**, **8** a **9** vykazovaly velmi dlouhou retenci již v MF obsahující 40 nebo 30 % ACN. Delší retence byla u většiny analytů spojena jak s vyšší enantioselektivitou, tak s vyšším rozlišením. U analytů **2**, **5**, **6** a **8** nebyl pozorován ani náznak enantioseparace v mobilních fázích ACN/voda. Naproti tomu oba zástupci skupiny 8,3'-disubstituovaných 1,2'-binaftylů (**9** a **10**) byly rozděleny na základní linii už v MF obsahující 80 % ACN. Značnou citlivost vůči poměru ACN/voda vykazoval analyt **7**, nesoucí ve své struktuře skupiny schopné poskytovat i akceptovat vodíkovou vazbu.

Retenční chování analytů v pufrovaných mobilních fázích, pH 3,0 nebo 6,0, vykazovalo obdobné trendy jako v případě mobilních fází ACN/H<sub>2</sub>O, tj. nižší obsah ACN vedl k delší retenci analytů doprovázené pro většinu i vyššími hodnotami chirálního rozlišení. Vliv pH fosfátového pufru je uveden na obr. 3. Vyšší retence a

vyšší hodnoty enantiozlišení byly pozorovány v mobilních fázích obsahujících pufr o nižší hodnotě pH (viz tab. 2).



Obr. 3: Chromatogram enantioseparace analytu **7**, Chiralcel OD-RH (150 x 4.6 mm I.D.), ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0 nebo 6,0, 40/60 (v/v); průtoková rychlost 0,7ml/min, UV detekce 254 nm.

Tab. 2: Vliv množství acetonitrilu a pH vodné složky MF na chromatografické chování binaftylových derivátů na CSP na bázi *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy; mobilní fáze ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0, ve třech objemových poměrech, Chiralcel OD-RH, průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

Analyt	ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0								
	60/40			50/50			40/60		
	$k_1$	$R$	$\alpha$	$k_1$	$R$	$\alpha$	$k_1$	$R$	$\alpha$
<b>1</b>	2,74	0,63	1,05	6,56	0,72	1,05	10,48	1,79	1,13
<b>2</b>	1,12	0,00	1,00	2,91	0,59	1,05	13,90	0,74	1,10
<b>3</b>	0,79	1,25	1,16	1,60	1,66	1,14	4,65	2,14	1,15
<b>4</b>	4,77	0,95	1,06	11,59	1,09	1,07	x	x	x
<b>5</b>	5,14	0,00	1,00	16,72	0,00	1,00	x	x	x
<b>6</b>	3,13	0,00	1,00	8,10	0,00	1,00	x	x	x
<b>7</b>	1,02	4,37	1,55	2,30	5,64	1,55	7,12	6,93	1,58
<b>8</b>	1,43	0,00	1,00	3,27	0,00	1,00	10,32	0,00	1,00
<b>9</b>	2,74	4,41	1,37	5,62	4,87	1,37	16,50	4,96	1,38
<b>10</b>	1,35	3,68	1,41	2,70	4,46	1,40	7,05	4,96	1,42

x – retenční čas analytů byl delší než 120 min.

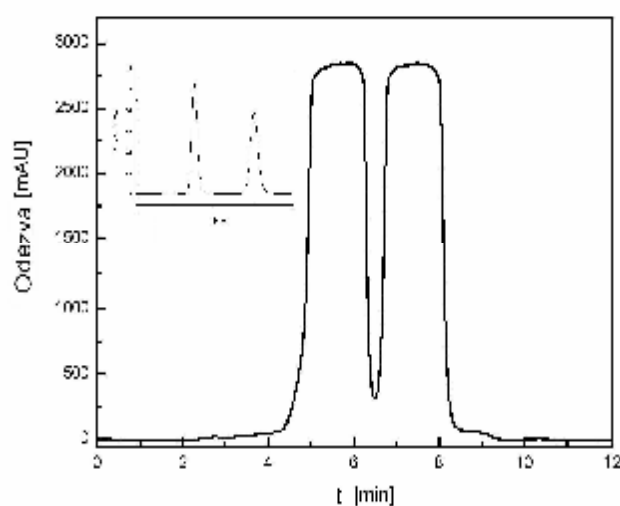
Ze srovnání výsledků získaných v pufrovaných a nepufrovaných mobilních fázích obsahujících stejný podíl ACN vyplývá, že rozdíly v retenci a enantioseparaci jsou nejvíce patrné v MF s nejnižším podílem ACN (40 obj. %) a při nižší hodnotě pH (3,0). Tyto rozdíly se nejvíce projeví u analytů **1**, **2** a **7**. Vyšší chirální rozlišení těchto látek bylo získáno v pufrované MF (pH 3,0), zatímco retenční faktory byly ovlivněny odlišně. Retence analytu **1** v MF obsahující fosfátový pufr, pH 3,0, klesla za současného nárůstu hodnot chirálního rozlišení. Analyty **2** a **7** obsahují ve své struktuře skupiny schopné tvorby H-vazeb. Právě vodíkové vazby jsou stereoselektivní a s růstem jejich síly dochází k zlepšení enantioseparace v separačním systému s *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátem) celulosy jako chirálním selektorem a s MF pufrovanou na hodnotu pH 3,0. Síla vodíkových vazeb je ovlivněna také množstvím organického modifikátoru přítomného v MF, a proto se rozdíly v enantioseparaci více projeví v MF obsahující nižší obsah ACN. Při porovnání separačního chování analytů **2** a **7** v korespondujících mobilních fázích je zřejmé, že objemný aromatický substituent aminoskupiny ležící v blízkosti hydroxylové skupiny analytu **2** výrazně snižuje sílu stereoselektivních H-vazeb. Tento fakt dokládají vyšší hodnoty retence a nižší hodnoty rozlišení analytu **2** oproti látce **7** (tab. 2). Analyty **5**, **6** a **8** se nepodařilo ani částečně rozdělit v žádné z testovaných mobilních fází. Struktura těchto látek je vysoce symetrická a separace takových látek je velmi obtížná.

8,3'-Disubstituované 1,2'-binaftyly se ve všech mobilních fázích separovaly na základní linii. Změny ve složení MF ovlivňovaly retenční chování těchto látek, enantiomerní rozlišení však stále dosahovalo vysokých hodnot. Prostorové uspořádání těchto derivátů pravděpodobně umožňuje jejich lepší „fit“ do chirálních kavit *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy. Substituenty naftylového kruhu, zejména v poloze 8, pak poskytují doplňkové stereoselektivní interakce.

Z výsledků získaných v reverzním separačním módu vyplývá, že analyty **1**, **2** a **7** se nejlépe separovaly v MF složené z ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0, 40/60 (v/v). Látky **3**, **9** a **10** upřednostňovaly MF obsahující ACN/voda 40/60 (v/v) a pro analyt **4** byla nejvýhodnější MF složená ze směsi ACN/voda v poměru 1:1.

Vysoké hodnoty rozlišení analytů **9** a **10** v MF ACN/voda umožňují přímé použití této metody v semipreparativním měřítku. Mobilní fáze použitá pro tyto

analyty byla ACN/voda 60/40 (v/v) jako výsledek kompromisu mezi požadavky na rozpustnost analytu, jeho retenci a enantiozlišení. Semipreparativní měřítko bylo aplikováno také pro analyt **7**, ovšem složení MF bylo lehce pozměněno na ACN/0,1% octová kyselina, pH 3,3, 60/40 (v/v). Různé objemy zásobních roztoků analytů **7**, **9** a **10** (10, 50 a 100  $\mu$ l) o jednotné koncentraci 5,0 mg/ml byly dávkovány na kolonu. Dostatečné enantiozlišení bylo zachováno až do 50  $\mu$ l nastříkovaného objemu (viz obr. 4).



Obr. 4: Separace analytu **7** v semipreparativním měřítku; Chiralcel OD-RH (150 x 4.6 mm I.D.), ACN/1% HAc, pH 3,3, 60/40 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

Dávkované množství analytu 250  $\mu$ g (koncentrace zásobního roztoku analytu 5,0 mg/ml, objem vzorku 50  $\mu$ l). Ve výřezu je ukázána enantioseparace analytu **7** při analytických podmínkách – koncentrace vzorku 0,5 mg/ml, dávkovaný objem vzorku 10  $\mu$ l.

#### Závěr:

V reverzním separačním módu bylo na atropisomery rozděleno sedm látek z deseti studovaných. S nejvyššími hodnotami rozlišení byly ve všech testovaných mobilních fázích separovány analyty **9** a **10**. Struktura těchto analytů zřejmě dobře

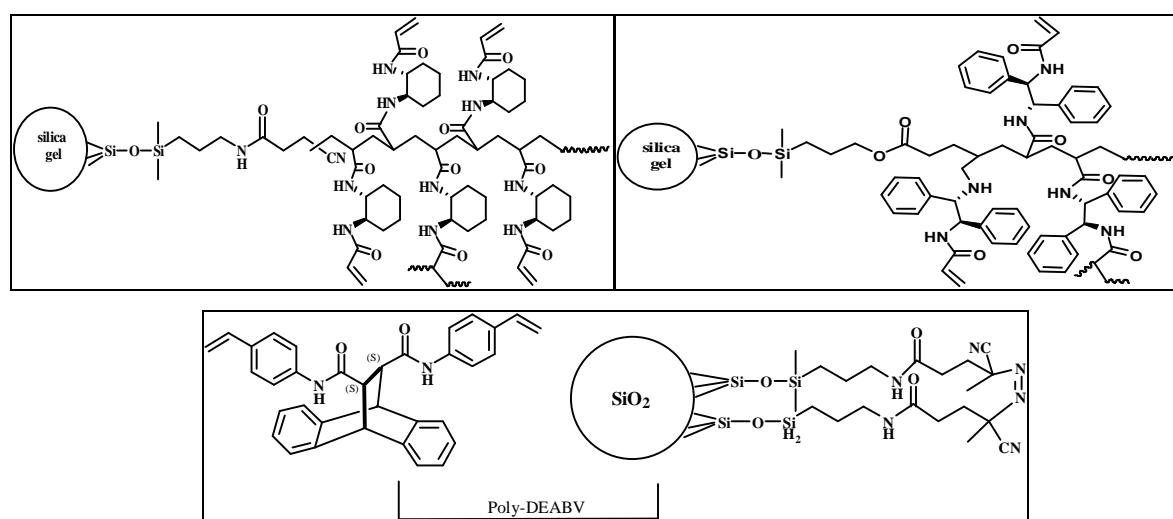
zapadá do struktury celulosové CSP. Chirální rozlišení podporují  $\pi$ - $\pi$  interakce aromatických částí analytů se substituentem CSP, vodíkové nebo dipól-dipólové interakce. Ze skupiny 1,1'-binaftylových derivátů byl s nejvyššími hodnotami enantiorozlišení separován analyt **7**, který ve své struktuře obsahuje skupiny schopné tvorby H-vazeb. Vysoké hodnoty chirálního rozlišení analytů **7**, **9** a **10** umožňovaly separaci těchto látek v semipreparativním měřítku.

V normálním separačním módu byly na CSP na bázi *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy rozděleny čtyři analyty, dva analyty ze skupiny 1,1'-binaftylů (**1** a **4**) a oba zástupci 1,2'-binaftylů (**9** a **10**). Analyty **4**, **9** a **10** se separovaly na základní linii. Ze srovnání výsledků získaných v NP a RP módu jednoznačně vyplývá, že reverzní separační mód je pro separaci studovaných analytů vhodnější.

### 3.3 Srovnání enantioseparace substituovaných binaftylů na cyklohexinových, celulosových a syntetických polymerních chirálních stacionárních fázích

Tato práce se věnuje porovnání enantioseparačního chování vybraných binaftylových derivátů na třech typech chirálních stacionárních fází. Prvním typem je  $\beta$ -cyklohexinová a hydroxypropylether- $\beta$ -cyklohexinová CSP. Druhou CSP, na které bylo studováno chování binaftylů, byl *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy (jedna CSP vyvinutá pro NP a druhá pro RP separační mód). Poslední skupina CSP zahrnuje tři nově připravené syntetické polymerní CSP na bázi *trans*-1,2-diaminocyklohexanu - P-CAP, P-CAP-DP a DEABV, jejichž struktury jsou znázorněny na obr. 5 (kolony byly připraveny v laboratoři Prof. Armstronga, The University of Texas at Arlington, USA).

Chování binaftylových derivátů na prvních dvou typech CSP bylo studováno v předchozích pracích (kapitoly 3.1 a 3.2). Proto je tato kapitola věnována převážně syntetickým polymerním CSP a celkové srovnání je uvedeno až na konci. Retenční a enantioseparační chování binaftylových derivátů bylo na syntetických polymerních CSP sledováno v normálním a polárně-organickém separačním módu.



Obr. 5: Struktury polymerních CSP, vlevo nahoře – (*R,R*)-P-CAP, vpravo nahoře – (*R,R*)-P-CAP-DP, dole – DEABV CSP.

### Normální separační mód

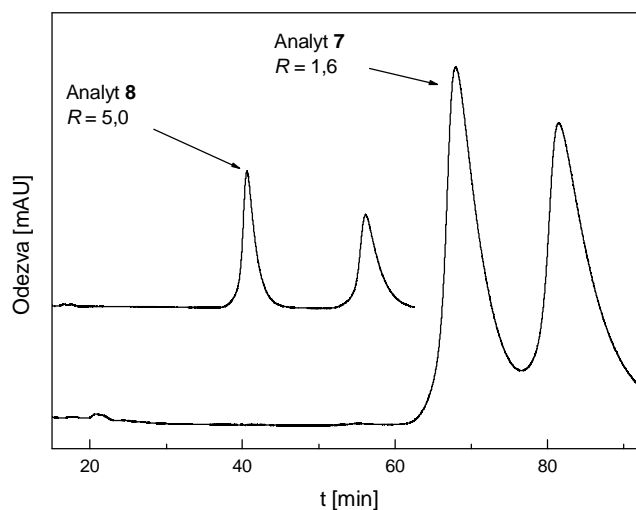
Mobilní fáze normálního módu byly tvořeny *n*-heptanem nebo *n*-hexanem ve směsi s ethanolem nebo propan-2-olem s nebo bez přídavku malého množství octové (HAc) nebo trifluoroctové (TFA) kyseliny. Retence všech analytů rostla podle předpokladu s množstvím nepolární složky v MF. Vyšší retence byla doprovázena vyššími hodnotami chirálního rozlišení. Nejvýhodnější poměr *n*-hexanu (*n*-heptanu) a propan-2-olu (ethanolu) na koloně P-CAP byl 80/20 (v/v). V tab. 3 jsou shrnuty výsledky získané v podobných MF jako je tato základní. Přídavek HAc nebo TFA vedl ve většině případů ke snížení hodnot retence a chirálního rozlišení. Tento pokles /toto snížení byl patrnější/výraznější v přítomnosti TFA.

Tab. 3: Hodnoty retenčních faktorů, enantioselektivního rozlišení a enantioselektivit těch analytů, u kterých byla pozorována alespoň částečná enantioseparace na P-CAP CSP v normálním separačním módu.

Analyt		80/20 (v/v)			80/20/0,1 (v/v/v)		
		HEX/IPA	HEX/EtOH	HEP/EtOH	HEP/EtOH/HAc	HEX/IPA/TFA	HEP/EtOH/TFA
3	$k_1$	2,62	3,92	4,23	2,72	2,54	0,85
	$R$	0,91	0,85	0,75	0,64	1,06	0,00
	$\alpha$	1,15	1,07	1,06	1,06	1,13	1,00
7	$k_1$	x	x	x	x	10,27	2,21
	$R$	x	x	x	x	1,62	0,69
	$\alpha$	x	x	x	x	1,22	1,10
8	$k_1$	9,98	11,23	11,24	8,73	9,04	2,15
	$R$	3,43	5,02	4,22	4,52	3,66	2,93
	$\alpha$	1,59	1,43	1,36	1,39	1,58	1,34
10	$k_1$	3,56	4,82	4,81	3,98	3,74	0,96
	$R$	1,97	2,28	2,28	1,93	1,96	1,00
	$\alpha$	1,36	1,19	1,18	1,17	1,35	1,15

x – analyt neeluoval z kolony do 120 min.

Separace derivátů obsahujících hydroxylové skupiny ležící vedle jednoduché vazby spojující naftylové kruhy (látky **3**, **7**, **8**, **10**) na P-CAP CSP ukazuje na důležitost H-vazeb v mechanismu enantioselektivního rozpoznávání atropisomerů. Význam vodíkových vazeb podporuje také fakt, že analyt **9**, který má strukturu velice podobnou analytu **10**, ovšem neobsahuje OH- skupiny, nebyl ani částečně rozdělen. Enantioseparace analytů **7** a **8** je znázorněna na obr. 6.



Obr. 6: Chromatogramy enantioseparace analytů **7** a **8** na P-CAP (250 x 4,6 mm I.D.), mobilní fáze: pro analyt **7** *n*-hexan/propan-2-ol/TFA 80/20/0.1 (v/v/v), pro analyt **8** *n*-hexan/ethanol 80/20 (v/v); průtoková rychlost 0,7ml/min, UV detekce 254 nm.

Na DEABV CSP byla pozorována v MF stejného složení vyšší retence než na koloně P-CAP. Proto optimalizované složení mobilní fáze obsahovalo menší zastoupení *n*-heptanu, tedy *n*-heptan/IPA 70/30 (v/v). Přídavek 0,1% octové kyseliny do MF měl na chromatografické parametry analytů zanedbatelný vliv. Na DEABV CSP bylo dosaženo částečné enantioseparace analytů **8** ( $R = 0,5$ ), **9** ( $R = 1,3$ ) a **10** ( $R = 1,0$ ). Ze srovnání výsledků separačních parametrů – rozlišení, symetrie píků nebo separační účinnosti – naměřených na obou kolonách vyplývá, že chirální stacionární fáze P-CAP je pro enantioseparace binaftylyů vhodnější. P-CAP-DP CSP se pro enantioseparace binaftylových derivátů v NP módu neosvědčila.

#### *Polárně-organický separační mód*

Mobilní fáze polárně-organického módu (PO) byly tvořeny acetonitrilem s malým množstvím methanolu. Aditivy mobilních fází byly HAc, TFA nebo triethylamin ovlivňující disociaci/protonaci buď analytu, nebo funkčních skupin chirálních selektorů. Na všech polymerních kolonách rostla retence se stoupajícím množstvím ACN v mobilní fázi. Přídavek 0,1% HAc do MF vedl ke snížení retence na P-CAP a P-CAP-DP CSP, zatímco na DEABV se retence látek v přítomnosti kyseliny

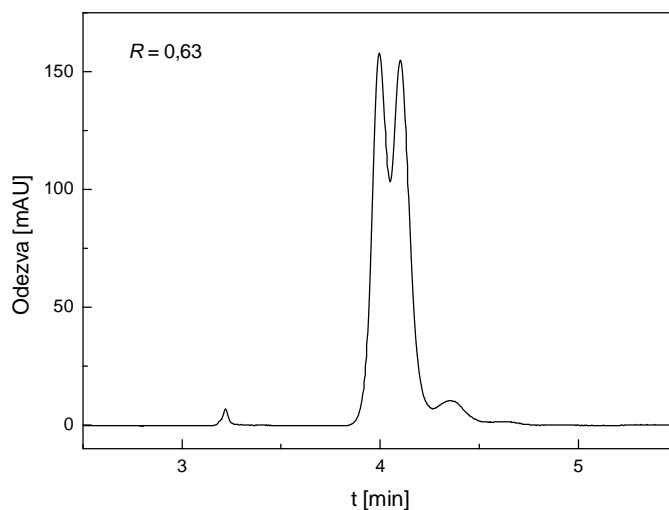


výrazně neměnila. Účinnost kolony a symetrie píků byly lepší v okyselené MF. Výjimku tvořila DEABV CSP, na které se změny v symetrii a účinnosti kolony v MF obsahující HAc projevily jen mírně. V tabulce 4 jsou uvedeny separační parametry analytů, které se na jednotlivých CSP dělily na atropisomery. Na koloně P-CAP se separovalo pět látek - v tab. 4 nejsou uvedeny analyty **2** a **7**, které se podařilo rozdělit pouze v MF složené z ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 10 mM směs HAc a TEA s rozlišením  $R = 1,20$  pro analyt **2** a  $R = 0,60$  pro analyt **7**. Tři látky byly shodně separovány na P-CAP-DP a DEABV CSP. Poslední jmenovaná CSP – DEABV – byla jediná chirální stacionární fáze ze všech studovaných CSP, na které byla pozorována částečná enantioseparace analytu **5** (obr. 7). Ze vzájemného porovnání jednotlivých polymerních kolon studovaných v této práci vyplývá, že z hlediska rozlišení, symetrie a účinnosti se nejlépe osvědčila chirální stacionární fáze P-CAP.

Tab. 4: Hodnoty rozlišení a enantioselektivit studovaných binaftylových derivátů separovaných v PO módu na polymerních CSP - P-CAP, P-CAP-DP a DEABV.

Stacionární fáze	P-CAP						P-CAP-DP				DEABV					
	3		8		10		8		10		5		9		10	
Analyt	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>
Mobilní fáze (v/v)	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>α</i>
ACN/MeOH 95/5	0,54	1,07	3,64	1,37	1,64	1,18	0,00	1,00	1,47	1,28	0,60	1,08	1,33	1,17	1,40	1,16
ACN	0,75	1,11	3,82	1,54	1,29	1,19	0,78	1,13	2,31	1,37	0,61	1,09	1,40	1,17	1,35	1,17
ACN/MeOH/HAc 95/5/10 mM	0,57	1,07	3,86	1,37	1,88	1,19	0,49	1,06	1,53	1,27	0,58	1,08	1,27	1,16	1,37	1,16
ACN/HAc 100/10 mM	1,01	1,12	4,22	1,57	1,83	1,21	0,86	1,12	2,30	1,36	0,63	1,11	1,43	1,18	1,31	1,17

- v tabulce nejsou uvedeny analyty **2** a **7**, které se separovaly v MF ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 10 mM HAc + TEA na P-CAP CSP; analyt **2** se ve stejné MF dělil také na P-CAP-DP CSP.



Obr. 7: Chromatogram enantioseparace analytu **5** na koloně DEABV (250 x 4,6 mm I.D.) v mobilní fázi ACN/HAc 100/0,1 (v/v); průtoková rychlost 0,7ml/min, UV detekce 254 nm.

#### Závěr:

V NP módu byla pozorována enantioseparace čtyř analytů na P-CAP CSP a tří látek na DEABV CSP. Nejvyšší hodnoty chirálního rozlišení analytů byly na P-CAP CSP dosaženy v mobilní fázi *n*-hexan/propan-2-ol/TFA 80/20/0,1 (v/v/v). Všechny analyty obsahují ve své struktuře funkční skupiny schopné tvorby vodíkových vazeb - ty převládají v mechanismu chirálního rozpoznávání na P-CAP CSP. Na DEABV CSP byla pozorována separace na atropisomery u analytů **8**, **9** a **10** v mobilní fázi *n*-heptan/propan-2-ol 70/30 (v/v). Lepší výsledky byly ze dvou testovaných CSP v normálním módu dosaženy na P-CAP CSP.

Sedm látek bylo rozděleno na atropisomery v PO módu, z nich pět analytů na P-CAP (látky **2**, **3**, **7**, **8** a **10**) a shodně po třech látkách na DEABV a P-CAP-DP CSP. Analyt **8** byl enantioseparován s nejvyšším chirálním rozlišením na P-CAP, zatímco analyt **10** se s nejvyšší hodnotou rozlišení separoval na P-CAP-DP CSP. Tento derivát se jako jediný separoval na všech polymerních chirálních stacionárních fázích. Enantioseparace sloučenin **3** a **7** byla pozorována pouze na P-CAP CSP, analyt **2** se dělil jak na P-CAP, tak na P-CAP-DP, a analyty **5** a **9** se podařilo chirálně rozlišit pouze na DEABV CSP. Na jednotlivých polymerních CSP byla pozorována

enantioseparace různých analytů – tato skutečnost potvrzuje vzájemnou komplementaritu polymerních CSP studovaných v této práci.

### 3.3.1. Srovnání výsledků získaných na všech testovaných CSP

Celkově bylo retenční a enantioseparační chování sady deseti analytů studováno na šesti chirálních stacionárních fázích, a to na bázi  $\beta$ -cyklodextrinu, hydroxypropylether- $\beta$ -cyklodextrinu, *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy, poly(*trans*-1,2-diaminocyklohexandiyl-bis akrylamidu), *N,N'*-[(1*R*,2*R*)-1,2-difenyl-1,2-ethandiyl]bis-2-propenamidu a bis-4-vinylfenylamidového derivátu *trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11*S*,12*S*)-11,12-dikarboxylové kyseliny. První dva typy CSP mají podobný základ – řadí se do skupiny oligo-, resp. polysacharidových CSP. Poslední tři CSP patří do skupiny zcela syntetických polymerů. Ačkoli jsou všechny analyty strukturně podobné, výsledky dosažené na jednotlivých CSP se vzájemně velice lišily. Z tab. 5, ve které je uveden přehled analytů rozdělených na jednotlivých CSP, vyplývá, že optimalizace separace analytů známé struktury na CSP rovněž známé (a dobře definované) struktury není jednoduchý proces.

Tab. 5: Přehled analytů separovaných na atropisomery na jednotlivých CSP studovaných v této práci v NP, RP a PO separačním módu (v závorkách jsou uvedeny hodnoty chirálního rozlišení).

<b>Separací mód</b> <b>Chirální stacionární fáze</b>	<b>NP</b>	<b>RP</b>	<b>PO</b>
β-Cyklodextrin	žádná separace	<b>1</b> (0,5) <b>9</b> (0,9) <b>10</b> (2,2)	-
Hydroxypropylether-β-cyklodextrin	žádná separace	<b>1</b> (0,7) <b>2</b> (1,0) <b>4</b> (0,2) <b>8</b> (0,8) <b>9</b> (1,1) <b>10</b> (1,9)	-
Derivatizovaná celuloza	<b>1</b> (1,2) <b>4</b> (1,9) <b>9</b> (4,9) <b>10</b> (5,0)	<b>1</b> (1,8) <b>2</b> (0,7) <b>3</b> (3,2) <b>4</b> (1,2) <b>7</b> (6,9) <b>9</b> (6,3) <b>10</b> (5,9)	-
P-CAP	<b>3</b> (1,1) <b>7</b> (1,6) <b>8</b> (5,0) <b>10</b> (2,3)	-	<b>2</b> (1,1) <b>3</b> (1,0) <b>7</b> (0,6) <b>8</b> (4,2) <b>10</b> (1,9)
P-CAP-DP	-	-	<b>2</b> (0,6) <b>8</b> (0,9) <b>10</b> (2,3)
DEABV	<b>8</b> (0,6) <b>9</b> (1,3) <b>10</b> (1,0)	-	<b>5</b> (0,6) <b>9</b> (1,4) <b>10</b> (1,4)

- retenční a enantioseparační chování analytů nebylo v daném separačním módu na CSP testováno nebo se analyty ireverzibilně zadržovaly na CSP

## 4 ZÁVĚR

Ke studiu retenčního a enantioseparačního chování sady binaftylových derivátů byly použity tři typy chirálních stacionárních fází – cyklodextrinové, celulosové a CSP založené na syntetických polymerech. Na jednotlivých CSP byly testovány různé separační módy s různým složením mobilních fází. V normálním módu nebyl na cyklodextrinových CSP rozdělen ani jeden analyt. Na celulosové a P-CAP CSP se rozdělily shodně čtyři analyty, avšak odlišné. Na další polymerní CSP - DEABV – se dělily tři, nikoli však shodné, látky.

Na chirálních stacionárních fází na bázi sacharidů i polymerů se separují pouze zástupci 1,2'-disubstituovaných binaftylů (**9**, **10**). Mechanismus enantioseparace na celulosové CSP je založen na vhodném „fitu“ analytu do chirálních prostorových struktur CSP doplněném o interakce funkčních skupin cyklodextrinu nebo celulosy a daného analytu. Vlastnosti daných rigidních uspořádání jsou však u CD a derivatizované celulosy odlišné. Na syntetických polymerních CSP je enantioseparace založena zejména na tvorbě stereoselektivních vodíkových interakcí. Ty jsou kromě kolony P-CAP na dalších dvou polymerních CSP doplněny o  $\pi$ - $\pi$  a dipólové interakce. Separace **9** a **10** na obou typech CSP je způsobena vhodnějším prostorovým uspořádáním těchto analytů. Analyt **10**, který se separoval na všech testovaných CSP, má zřejmě jako jediný zástupce takové prostorové uspořádání a takové funkční skupiny, které mohou účinně interagovat se všemi typy CSP. Analyt **9**, který se separoval na celulosové a jednom typu polymerní CSP (DEABV), sice ve své struktuře neobsahuje skupinu schopnou tvorby H-vazeb, ale svým prostorovým uspořádáním zřejmě dobře zapadá do struktur CSP. Tato interakce je pak zpevněna interakcemi aromatických skupin analytu a stacionární fáze ( $\pi$ - $\pi$ ).

Vzájemné porovnání výsledků získaných v reverzním a polárně-organickém separačním módu není dost dobře možné, neboť v obou systémech se uplatňují (převládají) rozdílné interakce. Ze srovnání separací na cyklodextrinových a celulosové CSP provedených v RP módu jednoznačně vyplývá, že celulosová CSP je účinnější jak z hlediska počtu separovaných látek, tak lepší symetrie píků a vyšších hodnot enantiorozlišení těch analytů, které se separovaly na obou CSP. Zatímco se na

celulosové CSP se rozdělilo sedm látek z deseti, na cyklodextrinových CSP byla pozorována enantioseparace šesti analytů. Polární separační mód byl aplikován pouze u syntetických polymerních CSP, na kterých se podařilo rozdělit sedm látek.

Ze vzájemného porovnání všech CSP vyplývá, že nejvhodnější CSP pro separaci binaftylových derivátů je CSP obsahující *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy jako chirální selektor a vhodným separačním systémem je reverzní mód.