

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

DISERTAČNÍ PRÁCE

2009

Lucie LOUKOTKOVÁ

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studium enantioseparace vybraných substituovaných binaftylů

Disertační práce

Lucie Loukotková

Školitelé: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Praha 2009

Tato disertační práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2005–2009.

Prohlašuji, že všechny výsledky použité a publikované v této disertační práci jsou získány vlastní experimentální činností a veškerá použitá literatura je citována a uvedena v seznamu literatury.

Dále prohlašuji, že tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

Praha, 10.9.2009

Lucie Loukotková

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelkám, Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc., za odborné vedení, cenné připomínky a pomoc během celého mého působení na Katedře analytické chemie.

Dále děkuji všem kolegům z Katedry analytické chemie za jejich podporu a pomoc. Děkuji Mgr. Lucii Janečkové za vytvoření velmi příjemných pracovních podmínek ve společné laboratoři a Mgr. Štěpánce Jankové za podporu a cenné rady. Velký dík náleží rodičům za jejich (nejen finanční) podporu během celého studia, porozumění a trpělivost.

Tato disertační práce byla finančně podporována granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy - Centrum 1M06011, Kontakt ME 895, RP 14/63 a dlouhodobým výzkumným záměrem MSM 0021620857.

Předmětová hesla

Substituované binaftyly

Optimalizace separace

Separáční mechanismus

Kl čov  slova

HPLC

β -Cyklodextrinov  chirální stacionární fáze

Chirální stacionární fáze na bázi *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy

Chirální stacionární fáze na bázi zcela syntetických polymerů

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretický úvod	9
2.1	Stereoisomerie, optická aktivita a chiralita	9
2.2	Chirální separace v HPLC	10
2.3	Polysacharidové chirální stacionární fáze	12
2.3.1	Estery polysacharidů	13
2.3.1.1	Triacetát celulosy	13
2.3.1.2	Benzoát celulosy	14
2.3.2	Fenylkarbamáty celulosy a amylosy	15
2.3.3	Aralkylkarbamáty polysacharidů	21
2.3.4	Jiné polysacharidové fenylkarbamáty a oligosacharidy	22
2.3.5	Cyklodextriny	23
	Literatura	31
2.4	CSP na bázi syntetických polymerů	34
2.4.1	Polymerní chirální materiály	35
2.4.2	<i>Trans</i> -1,2-diaminocyklohexan jako chirální selektor	36
2.4.3	P-CAP	37
2.4.4	P-CAP-DP	39
2.4.5	DEABV	41
	Literatura	43
2.5	Binaftylové deriváty	45
2.5.1	2,2'-disubstituované deriváty 1,1'-binaftyly	45
2.5.2	Ostatní binaftylové deriváty	48
	Literatura	51
3	Experimentální část	55
3.1	Chemikálie	55
3.2	Přístroje a pomůcky	57
3.3	Příprava vzorků, mobilních fází a podmínky měření	58
	Literatura	60
4	Výsledky a diskuse	61
4.1	Chirální selektory na bázi β -cyklodextrinu ^I	61
4.1.1	Cyklodextrinové chirální stacionární fáze	61

4.1.2	Přídavek chirálního selektoru do mobilní fáze	64
4.2	Chirální stacionární fáze založená na tris(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulose ^{II}	65
4.2.1	Normální separační mód	65
4.2.2	Reverzní separační mód	67
4.3	Chirální stacionární fáze tvořené syntetickými polymery ^{III}	72
4.3.1	Chirální stacionární fáze P-CAP	73
4.3.1.1	Normální separační mód	73
4.3.1.2	Polárně-organický separační mód	75
4.3.2	Chirální stacionární fáze P-CAP-DP	78
4.3.3	Chirální stacionární fáze DEABV	80
4.3.3.1	Normální separační mód	81
4.3.3.2	Polárně-organický separační mód	82
4.3.4	Vzájemné srovnání polymerních CSP P-CAP, P-CAP-DP a DEABV	83
4.3.4.1	Normální separační mód	83
4.3.4.2	Polárně-organický separační mód	85
4.4	Srovnání výsledků získaných na všech testovaných CSP	88
	Literatura	90
5	Závěr	91
	Příloha 1 Seznam publikací a prezentací	93

Seznam zkratek a použitých symbolů

<i>a</i>	enantiosektivita
ACN	acetonitril
α -CD	α -cyklodextrin
ADMPC	<i>tris</i> (3,5-dimethylfenylkarbamát) amylosy
<i>As</i>	faktor asymetrie píku
BINAL-H	2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl-lithium aluminium hydrid
BINAM	2,2'-diamino-1,1'-binaftyl
BINAP	2,2'-bis(difenylfosfino)-1,1'-binaftyl
BINOL	2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl (1,1'-bi-2,2'-naftol)
β -CD	β -cyklodextrin
C-8	oktyl
C-18	oktadecyl
CD	cyklodextrin
CD-M	inkluzní komplex cyklodextrinu a molekuly
CDMPC	<i>tris</i> (3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy
CS	chirální selektor
CTA-I	triacetát mikrokrystalické celulosy
CTB	tribenzoát celulosy
CTPC	<i>tris</i> (fenylkarbamát) celulosy
γ -CD	γ -cyklodextrin
DACH	<i>trans</i> -1,2-diaminocyklohexan
DACH-DNB	<i>N,N'</i> -3,5-dinitrobenzoyl derivát <i>trans</i> -1,2-diaminocyklohexanu
DATD	diamid kyseliny vinné
DEABV	CSP na bázi <i>trans</i> -9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11 <i>S</i> ,12 <i>S</i>)-11,12-dikarboxylové kyseliny, přesně poly([<i>trans</i> -9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11 <i>S</i> ,12 <i>S</i>)-11,12-dikarboxy]bis-4-vinylfenylamid
DPEBV	<i>N,N'</i> -[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-difenyl-1,2-ethandiyl] bis-4-vinylbenzamid
DPEDA	<i>trans</i> -1,2-difenyletylendiamin
D2PymA	difenyl-2-pyridylmethylmetakrylát
EtOH	ethanol
HAc	octová kyselina
HEP	<i>n</i> -heptan

HEX	<i>n</i> -hexan
HP- β -CD	hydroxypropylether- β -cyklodextrin
HRMS	hmotností spektrometrie s vysokým rozlišením (high-resolution MS)
I.D.	vnitřní průměr
IPA	propan-2-ol
<i>k</i>	retenční faktor
M	molekula
MAP	2-amino-2'-difenyfosfino-1,1'-binaftyl
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MOP	2-difenyfosfino-2'-methoxy-1,1'-binaftyl
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
<i>N/m</i>	počet teoretických pater na 1 metr délky kolony (CSP)
NOBIN	2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaftyl
NP	normální separační mód
OBIN	2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl
OM	organický modifikátor
P-CAP	CSP na bázi <i>trans</i> -1,2-diaminocyklohexanu; přesně poly(<i>trans</i> -1,2-diaminocyklohexandiyl-bis-akrylamid)
P-CAP-DP	CSP na bázi <i>trans</i> -1,2-difenylethylendiaminu; přesně poly(<i>N,N'</i> -[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-difenyl-1,2-ethandiyl]bis-2-propenamid)
PO	polárně-organický separační mód
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
PTrMA	poly(trifenylnmethylmetakrylát)
<i>R</i>	chirální rozlišení
RP	reverzní separační mód
SFC	superkritická fluidní chromatografie
TEA	triethylamin
TEAA	triethylaminacetát
TFA	trifluoroctová kyselina
<i>t_R</i>	retenční čas
TrMA	trifenylnmethylmetakrylát
UV	spektrometrie v UV oblasti

λ	vlnová délka [nm]
obj. %	objemová procenta
(v/v)	objemový poměr

1 ÚVOD

V posledních desetiletích dvacátého století se podařilo objevit mnoho stereoselektivních reakcí, díky kterým je možné synteticky připravit čisté enantiomery řady látek, majících široké využití v nejrůznějších oblastech lidského života. Tento způsob přípravy, tzv. asymetrická syntéza, umožňuje přímou syntézu enantiomerů (s vysokým stupněm optické čistoty) za použití vhodných katalyzátorů, jimiž bývají opticky aktivní látky, tzv. pomocná chirální činidla. Asymetrická syntéza je dnes řazena k velmi důležitým a rychle se rozvíjejícím odvětvím organické chemie. Významnou roli mezi pomocnými chirálními činidly zaujímají deriváty odvozené od 1,1'-binaftylu. Chiralita těchto látek není dána přítomností asymetrického uhlíkového atomu, ale je způsobena bráněnou rotací aromatických zbytků okolo jednoduché vazby spojující naftylové kruhy. Tento typ chiralit je označován jako chiralita axiální a enantiomery jako atropisomery. Předpokladem úspěšného použití organických katalyzátorů v asymetrické syntéze je vedle jejich vhodného prostorového uspořádání i jejich dostatečná konformační stabilita, tedy dostatečná velikost racemizační bariéry, účinně bránící jejich racemizaci.

Literatura týkající se binaftylových derivátů je velmi rozsáhlá, je ale především zaměřena na jejich syntézu. Chromatografické separace jsou zmiňovány obvykle okrajově a přesné separační podmínky mnohdy schází. Přitom chromatografie je k rychlému zjištění enantiomerní čistoty připravené látky nebo k předpovězení velikosti racemizační bariéry (ta následně napoví, zda je připravený derivát vhodný k dalšímu katalytickému použití či nikoli) velice vhodná.

Chirální vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současnosti nejčastěji používaná metoda pro dělení širokého spektra chirálních látek a v tomto směru se velice osvědčily tři skupiny chirálních stacionárních fází (CSP). První skupinu tvoří CSP na bázi makrocyclických antibiotik, druhá skupina zahrnuje cyklodextrinové CSP a třetím typem jsou polysacharidové CSP.

Nově připravené, zcela syntetické polymerní chirální stacionární fáze na bázi *trans*-1,2-diaminocyklohexanu, *trans*-1,2-difenylethylendiaminu, *trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11*S*,12*S*)-11,12-dikarboxylové kyseliny, *N,N'*-diallyl-L-diamidu kyseliny vinné, trifenylmethylmetakrylátu nebo difenyl-2-pyridylmethylmetakrylátu by měly být proti CSP na bázi přírodních nebo derivatizovaných oligo/polysacharidů stále ve větším rozmezí hodnot pH, měly by být použitelné v širším rozsahu polarit mobilních fází a měly by mít

vysokou dávkovací kapacitu (dávkování vzorků o vysoké koncentraci nebo velkých množství analytů). To znamená, že by měly být snadno použitelné v semipreparativním i preparativním měřítku. Další výhodou je snadná příprava obou enantiomerních forem CSP a tudíž snadná následná změna elučního pořadí enantiomerů, jednoduše použitím CSP s požadovanou konfigurací.

Cílem této disertační práce bylo studium chromatografického chování sady 2,2'-disubstituovaných a 2,3,2'-trisubstituovaných 1,1'-binaftylů 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.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Stereoisomerie, optická aktivita a chiralita

Při popisu struktury organických molekul postupujeme od elementárního složení přes konstituci (počet a typ vazeb, atomů) vedoucí k 2D struktuře až po konkrétní rozmístění atomů v prostoru – 3D strukturu. Isomerie je stav, kdy sloučeniny se stejným sumárním vzorcem mají jiné strukturní uspořádání atomů v molekule a tedy i chemické nebo fyzikální vlastnosti. Základní dělení isomerů je na strukturní neboli konstituční isomery a konfigurační neboli stereoisomery. Konstituční isomery mají stejný sumární vzorec, ale jiné vnitřní uspořádání a dělíme je do čtyř skupin na řetězové, polohové, funkční (skupinové) a tautomery. Stereoisomery se vzájemně liší prostorovým uspořádáním, resp. jinou prostorovou geometrií, a dělí se na enantiomery a diastereoisomery, které se dále dělí na geometrické (cis/trans isomerie) a konformační. Energie potřebná k přeměně jednoho konfiguračního isomeru na druhý je srovnatelná s *disociační energií* jednoduchých C-H, C-C vazeb. *Konformační* isomery vznikají rotací (skupin) atomů kolem jednoduchých vazeb a energie potřebná k přeměně jednoho isomeru na druhý je určena *Gibbsovou aktivační energií isomerizace* [1]. Čím je hodnota energetické bariéry nutné k rozštěpení vazby nebo k otočení kolem jednoduché vazby vyšší, tím je daný isomer stabilnější.

Molekula může být buď symetrická, nebo asymetrická. Symetrii molekuly pro danou konfiguraci nebo konformaci lze popsat pomocí operací symetrie podle odpovídajících prvků symetrie a symetrické molekuly se třídí do skupin obsahujících vždy stejný typ a počet prvků symetrie, tzv. bodových grup. Asymetrická molekula pak nemá žádný prvek symetrie.

Enantiomery jsou dvě molekuly lišící se absolutní konfigurací a jsou ve vzájemném vztahu vzor a jeho zrcadlový obraz. Absolutní konfigurace popisuje prostorové uspořádání na každém z prvků chiraloty. Stereoisomery, které nejsou enantiomery, se nazývají diastereoisomery. Ty mohou být achirální nebo chirální. Sloučeniny se stejným počtem enantiomerních skupin identicky vázaných, které neobsahují žádné další chirální skupiny nazýváme meso-sloučeniny. Tyto látky jsou achirální, protože mají rotačně-reflexní osu symetrie, a příspěvky každé z chirálních skupin se vzájemně vruší. [1] Pokud molekula neobsahuje rotačně-reflexní prvky symetrie, je chirální. Je zřejmé, že asymetrická molekula je vždy chirální, ale chirální molekula nemusí být vždy asymetrická.

Chiralita je základní vlastnost trojrozměrného světa organických sloučenin, je to vlastnost objektu jako celku. Chirální isomery se při interakci s chirálním objektem liší ve svých vlastnostech, zatímco v achirálním prostředí se jeví jako identické. Chirální objekt může být buď jiná molekula (čínidlo, rozpouštědlo), nebo chirální fyzikální prvek (kruhově polarizované záření definované vlnové délky nejčastěji při sodíkové čáře). Chirální může být jak jediná molekula, tak celý krystal.

Chiralita molekuly je vyvolána přítomností určitých strukturních motivů, tzv. prvků chiraloty. Chirální molekula obsahuje buď chirální centrum, chirální osu, nebo chirální rovinu. Pokud v molekule existuje jeden z těchto prvků chiraloty, je molekula vždy chirální.

Nejčastější příčinou centrální (bodové) chiraloty je přítomnost asymetrického uhlíkového atomu nesoucího čtyři rozdílné substituenty. Vedle atomu uhlíku mohou být chirálními centry také např. fosfor, arsen, dusík nebo křemík. Osová (axiální) chiralita je vyvolána existencí čtyř substituentů ležících mimo jednu rovinu. Osa chiraloty pak leží na spojnicích dvojic substituentů. Z látek vykazujících axiální chiralitu lze jmenovat alleny, alkylidencykloalkany, adamantoidy, spiranové sloučeniny a diaryly [1]. Plošná (planární) chiralita je vyvolána dvojicí různých substituentů ležících ve společné rovině – rovině chiraloty. Mimo tuto rovinu potom leží minimálně jeden substituent tzv. pivot, který je s rovinou chiraloty spojen chemickou vazbou. Helikální chiralita patří mezi tzv. inherentní chiralitu, neboli chiralita bez prvků chiraloty. Chiralita molekuly je vyvolaná výstavbou z achirálních částí a vyskytuje u sloučenin vytvářejících šroubovici. Typickými představiteli jsou helicity. [1]

Optická aktivita je popis situace, kdy makroskopický vzorek stáčí rovinu polarizovaného světla o určitý úhel α , který je číselně vyjádřen specifickou optickou rotací $[\alpha]_D$, která je jedním z parametrů identifikujících chirální sloučeniny. Všechny chirální látky by měly být opticky aktivní. Optická aktivita je veličina stanovovaná na souboru chirálních objektů, zatímco chiralita je vlastnost pouze jednoho objektu. U všech souborů chirálních molekul tedy nelze stanovit jejich optickou aktivitu.

2.2 Chirální separace v HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je dnes velmi používaná separační metoda umožňující rozdělit obrovské množství chemických sloučenin. Separace opticky aktivních látek se před rokem 1980 považovaly za složité nebo dokonce nemožné. Problémem byl

nedostatek vhodných chirálních stacionárních fází. Po roce 1980 se vývoj nových chirálních selektorů a následně i vývoj nových chirálních stacionárních fází značně rozvinul a do devadesátých let bylo uvedeno na trh více než sto CSP [3]. V současné době se chromatografické separace na chirálních stacionárních fázích staly jednou z nejúčinnějších technik, kterou lze použít v analytickém i v preparativním měřítku [4].

Chirální stacionární fáze je tvořena pevnou maticí, kterou bývá nejčastěji silikagel, a chirálním selektorem (CS), který je na matici připojen – buď chemicky (obvykle kovalentní vazbou) nebo fyzikálně (adsorpcí). Chirální stacionární fáze lze rozdělit podle různých kritérií. Například podle jejich struktury je můžeme rozřadit do pěti tříd - na makrocyklické CSP, polymerní CSP, CSP tvořící π - π interakce, ligandově-výměnné a hybridní CSP [5,6]. Dalším kritériem pro klasifikování CSP je velikost molekul chirálního selektoru. CSP tvořené malými molekulami obvykle imobilizovanými na silikagelu formují takzvané π -akceptorové a π -donorové fáze [7,8]. Ty byly roku 1981 vyvinuty Pirklem a od té doby jich byla připravena celá řada. Do druhé skupiny pak řadíme CSP obsahující velké makromolekulární selektory jako jsou například proteiny [9,10,11], polysacharidy a jejich deriváty [9,12,13,14,15,16,17] a syntetické polymery [4,9,18]. Polymerní CSP se dělí do tří skupin - na biopolymery, na polymery připravené chemickou modifikací přírodních polymerů a na polymery plně syntetické. Příkladem CSP na bázi přírodních polymerů či oligomerů jsou cyklodextriny, proteiny, polysacharidy nebo makrocyklická antibiotika. Mezi CSP vzniklé chemickou modifikací přírodních polymerů patří derivatizované cyklodextriny a derivatizované polysacharidy (zejména celulóza a amyloza). Mezi syntetické polymerní CSP řadíme např. polyakrylamidy, jednostranné („one-handed“) helikální polymetakryláty, chirální „crown-ethery“ a další. Chemická modifikace přírodních polymerů vede často ke zvýšení počtu chirálních center v molekule, ke zvětšení molekuly resp. ke změně její struktury, a tím dochází k rozšíření okruhu separovatelných analytů. Ze všech chirálních stacionárních fází jsou dnes pravděpodobně nejrozšířenější polysacharidové CSP. Používají se v analytickém, semipreparativním i preparativním měřítku, jsou enantiosektivní pro velké množství chirálních molekul a mají vysokou dávkovací kapacitu. Vedle zmíněných CSP jsou zajímavé i zesíťované polymerní gely s chirálními kavitami vytvořenými „otiskem“ chirální molekuly – templátu – do gelu (technika molekulárního imprintingu) [9].

2.3 Polysacharidové chirální stacionární fáze

První chromatografické separace enantiomerů využívaly přírodní chirální adsorbenty jako jsou vlna a škrob. Polysacharidy jsou jedny z nejdůležitějších a nejčastěji se vyskytujících opticky aktivních přírodních biopolymerů, které mají v živých organismech obvykle stavební funkci nebo slouží jako zásobárna energie. Přímo celulóza tvoří primární buněčné stěny a spolu s ligninem se podílí na vzniku sekundárních buněčných stěn. Typické polysacharidy jako jsou celulóza, škrob (amyloza) a dextran jsou složeny z D-glukosových jednotek. Celulózu tvoří D-(+)-glukosové jednotky, které jsou spojeny glykosidickou β -1,4 vazbou. Glukosové jednotky amylosy pak pojí α -1,4 vazba.

Začátkem dvacátých let minulého století se podařilo enantioselektivní adsorpcí na vlně rozdělit racemická barviva obsahující fenylalanin nebo zbytky kyseliny mandlové. V roce 1938 Henderson a Rule publikovali práci o chromatografické enantioseparaci *p*-fenylen bis(iminokamforu) na koloně naplněné disacharidem laktosou. Na stejné koloně pak Prelog a Wieland o něco později úspěšně separovali Trögerovy báze. Chiralitu polysacharidů poprvé využil Kotake a kol. - ti separovali řadu racemických derivátů aminokyselin pomocí papírové chromatografie na celulóze. Dalgliesh pak jejich práci rozšířil a vytvořil pravidlo tzv. tříbodové interakce - pro rozlišení enantiomerů v biomolekulárních systémech je zapotřebí tří současně probíhajících interakcí. Dodnes se Dalglieshova pravidla dovoláváme při objasňování mechanismů enantiomerních separací. Později pak byla vyvinuta tenkovrstvá chromatografie na celulóze a kolonová kapalinová chromatografie s celulosovými a škrobovými (bramborový škrob) fázemi. Zmíněné metody se používaly zejména k separacím aminokyselin. [13]

Většina prvních pokusů v kolonové chromatografii byla omezena nízkými účinnostmi kolon. Nicméně Musso ukázal užitečnost přírodních polysacharidů jako chirálních adsorbentů a dosáhl úplného rozlišení atropisomerních derivátů bifenyly na koloně naplněné bramborovým škrobem. Yuasa později ukázal, že kapalinová chromatografie s kolonou naplněnou důkladně přečištěnou nativní celulosou s vysokým stupněm krystalinity (mikrokrystalická celulóza (Avicel)) může zcela separovat aminokyseliny, například tryptofan. Na karboxymethylcelulóze a Sephadexových iontoměničích složených z dextranové trojrozměrné sítě, kde byl použit epichlorhydrin jako síťovací činidlo, pak bylo rozděleno mnoho kovových komplexů. V roce 1993 Wulff a jeho skupina imobilizovali amylosu na silikagel pomocí enzymatické polymerizace a následně zjistili, že tato CSP je

schopna rozdělit racemický mentol (HPLC metoda). Všechny zmíněné materiály se zdály být v praxi málo využitelné, protože jejich rozlišovací schopnost byla poměrně nízká. V kapilární elektroforéze mohou jako chirální aditiva v základním elektrolytu sloužit ve vodě rozpustné polysacharidy, včetně heparinu a amylosy. Vysoká účinnost separace v kapilární elektroforéze umožňuje i přes nízkou enantiosektivitu samotných polysacharidových derivátů kompletní rozdělení mnoha enantiomerů včetně chirálních léčiv. [13]

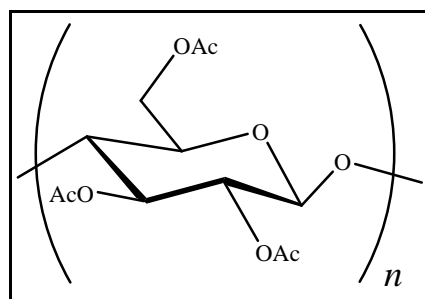
Přírodní polysacharidy v praxi kvůli své nízké enantiosektivité a nevhodným mechanickým vlastnostem velké uplatnění nenalezly. Ovšem některé modifikované polysacharidy mají výbornou schopnost chirálního rozpoznávání.

2.3.1 Estery polysacharidů

2.3.1.1 Triacetát celulosy

Poprvé byl triacetát celulosy, první polysacharidová CSP dobře využitelná v praxi, připraven Hessem a Hagelem roku 1973 [17,19]. Tato CSP vznikla heterogenní acetylací mikrokrystalické celulosy v prostředí benzenu. Nová CSP si uchovala strukturu velmi podobnou mikrokrystalické celuloze a nazývá se triacetát mikrokrystalické celulosy (CTA-I) – struktura je uvedena na obr.1. Obvykle se CTA-I používá v reverzním separačním módu a mobilní fáze bývá složena ze směsi ethanolu a vody. V takové MF byly separovány především nepolární sloučeniny a aromatická léčiva. Na CTA-I CSP lze dávkovat velké objemy analytů, a proto je často používána v preparativních separacích za středně vysokého tlaku [13].

Snížení rozlišovací schopnosti nebo obrácení elučního pořadí analytů lze pozorovat při rozpuštění CTA-I v rozpouštědle. V případě, že je CTA-I rozpuštěna v rozpouštědle a z roztoku adsorbována na silikagel, vzniká další CSP – CTA s odlišnými schopnostmi chirálního rozpoznávání než CTA-I a vyšší účinností a odolností. U některých analytů pak dochází ke změně elučního pořadí, které je způsobeno odlišnou konformací triacetátů celulosy [17]. Kvalita chirálního rozpoznávání je určena uspořádáním struktury celulosové CSP – čím pravidelnější struktura, tím lepší schopnost chirálního rozpoznávání.

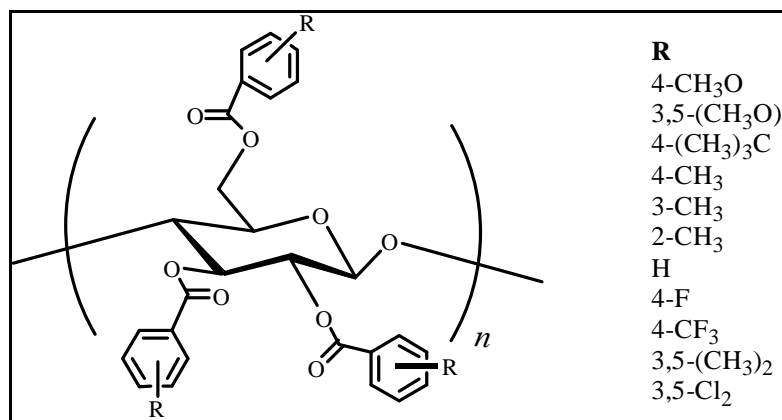


Obr. 1: Struktura triacetátu celulosy.

Mechanismus chirálního rozpoznávání CTA-I CSP nebyl dlouho uspokojivě objasněn i přes to, že se tato CSP používá v chromatografických separacích již dlouho. Až Hesse a Hagel [19] a později Francotte [20] navrhli inkluzní mechanismus, kdy enantiomery mohou být adsorbovány do chirálních kavit sestávajících se z vrstvené CTA-I matrice. Inkluze molekul analytu do kavit CSP není pravděpodobně řízena interakcemi funkčních skupin dané CSP a analytem, ale především tvarem molekul analytů. Tento mechanismus chirálního rozlišení by pak vysvětloval i úspěšné separace látek, které v molekule nenesou žádné funkční skupiny, jako jsou například nearomatické a aromatické uhlovodíky. Heterogenní acetylace může vést ke vzniku supramolekulární struktury CTA-I, kde s největší pravděpodobností za vysokou schopnost chirálního rozpoznávání velkého počtu analytů zodpovídají místa schopná mnohonásobné interakce, specifický povrch CSP a dutiny uvnitř matrice [21,22]. Přítomnost takové supramolekulární struktury byla předpovězena na základě NMR studie triacetátů celulosy v roztoku [23].

2.3.1.2 Benzoát celulosy

Na obr. 2 je uvedena základní struktura a deriváty tribenzoátu celulosy. Tribenzoáty celulosy (CTB) nebo amylosy jsou dalšími deriváty, které mají velmi dobré vlastnosti pro dělení enantiomerů. Komerčně dostupný je tribenzoát celulosy pod názvem Chiralcel OB. *Tris*(4-methylbenzoát) celulosy, který je enantiosektivní pro celou řadu látek včetně léčiv, se prodává pod komerčním názvem Chiralcel OJ. Kromě klasických CSP, kdy je chirální selektor navázán na silikagel, byly Mannschreckem a Francottem připraveny sférické částice derivátů tribenzoátu celulosy a s úspěchem využity zejména pro preparativní účely [24]. CSP nesoucí tribenzoáty amylosy jako chirální selektor se v separacích příliš neosvědčily, protože jejich schopnost chirálního rozpoznávání je velmi nízká.



Obr. 2: Struktura tribenzoátu celulosy.

Nejdůležitějším adsorpčním místem CTB derivátů je pravděpodobně karbonylová skupina esteru, jejíž polarita může být modifikována substituenty navázanými na fenylové kruhy. CSP na bázi derivátu celulosy nebo amylosy může interagovat s racemáty majícími karbonylovou skupinu prostřednictvím dipól-dipólových interakcí a s látkami majícími amino- nebo hydroxylovou skupinu interaguje přes vodíkové vazby [23,25,26,27]. V mechanismu chirálního rozpoznávání se ve srovnání s CTA-I neuplatňuje inkluze analytu do kavit CSP.

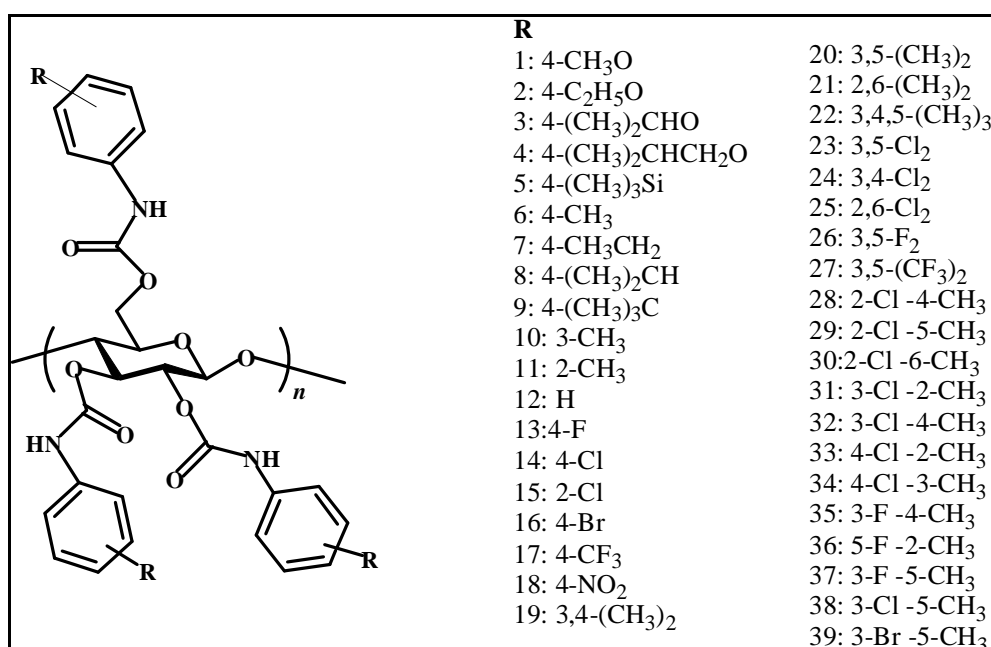
Tribenzoáty obsahující elektron-donorové substituenty (např. methyl) vykazují lepší enantioselektivní chování než ty, které mají elektron-akceptorové substituenty jako jsou například halogeny. Avšak nejsilnější elektron-donorová skupina – methoxy substituent – není pro svou vysokou polaritu přínosem pro enantioselektivní separační mechanismus.

Schopnost chirálního rozpoznávání je výrazně ovlivněna podmínkami přípravy CSP, zejména pak rozpouštědlem používaným k rozpuštění derivátů tribenzoátu celulosy během procesu vázání na pevnou matici. Z toho vyplývá, že s enantioselektivitou chirální stacionární fáze úzce souvisí morfologie derivátů tribenzoátu celulosy nebo vznik supramolekulární struktury. Teplota je dalším faktorem majícím výrazný vliv na enantioselektivitu CSP. Při nízké teplotě je mechanismus chirálního rozpoznávání řízen entropií; při vysoké teplotě enthalpií. [13]

2.3.2 Fenyلكarbamáty celulosy a amylosy

CSP na bázi *tris*(fenyلكarbamátů) celulosy (obr. 3) nebo amylosy dnes patří k nejvýznamnějším a nejpoužívanějším polysacharidovým fázím. S nápadem derivatizovat

celulosu přišel Y. Okamoto začátkem devadesátých let po úspěšné syntéze helikálního poly(trifenylmethylmetakrylátu) (PTrMA) a jeho uplatnění v chirální HPLC. Svou pozornost zaměřil na polysacharidy, zejména na celulosu, která má největší zastoupení ze všech polymerů na zemi a je nejlevnější. Navíc byla již známa mikrokrystalická triacetát celulosa, která prokázala ojedinělé rozlišovací schopnosti. V roce 1984 byl syntetizován *tris*(fenyلكarbamát) celulosy (CTPC) reakcí mikrokrystalické celulosy (Avicel) s fenyl isokyanátem a od té doby bylo připraveno velké množství fenyلكarbamátových derivátů. [18] Jmenujme například 3-chloro-4-methyl- [28], 4-chloro-3-methyl- [28] a 3-fluoro-5-methylfenyلكarbamáty [29] celulosy a *tris*(5-chloro-2-methylfenyلكarbamát) amylosy [23,30]. Tyto CSP mají ve své struktuře jak elektron-donorovou (methylovou), tak elektron-akceptorovou (halogenovou) skupinu. Rozlišovací schopnosti těchto CSP jsou velmi dobré. Naopak deriváty fenyلكarbamátu celulosy nesoucí heteroatom (methoxy- nebo nitroskupina) nemají dobré rozlišovací vlastnosti, protože substituenty jsou již příliš polární [12,13]. Malou rozlišovací schopnost mají také benzylkarbamáty celulosy, stejně jako jednoduché alkylkarbamáty (methyl- nebo isopropylkarbamáty) [31,32].



Obr. 3: Struktura derivátů *tris*(fenyلكarbamátu) celulosy.

Nejrozšířenější polysacharidové CSP jsou bezesporu založeny na 3,5-disubstituovaných fenyلكarbamátech celulosy nebo amylosy. Z jejich zástupců můžeme

jmenovat například *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy (Chiralcel OD), *tris*(3,5-dichlorfenylkarbamát) celulosy nebo *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylosy (Chiralpak AD). Na CSP na bázi *tris*(3,5-dichlorfenylkarbamátu) celulosy se podařilo rozdělit například objemné metakryláty. Nevýhodou této CSP byla její rozpustnost v mobilních fázích s vysokým podílem propan-2-olu a s tím související omezená použitelnost. Chemickým navázáním CSP na 3-aminopropyl-silanizovaný silikagel, kde hexadiisokyanát sloužil jako vazebné raménko (spacer), se podařilo tento problém odstranit [33].

Tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy (CDMPC) je enantioselektivní pro mnoho chirálních sloučenin včetně aromatických uhlovodíků, axiálně a planárně asymetrických sloučenin, chirálních sloučenin síry a fosforu, látek obsahujících v molekule kov, kyanosloučenin a karbonylů, aminů, karboxylových kyselin, alkoholů, derivátů aminokyselin, etherů a léčiv. Kompletní enantioseparace některých stereochemicky významných sloučenin – derivátů metallocenu, derivátů fullerenu, katenanů a dalších látek - byla také publikována. *Tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylosy (ADMPC) má stejně dobrou rozpoznávací schopnost jako CDMPC a je k ní komplementární [13,17].

Dřívější polysacharidové CSP byly připraveny tak, že derivatizovaný polysacharid byl připojen – fyzikálně, naadsorbován (coated) - na makroporézní silikagel (bez chemické vazby). Proto běžná rozpouštědla jako chloroform, tetrahydrofuran, ethylacetát, aceton apod. nemohou být použita jako složka MF, protože v jejich přítomnosti dochází k bobtnání nebo dokonce rozpouštění polysacharidového derivátu. Rozmezí MF je následně poměrně omezené – používají se směsi *n*-hexan/alkohol v normálním separačním módu (NP) a nebo ACN/voda v reverzním separačním módu (RP). Možnost výběru rozpouštědla významně ovlivňuje enantioselektivitu CSP. Pro separace v analytickém měřítku by se použitím zmíněných „zakázaných“ rozpouštědel dalo dosáhnout změny elučního pořadí analytů a vyšší enantioselektivity polysacharidových derivátů [34]. V preparativním měřítku je vysoká produktivita separací dosažitelná použitím solventu, ve kterém se bude analyt výborně rozpouštět [34,35]. Jinak řečeno, zlepšení kompatibility rozpouštědel a chirálních selektorů by vedlo k výraznému zlepšení chirálních separací.

Jednou z možností, jak dosáhnout vyšší odolnosti polysacharidových CSP, je jejich imobilizace na chromatografické matrice. Těmi mohou být sférický silikagel [36,37,38], monolitický silikagel [39,40], stěna křemenné kapiláry [41] nebo organický polymerní gel [42]. Také imobilizačních technik bylo vyvinuto několik:

- imobilizace derivátů nesoucích hydroxylové skupiny s diisokyanátem [33,43]

- chemické navázání amylosového derivátu aktivovaným koncem jeho řetězce [44,45]
- imobilizace derivátů nesoucích vinylové skupiny s (nebo bez) vinylovým monomerem [46,47,48,49]
- fotochemické zesíťování [50]
- imobilizace derivátů nesoucích azidoskupiny [51]
- imobilizace derivátů nesoucích alkoxysilylové skupiny [52,53,54].

Tris(3,5-dimethylfenylkarbamáty) celulosy a amylosy imobilizované na silikagelu jsou dnes komerčně dostupné jako Chiralpak IB resp. IA a CSP *tris*(3,5-dichlorfenylkarbamát) celulosy se prodává pod obchodním názvem Chiralpak IC (Daicel) [55]. Možností, jak imobilizovat chirální selektory na matici, bylo vyvinuto poměrně velké množství, ale stále se zkoumají další způsoby, jejichž provedení bude jednoduché, imobilizace bude velmi efektivní, trvalá a enantiosektivita pro analyty vysoká [34]. Z hlediska enantiosektivity a často nižší retence analytů jsou výhodnější „coated“ kolony, na druhou stranu počet aplikací na imobilizovaných CSP neustále roste. U imobilizovaných CSP se uplatňují kromě chirálních interakcí vedoucích k rozlišení enantiomerů také achirální interakce mezi analytem a CSP, které zvyšují retenci, ale snižují enantiosektivitu [56].

Pro úspěšnou separaci je důležitý výběr jak stacionární, tak mobilní fáze. CDMPC a ADMPC CSP se nejčastěji používají v normálním a reverzním separačním módu. *n*-Hexan ve směsi s propan-2-olem nebo ethanolem (typ použitého alkoholu může ovlivnit enantiosektivitu) tvoří nejčastěji mobilní fáze normálního módu. Malé množství silné kyseliny, kterou často bývá kyselina trifluoroctová, přispívá ke zlepšení separace kyselých analytů. Příklad kyseliny vede ke zkrácení retence a zvýšení symetrie píků. Pro bazické látky je vhodný malý přídavek diethylaminu nebo isopropylaminu vedoucí ke zlepšení v symetrii píků. V reverzním módu, který je velmi často aplikovaný, je MF tvořena směsí vody (pufru) a organického modifikátoru, kterým obvykle bývá acetonitril nebo methanol [35]. Superkritická fluidní chromatografie pak používá jako MF směsi CO₂ a alkoholu.

Většina derivátů *tris*(fenylkarbamátu) celulosy tvoří ve vysoce koncentrovaných roztocích lyotropní kapalnou krystalickou fázi, jejíž vysoce uspořádaná struktura je viditelná pod polarizačním mikroskopem. Vysoce pravidelná struktura fenylkarbamátových derivátů je zachována i na povrchu silikagelu. Deriváty, které netvoří lyotropickou kapalinu v roztoku, nejsou schopny chirálního rozpoznávání, ke kterému významnou měrou přispívá právě vysoce uspořádaná struktura derivátů celulosy. Mechanismy chirálního rozpoznávání byly u

těchto fází studovány na základě chromatografických měření, NMR studií a počítačového modelování. [13]

Chromatografická studie:

Hlavními adsorpčními místy CSP jsou polární karbamátové skupiny schopné interagovat s racemáty, se kterými tvoří vodíkové vazby (vazba analytu na NH a C=O skupiny CSP). Polaritu karbamátových skupin ležících v blízkosti glukosových jednotek a následně enantiosektivitu ovlivňují substituenty fenylového kruhu [13,17]. Pokud je na fenyl zaveden elektron-donorový substituent (methyl), dochází ke vzrůstu elektronové hustoty na karbonylu. Naopak substituce elektron-akceptorovou skupinou vede k zvýšení elektronové hustoty na NH skupině. Například aceton z mobilní fáze se proto bude silněji adsorbovat na CSP s větším počtem NH_3^+ skupin (vznik H-vazby). Substituce fenylového kruhu elektron-donorovou nebo elektron-akceptorovou skupinou v pozicích *meta* a/nebo *para* obvykle vede ke zvýšení rozlišovací schopnosti CSP, na rozdíl od derivátů substituovaných v *ortho*- poloze, které nejsou pro chirální separace vhodné. Pokud je substituentem polární skupina (nitro- nebo methoxy-), pak racemáty budou interagovat přednostně se substituenty navázanými na fenylovém kruhu a výsledkem bude snížení rozlišovací schopnosti CSP, protože substituent je daleko od chirální glukosové struktury. Naopak substituce objemnými alkoxy skupinami (isopropyl- nebo isobutoxy skupina) vede ke zlepšení rozlišení, protože dochází k omezení interakcí na kyslíkovém atomu etherové skupiny [23]. Vysoké chirální rozlišení je podmíněno pravidelnou, vysoce uspořádanou strukturou celulosy, kterou pomáhají udržet substituenty fenylového kruhu. Ty proto musí mít odpovídající velikost. Pro amylosové CSP platí obdobné závěry [31,32] s tím rozdílem, že *ortho*- substituované amylosové fenyلكarbamáty mají oproti celulosovým poměrně velkou rozlišovací schopnost [30].

Tris(fenylkarbamát) celulosy tvoří levotočivou 3/2 šroubovici s glukosovými jednotkami rozmístěnými podél osy šroubovice. Paralelně s hlavním řetězcem leží chirální helikální smyčka s polárními karbamátovými skupinami. Karbamátové skupiny jsou situovány dovnitř, zatímco hydrofobní aromatické skupiny jsou umístěny vně polymerního řetězce, takže interakce polárních analytů s karbamátovými zbytky bude probíhat převážně uvnitř šroubovice. Vazbu zprostředkovávají vodíkové vazby. Tyto interakce dominují separačnímu mechanismu zejména v normálním separačním módu. K chirálnímu rozlišení významnou měrou přispívají dipól-dipólové a π - π interakce mezi fenylovými skupinami CSP a analytem, které umožňují separaci nepolárních aromatických sloučenin. V reverzním separačním módu jsou pro dobré chirální rozpoznávání důležité určité typy hydrofobních

kavit, které vznikají mezi jednotlivými řetězci *tris*(fenyلكarbamátu) celulosy. *Tris*(fenyلكarbamát) amylosy tvoří 4/1 levotočivý helikální řetězec. Rozdíly v enantioselektivitě amylosových a celulosových CSP jsou přičítány rozdílnému uspořádání struktur (řetězců) [12,13,17]. Z chromatografické studie jednoznačně vyplývá, že interakce karbamátových skupin CSP s analyty (racemáty) je nejdůležitější pro chirální rozlišení. To potvrzuje také NMR studie.

NMR studie:

Objasnit mechanismus separace na celulosových nebo amylosových CSP NMR spektroskopii bylo složité, protože rozlišovací schopnost většiny fenyلكarbamátů polysacharidů je závislá na míře jejich rozpustnosti v polárních rozpouštědlech (tetrahydrofuran, pyridin nebo aceton), kde dochází přednostně k interakci rozpouštědla s polární karbamátovou skupinou polysacharidové CSP na místo s analyty. Proto mají polysacharidové CSP v těchto rozpouštědlech nízkou rozlišovací schopnost. Ovšem několik fenyلكarbamátových derivátů – například *tris*(4-trimethylsilylfenyلكarbamát) celulosy nebo *tris*(5-fluoro-2-methylfenyلكarbamát) celulosy – je rozpustných v chloroformu a je schopno rozlišovat enantiomery v ^1H i ^{13}C NMR spektroskopii stejně dobře, jako v HPLC, takže mohly být provedeny NMR studie interakcí probíhajících v roztoku [57,58,59,60]. Získané výsledky potvrzují závěry plynoucí z chromatografických studií.

Počítačové modelování

Počítačová simulace zahrnující molekulovou mechaniku a molekulární dynamiku může být užitečná pro objasnění mechanismu chirálního rozlišení u těch polysacharidových CSP, u kterých není proveditelná NMR studie. Díky počítačovému simulování lze předpovědět eluční pořadí enantiomerů. Lipkowitz a kol. na základě molekulové mechaniky a molekulární dynamiky a kvantově-mechanických výpočtů určili interakční energie mezi CSP a enantiomery, a navrhli mechanismus chirálního rozlišení [61,62].

Okamoto a Yashima pak vypočítali interakční energie mezi *tris*(fenyلكarbamátem) celulosy (CTPC) nebo *tris*(dimethylfenyلكarbamátem) celulosy (CDMPC) a *trans*-stilben oxidem, aby získali náhled na mechanismus chirálního rozpoznávání u derivátů fenyلكarbamátu celulosy nebo amylosy, nerozpustných v deuterovaném chloroformu. CTPC je pro svou definovanou strukturu a vysokou schopnost chirálního rozpoznávání vhodným kandidátem pro tyto studie. *Trans*-stilben oxid byl chromatograficky rozdělen na enantiomery na obou CSP, ale s opačným elučním pořadím jednotlivých enantiomerů. Na CTPC eluoval jako první *R, R* isomer ($\alpha = 1,46$), zatímco na CDMPC první eluoval *S, S* isomer ($\alpha = 1,68$). Rozdílné chování CDMPC a CTPC je pozorovatelné i ve zředěných roztocích, kde CDMPC

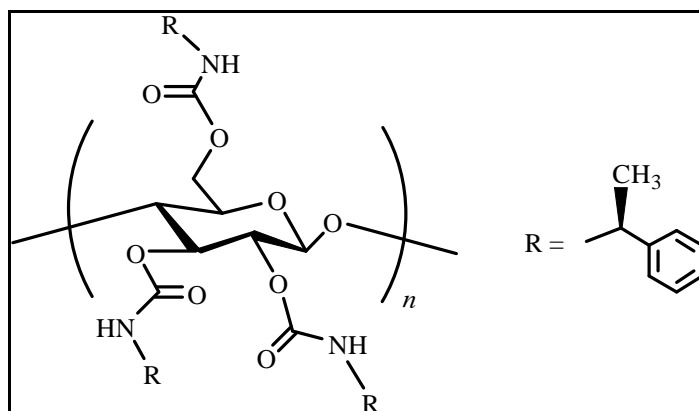
vykazuje zřetelnou optickou anisotropii na rozdíl od CTPC i dalších celulosových derivátů. [13,17]

2.3.3 Aralkylkarbamáty polysacharidů

Některé *tris*(aralkylkarbamáty) celulosy nebo amylosy prokázaly charakteristické rozlišovací schopnosti, které jsou zcela odlišné od fenyلكarbamátů. Z derivátů, které posloužily k přípravě CSP můžeme jmenovat např. benzyl-, 1-fenylethyl-, 1-fenylpropyl-, 2-methyl-1-fenylpropyl- a 1,1-difenylmethylkarbamáty celulosy. Schopnost rozpoznávat enantiomery je u 1-fenylpropyl- a 1-fenylethylkarbamátů proti ostatním derivátům vyšší, protože tyto skupiny přispívají k zachování vysoce uspořádané struktury polysacharidových derivátů, důležité pro chirální rozpoznávání. Obdobná situace je u derivátů amylosy. [17] (*S*)-1-Fenylethylkarbamát amylosy (Chiralpak AS, obr. 4) je zástupce skupiny aralkylkarbamátových CSP a je enantioselektivní pro řadu sloučenin (karbonylové sloučeniny, laktamy), jejichž separace na fenyلكarbamátových CSP byla neúspěšná.

Vliv chiralitý 1-fenylethylové skupiny na chirální diskriminaci 1-fenylethylkarbamátů celulosy nebo amylosy byl také studován. Výsledky ukázaly, že (*R,R*)-fenylethylkarbamát celulosy má vyšší schopnost chirálního rozpoznávání než (*R,S*)- nebo (*S,S*)-fenylethylkarbamát. V případě amylosy naopak lepší enantioselektivní rozpoznávání vykazuje (*S,S*)-fenylethylkarbamát [17].

Alkylkarbamáty polysacharidů jako například methyl-, isopropyl- a cyklohexylkarbamát celulosy nejsou pro separace chirálních látek příliš vhodné. *Tris*(*tert*-butylkarbamát) celulosy je enantioselektivní pro některé látky, ovšem okruh separovatelných látek je ve srovnání s fenyلكarbamáty celulosy výrazně užší.

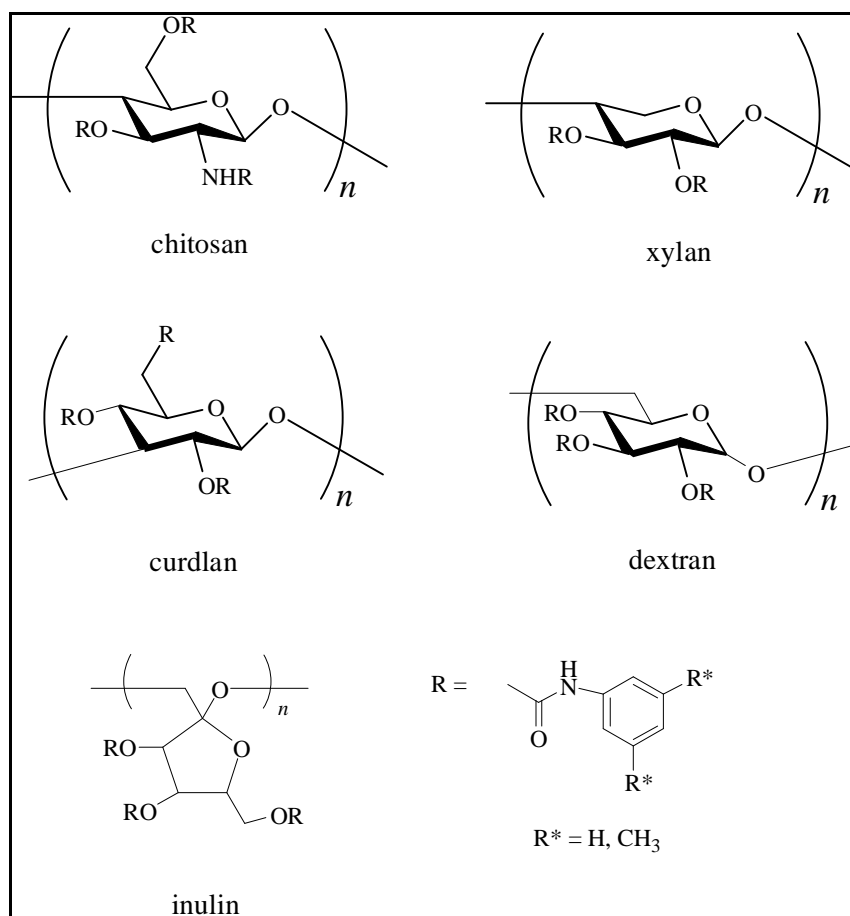


Obr. 4: Struktura (S)-1-fenylethylkarbamátu amylosy.

2.3.4 Jiné polysacharidové fenyلكarbamáty a oligosacharidy

Kromě CSP na bázi celulosy a amylosy se pro přípravu CSP používají i jiné sacharidy – chitosan, xylan, *b*-1,3-glukan (curdlan), dextran a inulin. Jejich struktura je uvedena na obr. 5. Schopnost chirálního rozlišování závisí na charakteru monosacharidových jednotek, charakteru a pozici substituentu a typu vazby. Poměrně vysokou schopnost chirálního rozpoznávání mají 3,5-dimethylfenylkarbamáty chitosanu a xylanu, přesto se však stejným celulosovým derivátům nemohou rovnat. Podobnou enantioselektivitu jako *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylosy má i (3,5-dimethylfenylkarbamát) amylopektinu, jedné ze složek škrobu. [13]

3,5-dimethylfenylkarbamáty celulosových oligosacharidů a 3,5-dimethylfenyl-, 4-chlor- a 4-bromfenylkarbamáty odvozené od oligosacharidů maltosy byly rovněž připraveny. Rozlišovací schopnost celulosových oligosacharidů je nižší než u stejného derivátu celulosy, což je způsobeno jejich rozdílnou strukturou. Naopak CSP na bázi oligosacharidů odvozených od amylosy a maltosy mají vzhledem k podobným strukturám podobné schopnosti chirálního rozpoznávání [13].

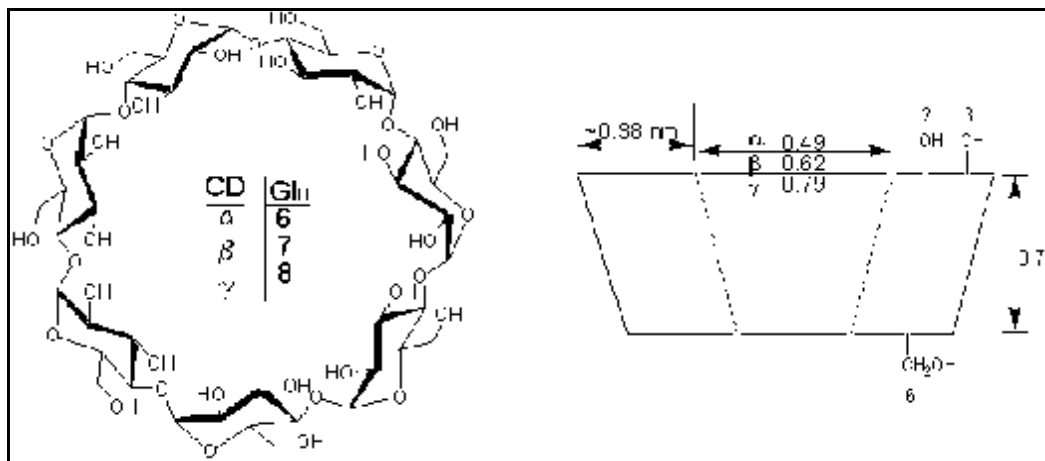


Obr. 5: Struktury polysacharidů, které se také používají pro přípravu CSP.

2.3.5 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD; obr. 6), nazývané také Schardingerovy dextriny, jsou cyklické oligosacharidy tvořené α -D-glukopyranosovými jednotkami navzájem spojenými α -1,4 vazbou. CD byly objeveny Villiersem roku 1891, ale první podrobný popis jejich přípravy a izolace provedl roku 1903 Schardinger. Cyklodextriny se získávají enzymatickým štěpením škrobu skupinou amylas, které se nazývají buď glykosyltransferasy, nebo cyklodextrinasy, a jsou bakteriálního původu (*Bacillus macerans*). Struktura škrobu, resp. jeho šroubovice, je hydrolýzou rozrušena, a její konce jsou spojeny α -1,4 vazbami. Protože enzymy nejsou vysoce specifické, výsledkem je směs cyklodextrinů obsahujících 6, 7 a 8 glukosových jednotek dohromady s malým množstvím vyšších analogů, obsahujících až 13 glukosových jednotek. Cyklodextriny tvořené méně než šesti glukosovými jednotkami nejsou dostatečně stabilní, jednotlivé glukosové jednotky si vzájemně stericly překáží, a proto takové CD

nevznikají, resp. nejsou známy. Praktické využití mají cyclodextriny složené ze 6, 7 a 8 glukosových jednotek, které se nazývají α -, β - a γ -cyclodextriny. [63]



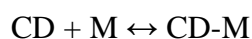
Obr. 6: Struktura a rozměry cyclodextrinu.

Glukopyranosové jednotky (všechny v židličkové konformaci) cyclodextrinu tvoří kónický prstenec s oběma konci otevřenými. Širší strana je tvořena sekundárními C2- a C3-hydroxylovými skupinami, zatímco na užším konci jsou primární C6- hydroxylové skupiny. Počet glukosových jednotek tvořících CD určuje rozměry a velikost dutiny (základní charakteristiky viz tab. 1), která je lemována vodíkovými atomy a glykosidickými kyslíkovými můstky. Nevazebné elektronové páry glykosidických kyslíkových můstků jsou orientovány dovnitř dutiny, kde pak stoupá elektronová hustota. Výsledkem takového uspořádání funkčních skupin CD je hydrofobní charakter dutiny, zatímco vnější okraj dutiny je poměrně polární díky navázaným C2- a C3- hydroxylovým skupinám. Ty bývají často derivatizovány různými substituenty a dochází tak ke vzniku velkého počtu derivátů hojně využívaných v separačních systémech [63,65]. Prstenec intramolekulárních vodíkových vazeb, který se vytváří mezi C2- a C3- hydroxylovými skupinami přilehlých glukosových jednotek, je příčinou dosti rigidní struktury CD [63]. Za normálních podmínek, tedy při pH vyšším než 3,5 a teplotě nižší než 60 °C, jsou cyclodextriny stabilní.

Tab. 1: Základní charakteristiky/fyzikálně-chemické vlastnosti cyklodextrinů.

Charakteristika	α	β	γ
Počet glukosových jednotek	6	7	8
Molekulová hmotnost	972	1135	1297
Rozpustnost ve vodě[g/100 ml]	14,5	1,85	23,2
Průměr kavity [Å]	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Výška kavity CD[Å]	7,9±0,1	7,9±0,1	7,9±0,1
pK_a	12,33	12,20	12,08

Charakteristickou vlastností cyklodextrinů je jejich schopnost vytvářet inkluzní komplexy s různými molekulami od organických po anorganické látky iontové nebo neutrální povahy až po vzácné plyny. Jedinou nutnou podmínkou je „fit“ molekuly do kavity CD. Vznik inkluzního komplexu v roztoku je rovnovážný dynamický proces, který lze charakterizovat rovnicí



kde M je molekula a CD-M je inkluzní komplex cyklodextrinu a molekuly.

Vazebné síly podílející se na vytvoření komplexu jsou (i) van der Waalsovy nebo hydrofobní interakce mezi hydrofobní skupinou molekuly a kavitou CD (ii) vodíkové vazby mezi polárními funkčními skupinami molekuly a OH- skupinami CD (iii) uvolnění molekul vody s vysokou energií z kavity CD v průběhu tvorby komplexu (iv) uvolnění deformační energie v prstencovém systému CD. Bez ohledu na to, jaké síly se podílejí na vzniku komplexu, geometrie a polarita molekul, vlastnosti prostředí a teplota jsou nejdůležitějšími faktory určující stabilitu inkluzního komplexu. Molekula menší než je kavita daného CD bude snadno vstupovat a opouštět tuto kavitu aniž by docházelo k vazbě. Molekuly větší než kavita CD také mohou tvořit inkluzní komplexy, ovšem do CD kavity vstupují pouze určité skupiny nebo postranní řetězce molekuly. Jak již bylo zmíněno, stabilita inkluzního komplexu závisí na polaritě molekuly. Jinak řečeno, komplex mohou tvořit substráty, které jsou méně polární než voda. Stabilita komplexu CD-molekula je pak úměrná hydrofobnímu charakteru molekuly. S rostoucí teplotou klesá stabilita komplexu CD a molekuly. [63,66]

Uplatnění cyklodextrinů je velice široké, používají se například ve farmaceutickém průmyslu jako komplexační činidla, rozpouštědla nebo ředidla, a také jako přísady tablet buď zlepšující fyzikálně-chemické vlastnosti nebo zvyšující biologickou dostupnost málo

rozpuštěných léků [67,68]. V potravinářském, kosmetickém a tabákovém průmyslu slouží cyklodextriny jako stabilizátory chuťových a vonných přísad, dále pomáhají odstraňovat nežádoucí příchutě nebo pomáhají zamezovat mikrobiologické kontaminaci. V průmyslu barev a laků slouží CD jako stabilizátory barevných pigmentů [63].

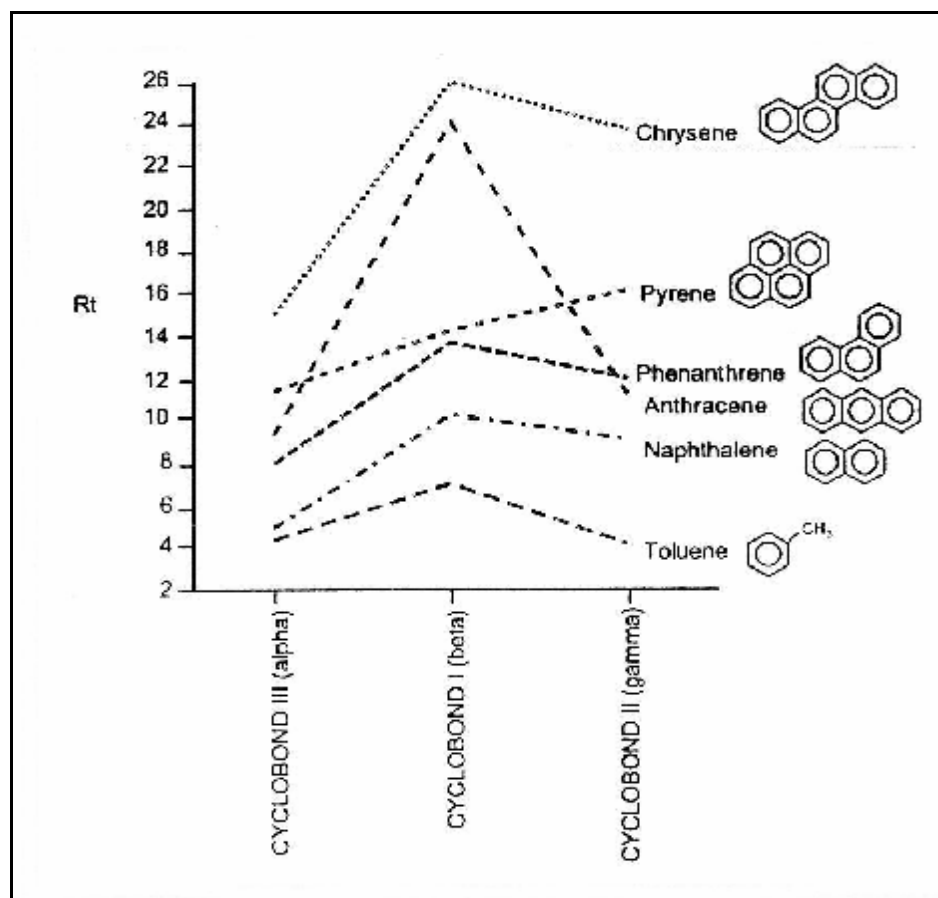
V separačních metodách je využití CD velmi rozsáhlé. V tenkovrstvé chromatografii se převážně používají přídavky CD do mobilní fáze, kde přispívají ke zlepšení selektivity nebo zvýšení citlivosti chromatografické detekce. Protože CD inhibují některé enzymy, používají se v afinitní chromatografii – například β -CD je afinitním ligandem pro α -amylasy z obilnin. V elektroforéze se cyklodextriny přidávají do nosného elektrolytu při separaci strukturních isomerů a strukturně příbuzných látek. V plynové chromatografii slouží CD a jejich deriváty, kterými často bývají acylované α - a β -CD (α -CD acetát, β -CD acetát, β -CD propionát, butyrát a permethylované CD), jako stacionární fáze pro separaci alkoholů, ketonů, esterů, isomerních xylenů a dalších látek. [63,69,70].

V HPLC se cyklodextriny využívají dvěma způsoby. První možností je navázání CD nebo jeho derivátu na pevný nosič, kterým zpravidla bývá silikagel, a vytvoření CSP. Druhým způsobem je přidání cyklodextrinu nebo jeho dobře rozpustného derivátu do mobilní fáze. S ohledem na vlastnosti cyklodextrinů, kterými jsou (i) selektivní a reverzibilní tvorba inkluzních komplexů, (ii) rozpustnost ve vodě, (iii) odolnost vůči světlu a nulová absorpce v UV oblasti a (iv) stabilita ve velkém rozsahu pH, umožňuje jejich použití jako aditiv mobilních fází v reverzním módu. Takto byla separována řada isomerů (strukturní, diastereoismery i enantiomery) a chirálních látek, například barbiturátů, kyseliny mandlové a jejich derivátů, fenylalaninu, α -pinenu nebo pseudoefedrinu. [63]

Cyklodextrinové CSP vznikají tak, že se jedna nebo dvě primární hydroxylové skupiny (pozice 6 na glukosové jednotce) CD kovalentně váží na silikagel. V chirální HPLC se používají CSP na bázi jak nativních, tak derivatizovaných CD. Derivatizace pak probíhá na sekundárních hydroxylových skupinách, přednostně v pozici 2 následované derivatizací v pozici 3. Cyklodextrinové deriváty mají jiné fyzikální a chemické vlastnosti než přírodní CD, často obsahují více chirálních center, poskytují více interakčních míst, a jsou selektivní pro větší množství chirálních látek [71].

Data získaná rentgenovou strukturní krystalografií naznačují, že β a γ struktury jsou rigidní, neohebné a jsou stále v širokém rozsahu vodných a organických rozpouštědel, zatímco vazby α -CD se zdají slabší a elastické. Proto mohou i větší molekuly vykazovat inkluzi do kavity α -CD, která se tím zdeformuje [72]. Obecně platí, že β -cyklodextrin je vhodný pro separaci substituovaných fenylů, naftylů a bifenylů, zatímco menší molekuly se

budou lépe dělit na α -CD. Molekuly obsahující tři až pět cyklů, jako jsou například steroidy, se budou separovat na γ -CD. Schematicky je retence různě objemných cyklů na jednotlivých typech CD ukázána na obr. 7. [63,71].



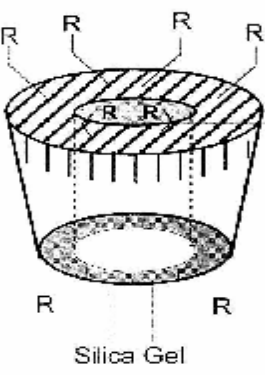
Obr.7: Retence polyaromatických uhlovodíků na α -, β -, a γ -cyclodextrinu. Obr. převzat z [71].

Nejpoužívanější cyclodextrinové CSP jsou založeny na β -CD, protože β -CD má rozměr kavity (vnitřní průměr 8Å) vhodný pro inkluzi řady farmaceuticky významných látek a je snadno dostupný. Na β -CD se separují látky obsahující dva až čtyři cykly, z nichž alespoň jeden je aromatický [64]. Vzhledem k častému využití β -CD CSP je zřejmé, že většina CSP založených na cyclodextrinových derivátech je odvozena právě od β -CD. Nejčastější deriváty β -CD jsou uvedeny v tab. 2. Dimetylovaná verze se používá pouze v reverzním módu, kde v mechanismu chirálního rozlišení převládají sterické interakce probíhající při okrajích kavity. Na této CSP byl separován např. warfarin. V případě CSP založené na acetylovaném

β -CD převládají v rozlišovacím mechanismu vodíkové vazby. Tuto CSP lze použít jak v reverzním, tak v polárně-organickém módu a je vhodná pro analyty, jejichž aromatická část obsahuje stereogenní centrum s hydroxylovou nebo aminovou skupinou v α nebo β pozici. Na této CSP byly separovány například homoatropin a chirální látky nesoucí ve své struktuře síru nebo fosfor. Další CSP na bázi derivatizovaného cyklodextrinu je hydroxypropylether- β -cyklodextrinová CSP). Hydroxylová skupina tohoto derivátu zvyšuje pravděpodobnost tvorby vodíkových vazeb a napomáhá sterickým interakcím zejména těch enantiomerů, které obsahují v poloze beta ke stereogennímu centru objemné substituenty. Z dalších cyklodextrinových derivátů lze zmínit *R*- nebo *S*-naftylethylkarbamát- β -cyklodextrin a 3,5-dimethylfenylkarbamát- β -cyklodextrin. Ty ve své struktuře obsahují jak skupiny schopné tvorby vodíkových vazeb, tak skupiny poskytující π - π interakce. K inkluzi analytu do kavity CD dochází i na těchto CSP. Použité rozpouštědlo (separační mód) významně ovlivňuje typ převládajících interakcí. [71]

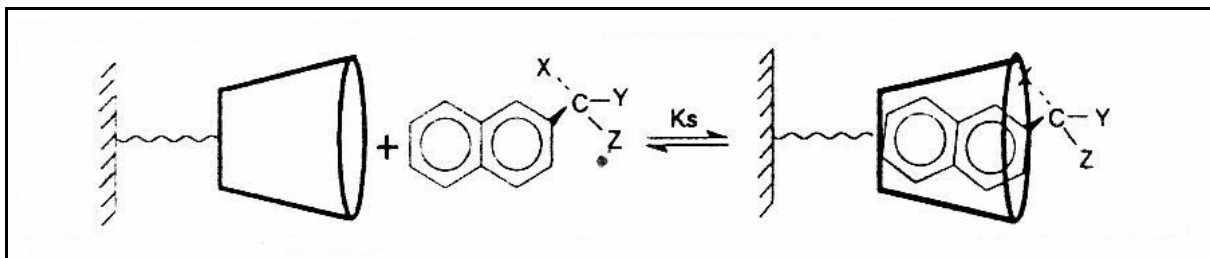
Obecně platí, že pro dosažení požadované selektivity musí být vybrána odpovídající velikost kavity CD. Inkluze molekuly analytu do kavity CD závisí na typu substituentu. Pokud molekuly analytu obsahují disperzní skupiny (halogeny, sulfo- nebo fosfoskupiny,) inkluze probíhá snadno. Pokud analyt obsahuje polární skupiny (aminy, aldehydy, ketony, kyseliny), pak do kavity CD nevstupuje a přednostně interaguje s jejím povrchem. [72]

Tab. 2: Přehled často používaných CSP na bázi derivatizovaného β -cyklodextrinu. Tab. převzata z [71].



R=	CYCLOBOND I 2000 SUFFIX
---OCH_3	DM (dimethylated)
---COCH_3	AC** (acetylated)
$\text{---CH}_2\overset{\text{OH}}{\underset{*}{\text{C}}}\text{HCH}_3$	SP or RSP (hydroxypropyl ether)
$\text{---CONHCH} \begin{array}{c} \text{Cl}_3 \\ \\ \text{---} \end{array} \begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array}$	RN or SN (naphthylethyl carbamate)
$\text{---CONH} \begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{CH}_3 \end{array}$	DMP (3,5-dimethylphenyl carbamate)

Na cyklodextrinových CSP lze pracovat ve třech separačních módech. Velmi často se CD CSP používají v reverzním módu, kde mobilní fáze bývá tvořena směsí ACN nebo MeOH s vodou nebo vodným roztokem pufru. V reverzním módu se nejvíce uplatňuje mechanismus inkluze nepolární části analytu do kavity CD - schéma vzniku inkluzního komplexu ilustruje obr. 8. Polární funkční skupiny analytu v blízkosti chirálního atomu mohou interagovat s hydrofilním okrajem CD a přispět tak k diskriminačnímu mechanismu.



Obr. 8: Vznik inkluzního komplexu. Obr. převzat z [71].

Druhým separačním módem, ve kterém se cyclodextrinové CSP používají, je normální mód s mobilními fázemi tvořenými nepolárními rozpouštědly (*n*-hexan nebo *n*-heptan) ve směsi s ethanolem nebo propan-2-olem. V tomto systému se v mechanismu enantioseparace neuplatňuje inkluze analytu do kavity CD. Upřednostňovány jsou spíše vodíkové vazby a π - π interakce [64,71,73]. Přídavek malého množství octové nebo trifluoroctové kyseliny vede jak ke zlepšení symetrie píků, tak ke zvýšení enantioselektivity.

Na CD CSP lze použít polárně-organický mód. Mobilní fáze jsou tvořeny zejména acetonitrilem s přídavkem methanolu, který upravuje retenci analytů. Methanol přednostně tvoří vodíkové můstky s CD, což vede ke zkrácení retence. Podstatou separace je tvorba vodíkových můstků mezi chirálním analytem a (i) sekundárními hydroxylovými skupinami nativních CD nebo (ii) s karbamátovými, acetátovými, hydroxypropylovými a zbytkovými hydroxylovými funkčními skupinami derivatizovaných CD. Enantioselektivitu ovlivňuje, stejně jako v normálním módu, přídavek malého množství octové nebo trifluoroctové kyseliny – dochází ke stimulaci vzniku vodíkové vazby v bezvodém prostředí. Polárně-organický mód je vhodný zejména pro enantioseparaci látek obsahujících nejméně dvě funkční skupiny schopné elektrostatických interakcí, z nichž je alespoň jedna v blízkosti stereogenního centra analytu. [64,72,73]

Literatura

1. J. Kroutil, dostupné z URL:
<http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/27kroutil.pdf>
[cit. 10.9.2009]
2. O. Červinka; Chem. Listy 93 (1999) 294-305.
3. Q. Zhong, X. Han, L. He, T. E. Beesley, W. S. Trahanovsky, D. W. Armstrong; J. Chromatogr. A, 1066 (2005) 55-70.
4. F. Gasparrini, D. Misiti, R. Pompietti, C. Villani; J. Chromatogr. A 1064 (2005) 25-38.
5. X. Han, Ch. Wang, L. He, T. E. Beesley, D. W. Armstrong; Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 2681-2697.
6. D. W. Armstrong, B. Zhang; Anal. Chem. 73 (2001) 557A-561A.
7. W. H. Pirkle, J. M. Finn, J. L. Schreiner, B. C. Hamper; J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 3964-3966.
8. W. H. Pirkle, T. C. Pochapsky; Chem. Rev. 89 (1989) 347-362.
9. G. Gübitz, M. G. Schmid; Biopharm. Drug Dispos. 22 (2001) 291-336.
10. J. Haginaka; J. Chromatogr. A 906 (2001) 253-273.
11. J. Haginaka; J. Chromatogr. B 875 (2008) 12-19.
12. E. Yashima; J. Chromatogr. A 906 (2001) 105-125.
13. Y. Okamoto, E. Yashima; Angew. Chem. Int. Ed. 37 (1998) 1020-1043.
14. K. Tachibana, A. Ohnishi; J. Chromatogr. A 906 (2001) 127-154.
15. E. Yashima, C. Yamamoto, Y. Okamoto; Synlett 4 (1998) 344-360.
16. H. Y. Aboul-Enein; J. Chromatogr. A 906 (2001) 185-193.
17. Y. Okamoto, Y. Kaida; J. Chromatogr. A 666 (1994) 403-419.
18. Y. Okamoto; J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 47 (2009) 1731-1739.
19. G. Hesse, R. Hagel; Chromatographia 6 (1973) 277-280.
20. E. Francotte, R. M. Wolf, D. J. Lohmann; J. Chromatogr. 347 (1985) 25-37.
21. E. Francotte, R. M. Wolf; Chirality 2 (1990) 16-31.
22. R. Isaksson, P. Erandsson, L. Hansson, A. Holmberg, S. Berner; J. Chromatogr. 498 (1990) 257-280.
23. Y. Okamoto, T. Ohashi, Y. Kaida, E. Yashima; Chirality 5 (1993) 616-621.
24. E. Francotte, R. M. Wolf; Chirality 3 (1991) 43-55.
25. I. W. Wainer, R. M. Stiffin, T. Shibata; J. Chromatogr. 411 (1987) 139-151.
26. I. W. Wainer, M. C. Alembik; J. Chromatogr. 358 (1986) 85-93.

27. I. W. Wainer, M. C. Alembik, E. Smith; *J. Chromatogr.* 388 (1987) 65-74.
28. B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto; *J. Chromatogr. A* 670 (1994) 39-49.
29. B. Chankvetadze, L. Chankvetadze, S. Sidamonidze, E. Kasashima, E. Yashima, Y. Okamoto; *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 67-77.
30. B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto; *J. Chromatogr. A* 694 (1995) 101-109.
31. Y. Okamoto, Y. Kaida, H. Hayashida, K. Hatada; *Chem. Lett.* (1990) 909-912.
32. Y. Kaida, Y. Okamoto; *J. Chromatogr.* 641 (1993) 267-278.
33. E. Yashima, H. Fukaya, Y. Okamoto; *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 11-19.
34. T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, Y. Okamoto; *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 2-11.
35. K. Tachibana, A. Ohnishi; *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 127-154.
36. T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, Y. Okamoto; *Polym. J.* 38 (2006) 91-108.
37. I. Ali, H. Y. Aboul-Enein; *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 762-769.
38. P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillón; *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 155-170.
39. B. Chankvetadze, T. Ikai, C. Yamamoto, Y. Okamoto; *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 55-60.
40. B. Chankvetadze, T. Kubota, T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, N. Tanaka, K. Nakanishi, Y. Okamoto; *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1988-1995.
41. T. Wakita, B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto; *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 167-169.
42. F. Ling, E. Brahmachary, M. Xu, F. Svec, J. M. J. Fréchet; *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1337-1346.
43. X. Chen, H. Zou, Q. Zhang, J. Ni, Z. Zhang; *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 315-320.
44. N. Enomoto, S. Furukawa, Y. Ogasawara, H. Akano, Y. Kawamura, E. Yashima, Y. Okamoto; *Anal. Chem.* 68 (1996) 2798-2804.
45. H. G. Bretinger; *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 6127-6131.
46. T. Kubota, C. Yamamoto, Y. Okamoto; *Chirality* 15 (2003) 77-82.
47. L. Oliveros, P. López, C. Minguillón, P. Franco; *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995) 1521-1532.
48. X. Chen, F. Qin, Y. Liu, X. Huang, H. Zou; *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 109-116.
49. C. Minguillón, P. Franco, L. Oliveros, Pilar López; *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 407-414.
50. E. Francotte, D. Huynh; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 421-429.

51. S. Zhang, T.-T. Ong, S.-C. Ng, H. S. O. Chan; *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 5487-5490.
52. T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, Y. Okamoto; *Chem. Lett.* 35 (2006) 1250-1251.
53. T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, Y. Okamoto; *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 151-158.
54. X. Chen, Y. Liu, F. Qin, H. Zou; *J. Chromatogr. A* 1010 (2003) 185-194.
55. T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco; *J. Chromatogr. A* 1191 (2008) 214-222.
56. L. Thunberg, J. Hashemi, S. Andersson; *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 72-80.
57. E. Yashima, M. Yamada, Y. Okamoto; *Chem. Lett.* (1994) 579-582.
58. E. Yashima, M. Yamada, C. Yamamoto, M. Nakashima, Y. Okamoto; *Enantiomer* 2 (1997) 225-240.
59. M. T. Reetz, J. Rudolph, R. Mynott; *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 4494-4495.
60. E. Yashima, C. Yamamoto, Y. Okamoto; *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 4036-4048.
61. K. B. Lipkowitz; *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 493-503.
62. K. B. Lipkowitz; *J. Chromatogr. A* 694 (1995) 15-37.
63. S. Li, W. C. Purdy; *Chem. Rev.* 92 (1992) 1457-1470.
64. M. Gilar, E. Tesařová, V. Patzelová, Z. Deyl; *Chem. Listy* 88 (1994) 514-526.
65. S. G. Allenmark; *Chromatographic enantioseparation methods and applications*, J. Wiley and Sons Ltd., New York (Chichester), 1988, kap.7.
66. J. Szejtli; *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743-1753.
67. R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, R. K. Khar; *AAPS PharmSciTech* 6 (2005) E329-E357.
68. A. Rasheed, A. Kumar C. K., Sravanthi V.V.N.S.S; *Sci Pharm* 76 (2008) 567-598.
69. T. E. Beesley, R. P. W. Scott; *Chiral Chromatography*, J. Wiley and Sons Ltd. Chichester, England, 1998, kap. 5 s.119-124.
70. T. J. Ward, B. A. Baker; *Anal. Chem.* 80 (2008) 4363-4372.
71. Cyclobond™ Handbook, Astec USA, 2006, 6. edice.
72. T. E. Beesley, R. P. W. Scott; *Chiral Chromatography*, J. Wiley and Sons Ltd. Chichester, England, 1998, kap. 8 s. 253-261.
73. K. Štulík, a kolektiv; *Analytické separační metody*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2004, s. 248.

2.4 CSP na bázi syntetických polymerů

Chirální kolona pro HPLC může být tvořena buď malými opticky aktivními molekulami, nebo polymery navázanými na pevný nosič a majícími vysoké rozlišovací schopnosti. V roce 1981 byly uvedeny na trh chirální polymerní náplňové materiály vyvinuté Pirklem a Pochapským [1]. O rok později je následovala CSP skládající se z jednostranného helikálního poly(trifenylmethylmetakrylátu) vyvinuté Okamotoem a kol. [2,3]. Od té doby byla připravena celá řada syntetických chirálních selektorů a následně i příslušných CSP. V posledních letech je zájem soustředěn na zcela syntetické polymerní chirální stacionární fáze na bázi vinylových, polyamidových a polyuretanových polymerů [4].

Syntetické polymerní CSP mají celou řadu atraktivních znaků jako například možnost zapojení velkého množství různých chemických struktur, jednoduchost chemické modifikace těchto struktur nebo možnost získání chirálního selektoru s opačnou absolutní konfigurací a s tím související snadná změna elučního pořadí separovaných enantiomerů. Proto se jejich výzkum v současnosti velmi rozvíjí, i když zatím nedosáhly srovnatelného úspěchu např. s polysacharidovými stacionárními fázemi [5].

Syntetické polymerní chirální stacionární fáze se vyznačují vysokou stabilitou v širokém rozmezí hodnot pH, použitelností ve velkém množství mobilních fází, zejména pak v normálním či polárně-organickém módu, a vysokou dávkovací kapacitou (možnost dávkovat vysoké koncentrace analytů). Tyto CSP jsou díky hustému pokrytí povrchu silikagelu nebo jiného nosiče chirálním selektorem vhodné k použití v semipreparativním nebo v preparativním měřítku [4]. K dobrému rozlišení vzorků dávkovaných ve vysokých koncentracích na kolonu přispívá i to, že polymer vázaný jednoduchou vazbou nebo adsorbovaný na nosič stacionární fáze může současně interagovat s několika molekulami analytu. Na rozdíl od CS tvořených malými molekulami, které jsou obvykle vázané na povrch silikagelu, mohou chirální polymery být buď chemicky navázány, zpravidla kovalentní vazbou (bonded), nebo pokrývají (coated) povrch silikagelové matrice. Pokrytím rozumíme fyzikální adsorpci polymeru na povrchu pevné matrice. Navíc mohou chirální polymery vytvářet monolitický gel. Schopnost malých molekul rozdělovat látky na enantiomery je ovlivněna hlavně jejich strukturou. Naproti tomu mechanismus chirální separace na polymerních stacionárních fázích je složitější, protože musí být brána v úvahu ještě sekundární struktura, kterou polymery vytvářejí. Ta často rozhoduje o chirálním rozlišení. Obecně je snazší zvýšit pokrytí povrchu silikagelu polymerem než malými molekulami CS,

kovalentně vázanými na silikagel. Proto můžeme na syntetické nebo semisyntetické polymerní kolony dávkovat velká množství vzorku [6,7].

2.4.1 Polymerní chirální materiály

Syntetických polymerních chirálních stacionárních fází pro HPLC existuje celá řada. Jak již bylo zmíněno v předešlých odstavcích, syntetické polymerní CSP mají mnoho atraktivních vlastností. Jedná se zejména o jejich strukturní a chemickou variabilitu, možnost připravit obě enantiomerní verze dané CSP a chemickou a termální stabilitu náplně kolon, vycházející z kovalentního připojení chirálního polymeru k pevné matici. Pokud není dodržen stupeň polymerizace, hustota pokrytí pevné matrice chirálním polymerem a architektura polymeru, mohou syntetické CSP trpět pomalou kinetikou přenosu hmoty a sníženou účinností. Pro přípravu zdokonalených CSP jsou vysoce žádoucí polymerní materiály formující tenkou, uspořádanou vrstvu na silikagelové matici („polymer brushes“) bez pozměnění morfologie pórů. [8] Polymery můžeme rozřadit do tří hlavních skupin podle typu polymerizace. První skupinu tvoří adiční polymery – sem patří vinylové, aldehydové, isokyanidové a acetylenové polymery. Do druhé skupiny řadíme polymery vzniklé kondenzací, jako jsou polyamidy a polyuretany. Třetí skupinu pak tvoří zesíťované gely [9].

Pro přípravu polymerních CSP byly použity nejméně čtyři postupy. První, používaný Blaschkem a jeho kolegy, spočíval v kopolymerizaci chirálních monomerů s achirálním síťovacím činidlem. Takto byly připraveny chirální akrylamidy nebo metakrylamidy. Jako síťovací činidlo byl použit ethylendiakrylát. Tyto CSP však nesnesly vysoké tlaky, proto jejich hlavní uplatnění spočívalo zejména v preparativní chromatografii [6]. Druhý způsob přípravy chirálních polymerů vycházel z asymetricky katalyzované polymerizace prochirálních monomerů. Tento způsob užíval například Okamoto a jeho skupina, kteří připravili jednostranné „one-handed“ polymery z prochirálních monomerů (například trifenylmethylmetakrylát (TrMA) a difenyl-2-pyridylmethylmetakrylát (D2PymA)) cestou asymetricky katalyzované aniontové polymerizace. Tyto vzniklé chirální polymery byly buď vázány, nebo adsorbovány na silikagel za vzniku příslušné chirální stacionární fáze [2,3,10]. Třetí, Allenmarkův přístup spočíval v katalyzované kopolymerizaci chirálních monomerů obsahujících diallylové skupiny s multifunkčními hydrosilanovými molekulami za vzniku sítě polymerních chirálních selektorů. Jako monomery byly používány deriváty *N,N'*-diallyl-L-diamidu kyseliny vinné (DATD) a deriváty *trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11*S*,12*S*)-11,12-dikarboxylové kyseliny. Takto vzniklý chirální selektor byl následně

navázán na silikagel nesoucí vinylovou funkční skupinu, a tím byla vytvořena CSP [11,12,13]. Poslední způsob přípravy CSP zahrnuje vytvoření lineárního homopolymeru navázaného na povrch silikagelové matrice. Takto byly vytvořeny polyakrylamidové a polymetakrylamidové CSP s fenylalaninovými, 1-fenylethyleovými, 1-cyklohexylethylenovými, penicilinovými, mentonovými nebo mentolovými skupinami. Tyto stacionární fáze však byly enantioselektivní pouze pro několik chirálních molekul. [4]

2.4.2 *Trans*-1,2-diaminocyklohexan jako chirální selektor

Poprvé byla syntéza *trans*-1,2-diaminocyklohexanu (DACH) popsána Wielandem a jeho kolegy, kteří jej získali konverzí kyseliny hexahydroftalové na hydrazid a následnou Curtiovou reakcí v roce 1926 [14]. Tento diamin je C_2 symetrický a rekrystalizací s kyselinou vinnou lze získat čistý (*R,R*)- nebo (*S,S*)-DACH. V průmyslu se *trans*-1,2-diaminocyklohexan získává jako vedlejší produkt čištění 1,6-diaminohexanu, výchozího materiálu pro výrobu Nylonu 66. Enantiomerně čistý DACH je tedy komerčně dostupný za poměrně nízké ceny [6,14]. Jak čisté enantiomery, tak i deriváty *trans*-DACHu mohou sloužit jako účinné stereogenní ligandy v asymetrické syntéze [14] nebo jako složky chirálních stacionárních fází [15-23].

O molekule *trans*-1,2-diaminocyklohexanu se jako o potenciálním novém chirálním selektoru začalo poprvé uvažovat až na základě kladných výsledků získaných použitím derivátů DACHu jako chirálních katalyzátorů v asymetrické indukci [23]. Jak bylo zmíněno v předchozím odstavci, molekula DACHu obsahuje C_2 osu symetrie, která je podobná mnoha dalším chirálním katalyzátorům používaným v chromatografických separacích opticky aktivních látek. DACH má navíc další výhodné vlastnosti:

- (a) jednoduché získání jednotlivých enantiomerních forem *trans*-1,2-DACHu;
- (b) pevné ukotvení k silikagelové matrici, kdy dochází k vytváření velmi stabilních kovalentních vazeb mezi DACHem a matricí;
- (c) snadná derivatizace DACHu, možnost jednoduchého navázání dalších funkčních skupin, a tím zlepšení či rozšíření procesu chirálního rozpoznávání molekul;
- (d) rigidní struktura.

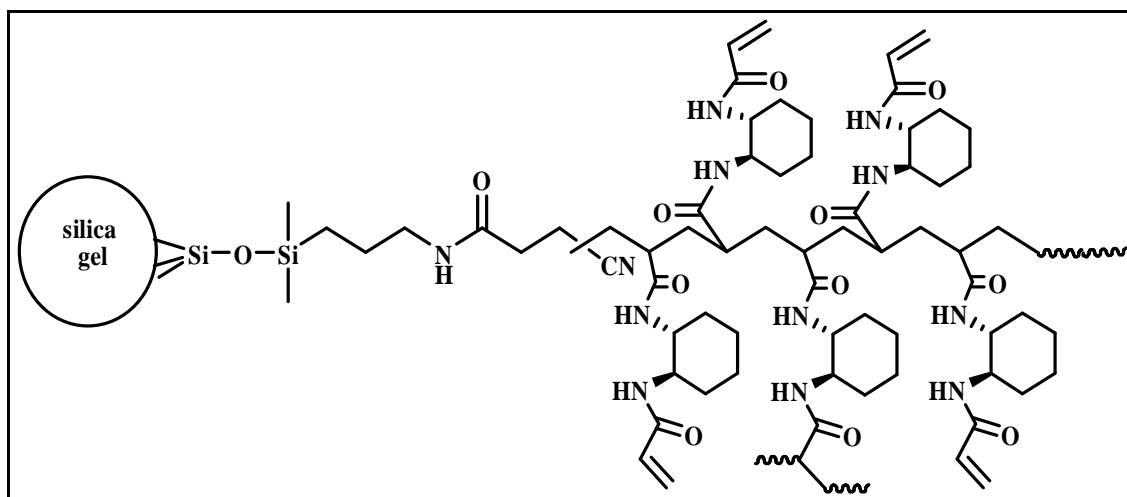
Pokud je molekula *trans*-1,2-diaminocyklohexanu derivatizována různými aromatickými chloridy, dochází ke vnesení π - π donor-akceptorových míst do rigidní struktury se dvěma stereogenními centry. Tím dochází ke zvýšení počtu možných interakcí (H-vazba, π - π interakce, sterickej efekt) mezi analytem a chirálním selektorem a následně k výraznému

zlepšení stereoselektivity celého systému [8]. Tímto přístupem se rozšiřuje i aplikační oblast tohoto CS. V literatuře se často zmiňuje CSP na bázi *N,N'*-3,5-dinitrobenzoyl derivátu *trans*-1,2-diaminocyklohexanu [15,19,20,21,25,26,27,28]. Tato CSP, také označovaná DACH-DNB, patří do skupiny π -donorových a π -akceptorových CSP [29,30,31]. Na této chirální stacionární fázi byly s úspěchem separovány β -blokátory, protizánětlivé látky (1-naftalen methyamid) [28], amidy, alkoholy, estery, ketony, kyseliny, fosfinové oxidy [31], methylestery aryloxysubstituované kyseliny octové [26], P-chirální fosfinoylethény [15], β -aminoestery [25] a řada dalších látek. CSP na bázi derivatizovaného *trans*-1,2-diaminocyklohexanu existuje celá řada. Jednotlivé CSP se mezi sebou liší hlavně typem substituentu, který je navázán na DACH, a také skupinou (akrylamid, vinyl etc.), která umožňuje vazbu na silikagel.

2.4.3 P-CAP

První CSP na bázi *trans*-1,2-diaminocyklohexanu byly připraveny Gasparriniho skupinou v devadesátých letech 20. století. Tato chirální stacionární fáze vznikla radikálovou kopolymerizací chirálního monomeru diamidu s 3-merkaptopropyl silikagelem [17,32]. Monomerní *trans*-1,2-cyklohexandiamin akrylamid pak vytváří zesíťovaný poly-DACH-ACR. Gasparrini provedl i předběžnou chromatografickou evaluaci této CSP. Gasparriniho skupina se syntéze, evaluaci a studiu vlastností CSP na bázi DACH věnovala intenzivně, což dokazuje řada publikací [16,17,18,21,23,25,27,28,32,33,34].

Především výsledky využil Armstrong se svou skupinou asi o deset let později, kdy byla připravena CSP na bázi poly(*trans*-1,2-diaminocyklohexandiyl-bis akrylamidu). Tato CSP je komerčně dostupná pod názvem Poly-Cyclic Amine Polymer (P-CAP). P-CAP vzniká radikálově iniciovanou polymerizací *N,N'*-diakryloyl derivátu DACHu. Před započítím samotného procesu volné radikálové polymerizace byl volný radikálový iniciátor imobilizován na povrchu silikagelu. Proto je, na rozdíl od polymeru připraveného Gasparrinim, P-CAP značně rigidní lineární „brush-type“ polymer, jehož větve tvoří jednotky *trans*-1,2-diaminocyklohexan akrylamidu. Obr. 9 uvádí strukturu (*R,R*)-P-CAPu. Struktura (*S,S*)-P-CAPu má opačnou konfiguraci každého stereogenního centra cyklohexylových jednotek než (*R,R*)-P-CAP. Proto je snadné dosáhnout opačné selektivity resp. změny elučního pořadí analytů použitím buď jednoho, nebo druhého enantiomerního typu (buď (*1S,2S*), nebo (*1R,2R*)) stacionární fáze P-CAP. Tuto CSP lze velmi dobře použít v preparativním měřítku.



Obr. 9: Struktura chirální stacionární fáze (*R,R*)-P-CAP.

Pokud jsou chirální monomer a radikálový iniciátor přítomny v roztoku, pak chirální polymer vzniká převážně také v roztoku, a následně je jedním koncem připojen k povrchu pevné matrice (angl. end-grafted). Matrice musí být předem aktivována polymerizovatelnou skupinou (vinyl nebo akryloyl). Tato technika se nazývá *grafting-to* (*g-to*). Takto je pouze omezené množství polymeru imobilizováno na matrici, protože již vzniklé polymerní fragmenty stericly brání kovalentnímu připojení dalších polymerních řetězců k matrici. Navíc zahlcení pórů velkými polymerními fragmenty může vést k nedokonalému a neúplnému pokrytí povrchu matrice.

Daleko lepší výsledky přinesla následně vyvinutá metoda *grafting-from* (*g-from*), jejíž princip spočívá v radikálovém polymerizačním procesu. Na aktivovaném povrchu silikagelu se středně velkými póry (200 Å) dochází k přímému vzniku polymeru. To umožňují iniciátory radikálové polymerizace, které jsou imobilizovány na silikagelu. V ideálním případě *g-from* proces na povrchu nejen začíná, ale je jím i omezován. Nedochozí tak ke vzniku polymerových fragmentů v roztoku. Ve skutečnosti ale mohou reaktivní částice z povrchu uniknout a dostat se do vnitřního objemu kolony. Polymerizace tak přestává být kontrolována povrchem. Nicméně, pokud růst polymeru od povrchu představuje dominantní proces, pak polymerní řetězce vzniklé v roztoku mohou být snadno odstraněny z hotového materiálu – pokud ovšem nedošlo k následnému připojení těchto řetězců (end grafting) k povrchu matrice v průběhu reakce. [8,32,33,34].

Chirální selektor je vázán na silikagelovou matrici kovalentní vazbou. Důsledkem pevného spojení chirálního selektoru a matrice je vysoká tepelná a chemická stabilita této

CSP. Pro dělení analytů se obvykle používají dva separační módy – normální a polárně-organický. Časté je využití halogenovaných rozpouštědel. V normálním módu se obvykle používají mobilní fáze složené z *n*-heptanu nebo *n*-hexanu a propan-2-olu nebo ethanolu. Z halogenovaných rozpouštědel se používá dichlormethan nebo methylen chlorid ve směsi s methanolem. V polárně-organickém módu se nejčastěji používají směsi acetonitrilu a methanolu. Často se do mobilní fáze přidávají další aditiva, která obvykle zkracují retenci a snižují asymetrii. Aditivy MF bývají kyseliny octová nebo trifluoroctová, v polárně-organickém módu se někdy používá octan amonný.

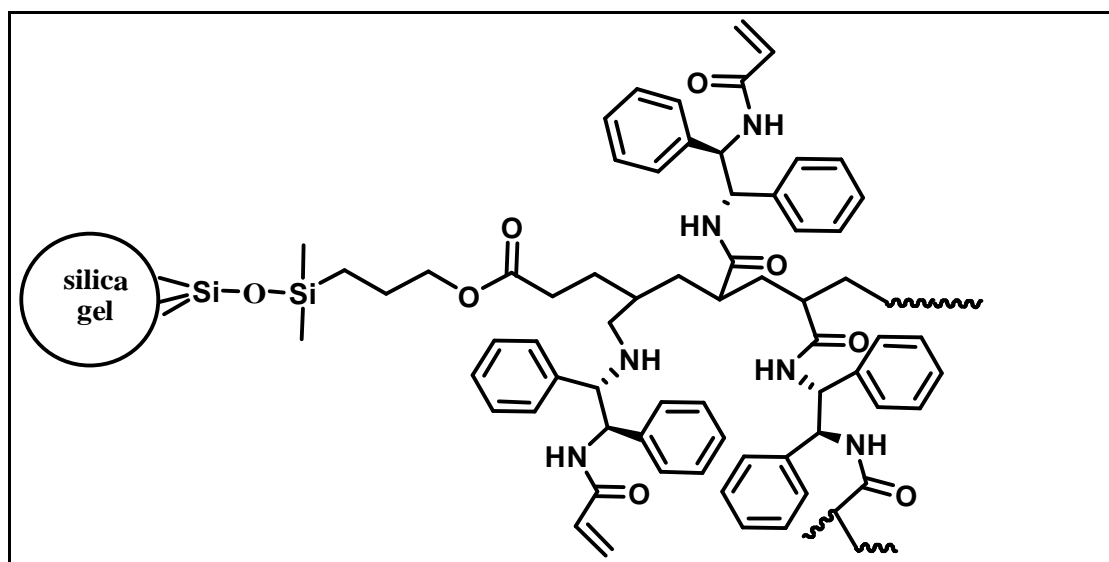
Chirální stacionární fáze P-CAP neobsahuje žádné aromatické skupiny, proto k chirálnímu rozlišení enantiomerů nepřispívají π - π interakce. V mechanismu chirálního rozlišení dominují především vodíkové vazby a dipolární interakce mezi analytem a mnoha amidovými skupinami, které obsahuje chirální selektor. Na této CSP mohou být tedy rozděleny analyty, které mají ve své struktuře hydroxylové, karboxylové, karbonylové, aminové, amidové, močovinné skupiny nebo fluor, tedy takové skupiny, které jsou schopny tvorby silných vodíkových vazeb. K enantioselektivě P-CAP přispívá nepolární cyklohexylová skupina této chirální stacionární fáze, která poskytuje hydrofobní interakce pro nepolární analyty a podílí se na stérických efektech [6].

2.4.4 P-CAP-DP

Saigo a kolektiv jako první připravili opticky aktivní polyamid z (-)-1,2-difenylethylendiaminu (DPEDA) a chloridů dvojsytných kyselin polykondenzací v roztoku za nízké teploty. Modifikovaný silikagel byl pak pokryt vzniklým polyamidem. Takto vzniklá CSP se osvědčila v enantioseparacích například Trögerových bází, benzoinu, amidu kyseliny mandlové nebo 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftylu [27,35]. V porovnání s jinými chirálními stacionárními fázemi však mají separace na této CSP pouze okrajový význam. Využití DPEDA jako složky chirálních stacionárních fází zmínil jak Gasparrini v patentu z roku 2003 [32], tak Lindner, Maier a Uray ve svých pracích [29,30]. Armstrong a kolektiv pak syntetizovali CSP na bázi *N,N'*-[(1*R*,2*R*)-1,2-difenyl-1,2-ethandiyl]bis-2-propenamidového monomeru [37]. Použili přitom metodu jednoduché radikálové polymerizace. Radikálový iniciátor byl rozpuštěn v celém objemu reakční směsi a přímo v roztoku došlo k vytvoření opticky aktivního polymeru. Ten byl následně připojen k povrchu modifikovaného silikagelu (reakce akrylových skupin). Nepřipojené polymerní řetězce, které zůstaly v roztoku, pak bylo

možné odstranit promytím kolony různými rozpouštědly [37]. CSP na bázi *trans*-1,2-difenylethyldiaminu je dnes komerčně dostupná pod názvem P-CAP-DP.

Každý monomer stacionární fáze P-CAP-DP (obr. 10) obsahuje dvě aromatické (fenylové) jednotky a konformace monomeru je flexibilní [4]. Na chirálním rozlišení analytů se podílejí π - π interakce – na rozdíl od chirální stacionární fáze P-CAP.



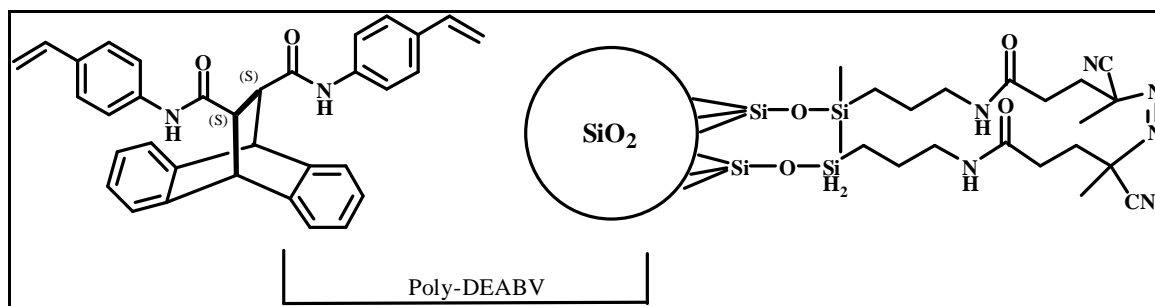
Obr. 10: Struktura chirální stacionární fáze (*R,R*)-P-CAP-DP.

P-CAP-DP CSP se používá, stejně jako P-CAP, především v normálním a polárně-organickém separačním módu, které jsou vzájemně komplementární. To znamená, že některé racemáty se separují pouze v normálním módu, některé pouze v polárně-organickém módu. Některé látky se separují v obou chromatografických módech, ovšem s rozdílnými hodnotami enantioselektivity a rozlišení. Rovněž ze srovnání P-CAP a P-CAP-DP CSP vyplývá, že některé analyty lze separovat pouze na jedné chirální stacionární fázi, některé analyty na obou CSP ovšem opět s rozdílnými hodnotami enantioselektivity a rozlišení. To znamená, že obě CSP jsou vzájemně komplementární. [4,37] P-CAP-DP lze, stejně jako P-CAP, použít v preparativním měřítku, protože i tato CSP má vysokou dávkovací kapacitu.

2.4.5 DEABV

DEABV je komerční název pro chirální stacionární fázi založenou na bis-4-vinylfenylamidovém monomeru *trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11*S*,12*S*)-11,12-dikarboxylové kyseliny. *Trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11*S*,12*S*)-11,12-dikarboxylová kyselina je hodně využívána v různých syntézách a jako stavební jednotka chirálních stacionárních fází [12,13,22]. Racemická *trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11*S*,12*S*)-11,12-dikarboxylová kyselina se získá z Diels-Alderovy reakce antracenu a kyseliny fumarové. Jednotlivé enantiomery se snadno získají rekrystalizací brucinových solí *trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11*S*,12*S*)-11,12-dikarboxylové kyseliny, kdy méně rozpustná sůl poskytuje (-)-(*S,S*)-enantiomer. Použití toxického a drahého brucinu (ve velkém měřítku) se dá vyhnout asymetrickou Diels-Alderovou reakcí, která poskytuje enantiomerně čisté formy této kyseliny [38]. Asymetrická Diels-Alderova reakce s použitím kyseliny fumarové poskytuje řadu opticky aktivních C_2 -symetrických dikarboxylových kyselin - významných stavebních kamenů pro syntézu enantiomerně čistých selektorů, které dále mohou sloužit v asymetrické syntéze jako katalyzátory nebo chirální stacionární fáze.

Chirální stacionární fáze DEABV (obr. 11) byla připravena radikálově iniciovanou polymerizací bis-4-vinylfenylamidového derivátu *trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11*S*,12*S*)-11,12-dikarboxylové kyseliny [4]. DEABV CSP obsahuje poměrně mnoho amidových vazeb a aromatických skupin. Proto vodíkové vazby, dipolární a π - π interakce hrají velkou roli v procesu chirálního rozpoznávání. Většina chirálních analytů úspěšně separovaných na této CSP obsahuje více než jednu skupinu schopnou tvorby vodíkových můstků – např. amidy, estery, karboxylové kyseliny a hydroxylové skupiny. DEABV CSP vykazuje lepší enantioselektivitu pro separaci látek obsahujících silné π -kyselé skupiny (*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-*L*-leucin nebo *N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-*L*-fenylglycin [6]) než P-CAP CSP. Navíc se na CSP DEABV podařilo proti P-CAP CSP rozdělit analyty schopné tvorby pouze jedné vodíkové vazby (*N*-benzyl-1-(1-naftyl)-ethylamin, bis[1-fenylethyl]-amin hydrochlorid). Z tohoto faktu vyplývá, že se na DEABV musí v chirálním rozpoznávání uplatňovat ještě další interakce, které nejsou na P-CAP možné [4,6].



Obr. 11: Struktura chirální stacionární fáze DEABV.

Pro dělení se využívá opět normální a polárně-organický separační mód. Normální mód, jak vyplývá z literatury, je vhodnější pro separace řady analytů resp. bylo v něm dosaženo většího počtu separací než v polárně-organickém módu. [6] Ovšem použití PO módu a eventuálně halogenovaných rozpouštědel v NP přináší jisté výhody – předně dochází k enantioseparacím látek, které se v NP předtím nedělily a úplná separace probíhá obvykle ve velmi krátkém čase - látky zpravidla eluují do deseti minut od nástřiku na kolonu. Z organických modifikátorů se používá propan-2-ol nebo EtOH. Druhý zmiňovaný je vhodnější, většina látek se v jeho přítomnosti separovala s vyšším rozlišením a vyšší účinností. Vyšší účinnost kolony je pravděpodobně způsobena nižší viskozitou EtOH proti propan-2-olu a s tím souvisejícím lepším přenosem hmoty mezi mobilní a stacionární fází. Často se do mobilní fáze přidává kyselina trifluoroctová, která má největší vliv na interakci kyselých látek, u nichž následně dochází ke snížení retence a ke zvýšení účinnosti separace, selektivity a rozlišení. Malé množství TFA v mobilní fázi může „pokrýt“ reziduální aminové skupiny stacionární fáze a tak předejít silným interakcím mezi kyselým analytem a bazickými místy stacionární fáze. DEABV CSP je komplementární k P-CAP a P-CAP-DP s tím, že některé látky se dělí pouze na jedné ze tří CSP a některé se separují na všech třech CSP, ovšem s jinými hodnotami rozlišení a enantioselektivity. [6]

Literatura

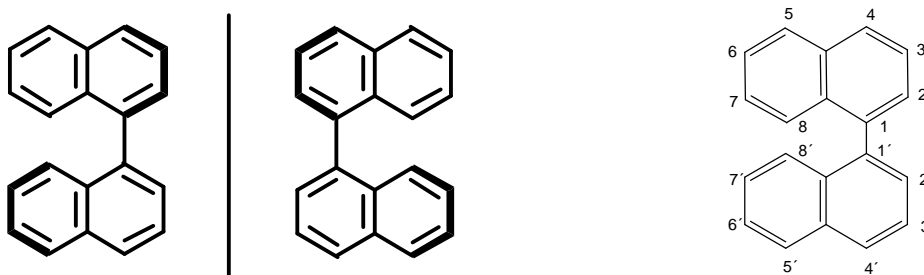
1. W. H. Pirkle, T. C. Pochapsky; *Chem. Rev.* 89 (1989) 347-362.
2. Y. Okamoto, K. Suzuki, K. Ohta, K. Hatada, H. Yuki; *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 4763-4765.
3. T. Nakano, Y. Okamoto, K. Hatada; *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 1318-1329.
4. X. Han, J. W. Remsburg, L. He, T. E. Beesley, D. W. Armstrong; *Chromatographia* 67 (2008) 199-210.
5. X. Han, Ch. Wang, L. He, T. E. Beesley, D. W. Armstrong; *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2681-2697.
6. Q. Zhong, X. Han, L. He, T. E. Beesley, W. S. Trahanovsky, D. W. Armstrong; *J. Chromatogr. A*, 1066 (2005) 55-70.
7. X. Han, A. Berthod, C. Wang, K. Huang, D. W. Armstrong; *Chromatographia* 65 (2007) 381-400.
8. G. Cancelliere, I. D'Acquarica, F. Gasparrini, M. Maggini, D. Misiti, C. Villani; *J. Sep. Sci* 29 (2006) 770-781.
9. T. Nakano; *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 205-225.
10. Y. Okamoto; *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 47 (2009) 1731-1739.
11. S. G. Allenmark, S. Andersson, P. Möller, D. Sanchez; *Chirality* 7 (1995) 248-256.
12. L. Thunberg, S. Allenmark, A. Friberg, F. Ek, T. Frejd; *Chirality* 16 (2004) 614-624.
13. L. Thunberg, S. Allenmark; *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 65-76.
14. Y. L. Bennani, S. Hanessian; *Chem. Rev.* 97 (1997) 3161-3195.
15. A. Brandi, S. Cicchi, F. Gasparrini, F. Maggio, C. Villani, M. Koprowski, K. M. Pietrusiewicz; *Tetrahedron-Assymetry* 6 (1995) 2017-2022.
16. C. Altomare, S. Cellamare, A. Carotti, M. L. Barreca, A. Chimirri, A. Monforte, F. Gasparrini, C. Villani, M. Cirilli, F. Mazza; *Chirality* 8 (1996) 556-566.
17. B. Galli, F. Gasparrini, D. Misiti, M. Pierini, C. Villani, M. Bronzetti; *Chirality* 4 (1992) 384-388.
18. F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani; *Chirality* 4 (1992) 447-458.
19. Z. Juvancz, K. E. Markides, P. Petersson, D. F. Johnson, J. S. Bradshaw, M. L. Lee; *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 119-126.
20. B. Gallinella, F. La Torre; *J. Chromatogr. A* 639 (1993) 193-196.
21. F. Gasparrini, D. Misiti, M. Pierini, C. Villani; *J. Chromatogr. A* 724 (1996) 79-90.
22. N. M. Maier, G. Uray; *J. Chromatogr. A* 740 (1996) 11-19.

23. J. K. Whitesell; Chem. Rev. 89 (1989) 1581-1590.
24. F. Gasparrini, D. Misiti, R. Rompietti, C. Villani; J. Chromatogr. A 1064 (2005) 25-38.
25. F. Gasparrini, L. D'Acquarica, C. Villani, C. Cimarelli, G. Palmieri; Biomed. Chromatogr. 11 (1997) 317-320.
26. A. Carotti, C. Altomare, S. Cellamare, A. Monforte, G. Bettoni, F. Loiodice, N. Tangari, V. Tortorella; J. Comput.-Aided Mol. Des. 9 (1995) 131-138.
27. F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani; J. Chromatogr. 457 (1988) 235-245.
28. F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani; J. Chromatogr. 539 (1991) 26-35.
29. G. Uray, N. M. Maier, W. Lindner; J. Chromatogr. A 666 (1994) 41-53.
30. N. M. Maier, G. Uray; J. Chromatogr. A 732 (1996) 215-230.
31. Chiral Application Guide, Regis Technologies, USA, 2007, 6. edice.
32. F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani; WO 2003079002 (2003). Patent
33. F. Gasparrini, D. Misiti, R. Pompietti, C. Villani; J. Chromatogr. A, 1064 (2005) 25-38.
34. F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani; Patent no. 2002RM0155.
35. S. Huang, Z. Bai, Ch. Yin, S. Li, Z. Pan; Chirality 19 (2007) 129-140.
36. K. Saigo, Y. Chen, N. Kubota, K. Tachibana, N. Yonezawa, M. Hasegawa; Chem. Lett. 15 (1986) 515-518.
37. X. Han, L. He, Q. Zhong, T. E. Beesley, D. W. Armstrong; Chromatographia 63 (2006) 13-23.
38. L. Thunberg, S. Allenmark; Tetrahedron-Asymmetry 14 (2003) 1317-1322.

2.5 Binaftylové deriváty

Asymetrická syntéza je jedno z důležitých odvětví organické chemie zabývající se přípravou chirálních látek v co nejvyšší optické čistotě. Přeměna achirálního nebo prochirálního reaktantu na chirální produkt probíhá pouze v chirálním prostředí [1]. Chirální činidlo (katalyzátor) má významný vliv na výsledek reakce. Jeho úloha spočívá ve vytvoření dvou diastereoisomerních přechodných stavů vedoucích k oběma enantiomerům produktu, z nichž pouze jeden je preferován [2].

Mezi významné katalyzátory asymetrických reakcí patří deriváty binaftyly, jejichž použití při řízení mnoha asymetrických procesů je velmi rozsáhlé. Binaftyly se vyznačují pozoruhodnými vlastnostmi chirálního rozpoznávání prameníci z jejich chiralitu, prostorového uspořádání a rigidní struktury. Většina molekul 1,1'-binaftyly (Obr. 12) je C_2 symetrická se dvěma identickými substitučními skupinami, které bývají často umístěny v polohách 2 a 2'. Chiralita derivátů 1,1'-binaftyly je dána stéricky bráněnou rotací atomů nebo skupin atomů kolem jednoduché vazby binaftylového skeletonu. Látky jsou axiálně chirální. Dvoučetná osa symetrie je kolmá na vazbu $C^1 - C^{1'}$ (spojnice naftylových kruhů). C_2 symetrie vede za určitých okolností k redukci vzájemně si konkurujících diastereoizomerních tranzitních stavů, což může zvýšit enantiosektivitu reakce [3,4,5,6].



Obr. 12: Enantiomery 1,1'-binaftyly.

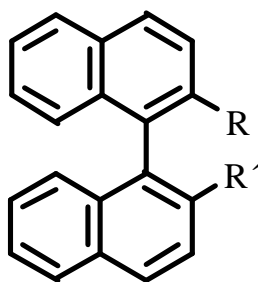
2.5.1 2,2'-disubstituované deriváty 1,1'-binaftyly

Binaftylových derivátů byla připravena celá řada s identickými i neidentickými substituenty umístěnými v nejrůznějších polohách binaftylové kostry. Důraz je přitom kladen

na vytvoření stabilních chirálních ligandů, které budou v asymetrické syntéze poskytovat enantiomery s vysokým stupněm čistoty [1,6]. Nejvýznamnějšími představiteli celé skupiny jsou deriváty 1,1'-binaftylu nesoucí identické substituenty v polohách 2 a 2' (Obr. 13). Tyto látky jsou známy více než sto let [10]. Počátky jejich využití v asymetrické syntéze spadají do sedmdesátých let minulého století a [1,10] dodnes si zachovaly vedoucí postavení v počtu aplikací.

Samotný nesubstituovaný 1,1'-binaftalen má racemizační bariéru $95 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, které odpovídá pomalá racemizace při laboratorní teplotě. Pokud zavedeme substituenty do poloh 8 a 8' (8,8'-dimethyl-1,1'-binaftyl), racemizační bariéra stoupne cca na $120 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Binaftyly nesoucí substituenty v polohách 2,2' mají výrazně vyšší konfigurační stabilitu a např. u 2,2'-dimethyl-1,1'-binaftylu nebyla pozorována racemizace ani při teplotě $240 \text{ }^\circ\text{C}$. Vysoká odolnost vůči atropisomerizaci umožňuje použití mnoha binaftylových derivátů i při vysokých teplotách. Vazebná interakce substituentů v polohách 2,2' může významně ovlivnit konfigurační stabilitu a následně velikost racemizační bariéry. Proto ne všechny 2,2'-disubstituované deriváty jsou vhodnými katalyzátory asymetrických reakcí [7,8].

Z významných zástupců 2,2'-disubstituovaných derivátů 1,1'-binaftylu můžeme jmenovat 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl (1,1'-bi-2,2'-naftol, OBIN, BINOL), 2,2'-diamino-1,1'-binaftyl (BINAM) a 2,2'-bis(difenylfosfino)-1,1'-binaftyl (BINAP).



Obr. 13: Struktura 2,2'-disubstituovaného-1,1'-binaftylu.

BINOL je zřejmě nejznámější binaftylový derivát. V roce 1973 jej von Richter poprvé připravil jako racemát [9]. Později byl připraven jako opticky čistá látka, jejíž absolutní konfigurace byla určena roku 1971 [10]. Hlavním krokem při přípravě OBINu je oxidativní kopulace 2-naftolu pomocí železitých (FeCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) [9,11] nebo manganatých [9,12] solí či komplexů měďnatých solí s aminy [9,13]. Racemický BINOL lze velmi snadno

rozdělit na atropisomery za použití (8*S*,9*R*)-(-)-*N*-benzylcinchonidinium chloridu. Je to jedna z nejjednodušších a nejučinnějších metod proveditelných v laboratoři [6]. Opticky aktivní BINOL slouží jako prekursor hydridového činidla BINAL-H, které se používá k asymetrickým redukčním prochirálních ketonů vedoucím ke vzniku opticky aktivních sekundárních alkoholů. Tato reakce se využívá i v průmyslu v několikakilogramovém měřítku při Coreyho syntéze prostaglandinů [14]. BINOL našel využití také při aldolové kondenzaci [15], Streckerově syntéze aminokyselin [16], Diels-Alderově reakci, hydrokyanaci a dalších asymetrických reakcích [9,17,18,19]. BINOL se také používá jako chirální komplexační činidlo, které je důležité pro rozdělení např. *tert*-butanthiosulfínátu [20]. BINOL velmi často slouží jako výchozí látka pro syntézy chirálních binaftylových sloučenin, protože hydroxylové skupiny v polohách 2 a 2' mohou být snadno zaměněny za jiné substituenty [6].

Dalším významným binaftylovým derivátem je 2,2'-bis(difenylfosfino)-1,1'-binaftyl. Poprvé ho připravili roku 1980 Noyori a Takaya [21]. BINAP lze připravit několika způsoby, například Cai vyvinul couplingovou reakci mezi ditriflátem (triflát – aniont kyseliny *p*-toluensulfonové nebo trifluormethansulfonové) BINOLu a difenylfosfinem katalyzovanou niklem [22], Laneman použil opticky aktivní ditriflát a chlordifenylfosfin [23] a Kumabayashi vyvinul metodu používající ditriflát a difenylfosfinoxid [24]. BINAP účinně indukuje asymetrii díky intra-komplexovým sterickým interakcím mezi objemným triarylfosfinovým systémem a reaktanty vázanými ke kovu. Komplexy Ru-BINAP prokázaly výbornou schopnost indukovat enantioselektivitu při hydrogenacích alkenů nebo α , β -nenasycených karboxylových kyselin [21,25].

Komplexy BINAP-Rh(I) nebo BINAP-Ru(II) dobře redukují *N*-acylaminoakrylové kyseliny a estery [21,26,27,28], BINAP-Rh(I) se používá v průmyslové výrobě (-)-mentholu [14,29] jako katalyzátor klíčové reakce celé syntézy – asymetrické izomerizace diethylgeranylaminu. Komplexy BINAPu s Rh(I), Ru(II) a Pd(0) se úspěšně uplatňují v homogenních asymetrických hydrogenacích prochirálních ketonů [21,30], alkenů nebo allylalkoholů, allylaminů a mnoha dalších reakcích [6,21,31].

2,2'-Diamino-1,1'-binaftyl se používá, stejně jako BINAP a BINOL, ke katalýze řady asymetrických reakcí. Jako příklady můžeme uvést aldolovou kondenzaci s použitím *L*-prolinu a BINAM-prolinamidu (vysoce regio-, diastereo- a enantioselektivní syntéza) [32]. Mnoho diarylových thioetherů a arylalkyl thioesterů bylo syntetizováno Ullmanovým couplingem z odpovídajících arylodidů a aromatických nebo alifatických thiolů v přítomnosti BINAM-Cu(II) komplexu [19,33,34]. Známe také Schiffovy báze odvozené od BINAMu [35] nebo se BINAM uplatňuje jako katalyzátor v Diels-Alderových reakcích [36].

BINOL, BINAP i BINAM jsou symetricky substituované binaftyly - mají stejné substituenty v polohách 2 a 2'. Z nesymetricky substituovaných zástupců binaftylových derivátů jmenujme 2-difenylfosfino-2'-methoxy-1,1'-binaftyl (MOP). Příslušné enantiomery se připravují čtyřstupňovou syntézou z enantiomerů BINOLu [37]. MOP tvoří nejčastěji komplex s Pd(0) a tento je velmi účinným katalyzátorem asymetrických hydrosilylací terminálních alkenů sloužících k přípravě chirálních sekundárních alkoholů [38]. Výzkum je dále zaměřen na přípravu nových ligandů a komplexů MOPu s kovy (především paladiem) a jejich další použití jako katalyzátorů v asymetrické syntéze [39,40,41]. Z dalších nesymetricky substituovaných 1,1'-binaftylů jsou významnými katalyzátory asymetrických procesů 2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaftyl (NOBIN) [42,43,44] a 2-amino-2'-difenylfosfino-1,1'-binaftyl (MAP) [45,46].

V poslední době byla připravena řada dalších 1,1'-binaftylů substituovaných různými funkčními skupinami [47,48,49,50,51,52,53,54] nebo byly hledány způsoby snadnější a efektivnější přípravy (již známých) binaftylů a jejich využití v dalších reakcích [55,56,57,58,59].

2.5.2 Ostatní binaftylové deriváty

Binaftylový skelet nemusí být substituován jen v polohách 2 a 2'. Vhodnými místy pro substituci mohou být i polohy 2,8', 8,8' [10,60,61,62] nebo polohy 3,3' binaftylové kostry [63]. 8,8'-disubstituovaných derivátů 1,1'-binaftylu byla připravena celá řada a v určitých případech byla prokázána jejich vysoká schopnost asymetrické indukce, která je vyvolána vysoce nesymetrickým mikroprostředím v blízkosti C-8 a C-8' [64]. Použití 8,8'-disubstituovaných 1,1'-binaftylů je omezené kvůli jejich nízké konfigurační stabilitě – v porovnání s 2,2'-disubstituovanými deriváty. Z měření racemizačních bariér vyplývá, že pro 8,8'-disubstituované 1,1'-binaftyly se substituenty majícími v blízkosti pozice 8 (8') uhlíkový atom v sp^2 -hybridizaci, klesá velikost racemizační bariéry na úroveň nesubstituovaného 1,1'-binaftylu ($100 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Naopak u substituentů v hybridizaci sp^3 dochází ke zvýšení racemizační bariéry cca o $25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Velikost racemizační bariéry 2,8'-disubstituovaných 1,1'-binaftylů je srovnatelná s hodnotami získanými pro 2,2'-disubstituované 1,1'-binaftyly (např. BINOL má racemizační bariéru $168 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). To umožňuje jejich použití v asymetrické katalýze při teplotách do $150 \text{ }^\circ\text{C}$ [60].

Kromě přípravy binaftylových derivátů s nestejnými substituenty nebo substituenty lokalizovanými v různých polohách se snaha organických chemiků zaměřila na posun klasické 1,1'-chirální osy do polohy 2,2' nebo 1,2'. Racemizační bariéra disubstituovaných 1,2'-binaftyľů je velmi podobná racemizační bariěře samotného 1,1'-binaftyľu nebo 8,8'-disubstituovaných 1,1'-binaftyľů se substituenty v hybridizaci sp^2 , a proto nejsou tyto deriváty příliš vhodné ke katalýze asymetrických procesů (jejich odolnost vůči interkonverzi je omezena především teplotou). [60]

Publikací zabývajících se binaftylovými deriváty je obrovské množství, většina je zaměřena na přípravu nových derivátů a jejich uplatnění v asymetrické syntéze. Enantioselektivní vysokoúčinná kapalinová chromatografie je v některých případech použita ke kontrole enantiomerní čistoty nebo výtěžku finálních produktů, ovšem popis separačního systému a podmínek separace bývají obvykle nedostačující. Většina separací probíhá na celulosových nebo amylosových chirálních stacionárních fázích (CSP). Například 2,2'-diacetyl-1,1'-binaftyľ byl separován jak na celulosové, tak na amylosové CSP, v mobilní fázi (MF) složené z 1 – 5 % propan-2-olu v *n*-hexanu [65,66,67]. *O,S*-1,1'-binaftyľ-2,2'-diylbis(dimethylkarbamothioát) byl úspěšně rozdělen na celulosové CSP v MF *n*-hexan/ethanol 90/10 (v/v), zatímco *O,O'*-1,1'-binaftyľ-2,2'-diylbis(dimethylkarbamothioát) byl separován ve stejné MF, ale na amylosové CSP [43]. 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyľ byl rozdělen v čistém methanolu na amylosové CSP [68], na celulosové CSP v MF složené z *n*-hexan/butanol 90/10 (v/v) [69], na CSP s navázaným tris(5-fluoro-2-methylfenylkarbamátem) celulosy [70,71] nebo na CSP na bázi cholové kyseliny v MF složené z propan-2-olu s přidavkem 0,1% TFA nebo 0,1% TEA ve směsi s *n*-heptanem [72]. Nedávno byla publikována studie zabývající se separací sedmi symetricky 2,2'-disubstituovaných 1,1'-binaftyľů, včetně BINOLu, jeho etherových, esterových a dibromo-substituovaných derivátů, na *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy. Měření byla prováděna v normálním separačním módu (NP) s mobilní fází tvořenou směsí *n*-hexanu a propan-2-olu [73]. Rozlišení BINOLu bylo v daném separačním systému ve srovnání s *tris*(5-fluoro-2-methylfenylkarbamátem) celulosy jako CSP výrazně horší, protože volná fenylová skupina na celulose *tris*(fenylkarbamátu) zřejmě brání v interakci analytu se stacionární fází, kdežto na fluorem modifikované CSP jsou umožněny simultánní vodíkové interakce mezi dvěma hydroxylovými skupinami BINOLu a CSP. BINOL a některé další binaftylové deriváty byly úspěšně separovány na nových zcela syntetických CSP – P-CAP, P-CAP-DP, DEABV a DPEBV [74].

Podrobněji nebyl enantiodiskriminační mechanismus binaftylových derivátů studován – v literatuře nebyly nalezeny informace o tomto tématu. Retenční a enantioseparační chování

sady deseti – osmi 2,2'-disubstituovaných- a 2,3,2'-trisubstituovaných-1,1'-binaftylů a dvou 8,3'-disubstituovaných-1,2'-binaftylů – derivátů binaftylu bylo studováno na šesti chirálních stacionárních fázích na bázi oligosacharidů a polysacharidů a na CSP na bázi zcela syntetických polymerů a na základě získaných výsledků byl navržen mechanismus enantioseparace a navržen vhodný separační systém (typ CSP, mobilní fáze) pro tyto látky.

Literatura

1. L. Meca; *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha, **2000**.
2. Š. Vyskočil; *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha, **1994**.
3. J. P. Mazaleyrat, D. J. Cram; *J. Am. Chem. Soc.* 103 (**1981**) 4585-4586.
4. J. K. Whitesell; *Chem. Rev.* 89 (**1989**) 1581-1590.
5. E. L. Eliel; *Stereochemie uhlíkatých sloučenin*, překlad z angličtiny, Academia, Praha, **1970**.
6. L. Pu; *Chem. Rev.* 98 (**1998**) 2405-2494.
7. M. Putala; *Chem. Listy* 95 (**2001**) 353-358.
8. L. Meca, D. Řeha, Z. Havlas; *J. Org. Chem.* 68 (**2003**) 5677-5680.
9. J. M. Brunel; *Chem. Rev.* 105 (**2005**) 857-897.
10. P. Kočovský, Š. Vyskočil, M. Smrčina; *Chem. Rev.*, 103 (**2003**) 3213-3245.
11. F. Toda, K. Tahala, S. Iwata, ; *J. Org. Chem.* 54 (**1989**) 3007-3009.
12. H. Yamamoto, H. Fukushima, Y. Okamoto, K. Hatada, M. Nakazaki; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*(**1984**) 1111-1112.
13. H. Yamamoto, H. Fukushima, M. Nakazaki; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (**1984**) 1490-1491.
14. R. Noyori; *Assymetric Catalysis in Organic Synthesis*, J. Wiley and Sons Ltd., New York, **1994**.
15. N. Yoshikawa, Y.M.A. Yamada, J. Das, H. Sasai, M. Shibasaki; *J. Am. Chem. Soc.* 121 (**1999**) 4168-4178.
16. H. Ishitani, S. Komiyama, Y. Hasegawa, S. Kobayashi; *J. Am. Chem. Soc.* 122 (**2000**) 762-766.
17. C. Rosini, L. Franzini, A. Raffaelli, P. Salvadori; *Synthesis* (**1992**) 503-517.
18. X. Y. Zhu, J. X. Jiang, J. Ren, Y. M. Yan, C. U. Pittman; *Curr. Org. Synth.* 2 (**2005**) 547-587.
19. S. G. Telfer, R. Kuroda; *Coord. Chem. Rev.* 242 (**2003**) 33-46.
20. J. Liao, X. Sun, X. Cui, K. Yu, J. Zhu, J. Deng; *Chem.-Eur. J.* 9 (**2003**) 2611-2615.
21. M. McCarthy, P. J. Guiry; *Tetrahedron* 57 (**2001**) 3809-3844.
22. D. Cai, J. F. Payack, D. R. Bender, D. L. Hughes, T. R. Verhoeven, P. J. Reider; *J. Org. Chem.* 59 (**1994**) 7180-7181.

23. D. J. Ager, M. B. East, A. Eisenstadt, S. A. Laneman; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1997) 2359-2360.
24. H. Kumobayashi, T. Miura, N. Sayo, T. Saito, X. Y. Zhang; *Synlett Sp. Iss. SI* (2001) 1055-1064.
25. T. Ohta, H. Takaya, M. Kitamura, K. Nagia, R. Noyori; *J. Org. Chem.* 52 (1987) 3174-3176.
26. A. Miyashita, A. Yasuda, H. Takaya, K. Toriumi, T. Ito, T. Souchi, R. Noyori; *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7932-7934.
27. A. Miyashita, H. Takaya, T. Souchi, R. Noyori; *Tetrahedron* 40 (1984) 1245-1253.
28. P.J. Guiry, M. McCarthy, P. M. Lacey, C. P. Saunders, S. Kelly, D. Y. Connolly; *Curr. Org. Chem.* 4 (2000) 821-836.
29. H. Shimidzu, I. Nagasaki, T. Saito; *Tetrahedron* 61 (2005) 5405-5432.
30. T. Ohkuma, H. Ooka, S. Hashiguchi, T. Ikariya, R., Noyori; *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 2675-2676.
31. T. Yamano, M. Yamashita, M. Adachi, M. Tanaka, K. Matsumoto, M. Kawada, O. Uchikawa, K. Fukatsu, S. Ohkawa; *Tetrahedron-Asymmetry* 17 (2006) 184-190.
32. G. Guillena, M. D. Hita, C. Najera; *Tetrahedron-Asymmetry* 17:7 (2006) 1027-1031.
33. D. J. C. Prasad, A. B. Naidu, G. Sekar; *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 1411-1415.
34. A. B. Naidu, G. Sekar; *Tetrahedron Lett.* 49 (2008) 3147-3151.
35. S. G. Telfer, T. Sato, T. Harada; *Inorg. Chem.* 43 (2004) 6168-6176.
36. A. Nishida, M. Yamanaka, M. Nakagawa; *Tetrahedron Lett.* 40 (1999) 1555-1558.
37. T. Hayashi; *Acta Chem. Scand.* 50 (1996) 259-266.
38. Y. Uozumi, T. Hayashi; *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 9887-9888.
39. B. Saha, T. V. RajanBabu; *J. Org. Chem.* 72:7 (2007) 2357-2363.
40. P. Dotta, P. G. A. Kumar, P. S. Pregosin, A. Albinati, S. Rizzato; *Organometallics* 23 (2004) 4247-4254.
41. T. Hayashi, M. Kawatsura, Y. Uozumi; *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 1681-1687.
42. K. Korber, W. J. Tang, X. Q. Hu, X. M. Zhang; *Tetrahedron Lett.* 43:40 (2002) 7163-7165.
43. M. Smrčina, Š. Vyskočil, J. Polívková, J. Poláková, J. Sejbál, V. Hanuš, M. Polášek, H. Verrier, P. Kočovský; *Tetrahedron-Asymmetry* 8 (1997) 537-546.
44. K. L. Ding, X. Li, B. M. Ji, H. C. Guo, M. Kitamura; *Curr. Org. Synth.* 2 (2005) 499-545.
45. Š. Vyskočil, M. Smrčina, P. Kočovský; *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 9289-9292.

46. Š. Vyskočil, M. Smrčina, V. Hanuš, M. Polášek, P. Kočovský; *J. Org. Chem.* 63 (1998) 7738-7748.
47. T. Hattori, A. Takeda, O. Yamabe, S. Miyano; *Tetrahedron* 58 (2002) 233-238.
48. T. Hattori, M. Shijo, J. Sakamoto, S. Kumagai, A. Nakajima, S. Miyano; *J. Chem. Res. M.* (1995) 124-134.
49. S. Yasuike, S. Okajima, K. Yamaguchi, H. Seki, J. Kurita; *Tetrahedron* 59 (2003) 4959-4966.
50. M. Solinas, R.E. Meadows, C. Wilson, A. J. Blake, S. Woodward; *Eur. J. Org. Chem.* 10 (2007) 1613-1623.
51. K. Tsubaki, D. T. T. Hai, V. K. Reddy, H. Ohnishi, K. Fuji, T. Kawabata; *Tetrahedron-Asymmetry* 18 (2007) 1017-1021.
52. M. Takasaki, Y. Motoyama, S. H. Yoon, I. Mochida, H. Nagashima; *J. Org. Chem.* 72 (2007) 10291-10293.
53. M. Widhalm, C. Aichinger, K. Mereiter; *Tetrahedron: Lett.* 50 (2009) 2425-2429.
54. K. Tanaka, G. Nishida, M. Ogino, M. Hirano, K. Noguchi; *Org. Lett.* 7 (2005) 3119-3121.
55. Y. L. Zhang, F. Zhang, W. J. Tang, Q. L. Wu, Q. H. Fan; *Synlett* 8 (2006) 1250-1254.
56. X. Li, X. Meng, H. Su, X. Wu, D. Xu; *Synlett* 6 (2008) 857-860.
57. F. J. Wang, Y.H. Zhang, G.Q. Yang, W.B. Zhang; *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 4179-4182.
58. X. S. Li, Q. C. Ding, J. F. Ge, J. W. Xie, D. C. Xu; *J. Org. Chem.* 74 (2009) 1785-1787.
59. S. S. Moleele, J. P. Michael, C. B. de Konig; *Tetrahedron* 64 (2008) 10573-10580.
60. Š. Vyskočil, L. Meca, I. Tišlerová, I. Císařová, M. Polášek, S. R. Harutyunyan., Y. N. Helikon, R. M. J. Stead, L. Farrugia, S. C. Lockhart, W. L. Mitchell, P. Kočovský; *Chem. Eur. J.* 8 (2002) 4633-4648.
61. S. V. Kolotuchin, A. I. Meyers; *J. Org. Chem.* 64 (1999) 7921-7928.
62. K. Tsubaki, D. T. T. Hai, V. K. Reddy, H. Ohnishi, K. Fuji, T. Kawabata; *Tetrahedron-Asymmetry* 18 (2007) 1017-1021.
63. M. Smrčina, Š. Vyskočil, B. Máca, M. Polášek, T. A. Claxton, A. P. Abbott, P. Kočovský; *J. Org. Chem.* 59 (1994) 2156-2163.
64. K. Fuji, X-S. Yang, H. Ohnishi, X-J. Hao, Y. Obata, K. Tanaka; *Tetrahedron-Asymmetry* 10 (1999) 3243-3248.
65. J. Huang, H. Chen, P. Zhang, T. Li; *Anal. Chem.* 77 (2005) 3301-3308.

66. J. Huang, H. Chen, P. Zhang, T. Li; *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 307-311.
67. J. Huang, H. Chen, P. Zhang, T. Li; *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 109-115.
68. K. Tachibana, A. Ohnishi; *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 127-154.
69. C. P. Li, H. L. Yang, J. H. Li, W. G. Shan; *Chinese J. Anal. Chem.* 34 (2006) 1133-1136.
70. Y. Okamoto, E. Yashima; *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 1020-1043.
71. E. Yashima, C. Yamamoto, Y. Okamoto; *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 4036-4048.
72. L. Vaton-Chanvrier, H. Oulyadi, Y. Combret, G. Coquerel, J. C. Combret; *Chirality* 13 (2001) 668-674.
73. W. Weng, F. Zhan, J. Fu, T. Li, X. Chen, X. Huang; *Chromatographia* 67 (2008) 119-123.
74. X. Han, A. Berthod, C. Wang, K. Huang, D. W. Armstrong; *Chromatographia* 65 (2007) 381-400.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- Methanol; čistota pro HPLC; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Acetonitril; čistota pro HPLC; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Propan-2-ol; čistota pro HPLC; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Ethanol; čistý bezvodý, max. 5 obj. % etheru; Acros Organics (New Jersey, USA)
- *n*-hexan; čistota pro HPLC; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- *n*-heptan; čistota pro HPLC; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Kyselina octová; p.a.; Lach-ner (Neratovice, ČR)
- Kyselina trifluoroctová; čistota 98,0 %; Fluka Chemie (Buchs, Německo)
- Triethylamin; čistota > 99,5 %; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Kyselina fosforečná; p.a.; Lach-ner (Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný; p.a.; Lach-ner (Neratovice, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát; čistota 99,0 %; Penta (Chrudim, ČR)
- Deionizovaná voda; Milli-Q water, čistící system Millipore (Milford, MA, USA)

Binaftylové deriváty (obr. 14, systematické názvy viz tab. 3) studované v této disertační práci byly syntetizovány jako racemáty na Katedře organické a jaderné chemie, PřF UK a jejich struktura byla potvrzena ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS, HRMS a spektrofotometricky v UV oblasti.

Syntéza analytu **1** je popsána v literatuře [1,2]. Methylestery analytů **2** a **7** byly syntetizovány podle [3] a jejich transformace na analyty **2** a **7** je popsána v citaci [4]. Syntéza analytů **3**, **4**, **5**, **6** a **8** byla popsána v publikaci [5] (v případě analytu **3** byl jako prekursor reakce použit racemický 2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaftyl [6]). Syntéza analytů **9** a **10** je popsána v [7].

3.2 Přístroje a pomůcky

Měření probíhala na kapalinovém chromatografu skládajícím se z vysokotlaké pumpy model PU 4015, UV detektoru PU 4020 (obojí Pye Unicam, Cambridge, UK) a šesticestného dávkovacího ventilu Rheodyne 7725i (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 10 μ l. Vzorokly byly dávkovány na kolonu stříkačkou Hamilton (Reno, Nevada, USA) o celkovém objemu 15 μ l. Sběr a zpracování dat zajišťoval software Clarity (Data Apex, Praha, Česká republika).

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC30H (Elma, Singen, Německo) sloužila k odplynění mobilní fáze. pH pufrů bylo upravováno na pH-metru firmy Jenway model 3510 (Felsted, Anglie).

Separáční chování binaftylových derivátů bylo testováno na těchto chirálních stacionárních fázích:

1. 250 \times 4,6 mm I.D., kovová kolona Cyclobond I 2000 naplněná β -cyklodextrinem navázaným na silikagel, velikost částic 5 μ m (ASTECC, Whippany, NY, USA)
2. 250 \times 4,6 mm I.D., kovová kolona Cyclobond I 2000 RSP naplněná hydroxypropylether- β -cyklodextrinem navázaným na silikagel, velikost částic 5 μ m (ASTECC, Whippany, NY, USA)
3. 125 \times 4 mm, kovová kolona LiChrospher 100 RP-8, oktyl (C-8) navázaný na silikagel, velikost částic 5 μ m (MERCK, Darmstadt, Německo)
4. 250 \times 4 mm, kovová kolona Spherisorb ODS-2, naplněná oktadecylem (C-18) navázaným na silikagel, velikost částic 5 μ m (MERCK, Darmstadt, Německo)
5. 150 \times 4,6 mm I.D., kovová kolona Chiralcel OD-H, určená k separacím v normálním módu, naplněná silikagelem pokrytým (coated) *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátem) celulosy, velikost částic 5 μ m (Chiral Technologies Europe, Illkirch, France)
6. 150 \times 4,6 mm I.D., kovová kolona Chiralcel OD-RH, navržená pro reverzní separáční mód, naplněná silikagelem pokrytým (coated) *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátem) celulosy, velikost částic 5 μ m (Chiral Technologies Europe, Illkirch, France)
7. 250 \times 4,6 mm I.D., kovová kolona P-CAP, naplněná poly(*trans*-1,2-diaminocyklohexandiyl-bisakrylamidem) navázaným na silikagelu (Laboratoř D. W. Armstronga, The University of Texas at Arlington, Texas, USA)

8. 250 × 4,6 mm I.D., kovová kolona P-CAP-DP, naplněná *N,N'*-[(1*R*,2*R*)-1,2-difenyl-1,2-ethandiyl]bis-2-propenamidovým polymerem navázaným na silikagel (Laboratoř D. W. Armstronga, The University of Texas at Arlington, Texas, USA)
9. 250 × 4,6 mm I.D., kovová kolona DEABV, naplněná polymerem na bázi bis-4-vinylfenylamidového monomeru *trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(11*S*,12*S*)-11,12-dikarboxylové kyseliny navázaného na silikagel (Laboratoř D. W. Armstronga, The University of Texas at Arlington, Texas, USA)

3.3 Příprava vzorků, mobilní fáze a podmínky měření

Roztoky analytů byly připraveny rozpuštěním 1,0 mg pevné látky (racemátu) v 1 ml MeOH (2,2'-disubstituované 1,1'-binaftyly) nebo v 1 ml ACN (8, 3'-disubstituované 1,2'-binaftyly). Roztoky byly skladovány v temnu při teplotě 5 °C.

Příprava pufrů: 0,5 % triethylaminoctanový pufr byl připraven zředěním 5 ml TEA na celkový objem 1 l. pH pufru bylo upraveno octovou kyselinou na požadovanou hodnotu vždy před přidáním organického modifikátoru.

20 mM fosfátový pufr byl připraven navážením a následným rozpuštěním 3,12 g NaH₂PO₄·2H₂O v 1 l deionizované vody. pH pufru bylo upraveno na požadovanou hodnotu buď přidávkem kyseliny fosforečné (pH 3,0) nebo 0,1 M roztokem hydroxidu sodného (pH 6,0) vždy před použitím resp. před přidáním organického modifikátoru.

Složení MF: Na cyklodextrinových CSP (Cyclobond I 2000 a Cyclobond I 2000 RSP) byly testovány normální a reverzní separační mód. Mobilní fáze normálního módu byla složena ze směsi *n*-hexanu a propan-2-olu; objem *n*-hexanu se pohyboval v rozmezí 50 – 95 obj. %. V reverzním módu MF obsahovaly acetonitril nebo methanol ve směsi s vodou nebo 0,5% vodným roztokem triethylaminoctanového pufru o pH 3,0 nebo 6,0.

NP na celulosových fázích byl tvořen směsí *n*-hexanu a propan-2-olu; obsah IPA se pohyboval od 5 do 80 obj.%. Reverzní mód byl složen z binárních směsí acetonitrilu a vody nebo 20 mM roztoku fosfátového pufru, pH 3,0 nebo 6,0. Objem ACN se pohyboval v rozmezí 40 – 60 obj. % při obou hodnotách pH.

CSP na bázi syntetických polymerů byly zkušeny v normálním a polárně-organickém separačním módu. Heptan nebo *n*-hexan a ethanol nebo propan-2-ol byly základními složkami mobilních fází. Octová a trifluoroctová kyselina (obvykle 0,1 obj.%) se přidávala do MF pro

zlepšení symetrie píků. Složení MF bylo měněno (objemový poměr). Polárně-organický mód se skládal ze směsi acetonitrilu a methanolu nebo propan-2-olu. Často se do MF přidávala malá množství octové a trifluoroctové kyseliny nebo triethylaminu. Současný přídavek TEA i HAc do MF byl také otestován.

Pokud není uvedeno jinak, byla průtoková rychlost mobilní fáze nastavena na 0,7 ml/min a analyty byly detekovány při vlnové délce $\lambda = 254$ nm. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě 22 ± 2 °C s výjimkou teplotní studie, při které se teplota pohybovala v rozmezí 5 – 40 °C. Pro určení mrtvého času byla použita čistá rozpouštědla – MeOH a ACN, EtOH.

Literatura

1. K. L. Chandra, P. Saravanan, R. K. Singh, V. K. Singh; *Tetrahedron* 58 (2002) 1369-1374.
2. R. Ballini, G. Bosica, S. Carloni, L. Ciaralli, R. Maggi, G. Sartori; *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 6049-6052.
3. P. Kočovský, Š. Vyskočil, M. Smrčina; *Chem. Rev.* 103 (2003) 3213-3245.
4. Š Vyskočil; Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 1994.
5. M. Smrčina, Š. Vyskočil, J. Polívková, J. Poláková, J. Sejbal, V. Hanuš, M. Polášek, H. Verier, P. Kočovský; *Tetrahedron-Asymmetry* 8 (1997) 537-546.
6. M. Smrčina, M. Lorenc, V. Hanuš, P. Kočovský; *Synlett* 4 (1991) 231-232.
7. Š. Vyskočil, L. Meca, I. Tišlerová, I. Císařová, M. Polášek, S. R. Harutyunyan, Y. N. Belokon, R. M. J. Stead, L. Farrugia, S. C. Lockhart, W. L. Mitchell, P. Kočovský; *Chem.-Eur. J.* 8 (2002) 4633-4648.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

V této části disertační práci jsou diskutovány tyto publikace:

^I L. Loukotková, Z. Bosáková, E. Tesařová: *Study of the Influence of Experimental Conditions on the Retention and Enantioseparation of Series of Newly Synthesized Disubstituted Binaphthyls*. Book of Proceedings, 3rd International Student Conference, 2007, str. 28-39. (ISBN 80-86238-96-2)

^{II} L. Loukotková, M. Rambousková, Z. Bosáková, E. Tesařová: *Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) Based Chiral Stationary Phase as Effective Tools for Enantioselective HPLC Separation of Structurally Different Disubstituted Binaphthyls*. *Chirality* 20 (2008) 900 – 909.

^{III} L. Loukotková, E. Tesařová, Z. Bosáková, D. W. Armstrong: *Comparison of enantioseparation of substituted binaphthyls on cyclodextrin-, cellulose- and synthetic polymer-based chiral stationary phases*. *J. Sep. Sci.* Článek odeslán do tisku

4.1 Chirální selektory na bázi β -cyklodextrinu^I

4.1.1 Cyklodextrinové chirální stacionární fáze

Retenční a enantioseparační chování sady binaftylových derivátů (obr. 14) bylo sledováno jak v normálním, tak v reverzním separačním systému na β -cyklodextrinové (β -CD) a hydroxypropyl- β -cyklodextrinové (HP- β -CD) CSP. Jako první byl testován normální mód (NP) s binární mobilní fází (MF) *n*-hexan/propan-2-ol. Objem *n*-hexanu se pohyboval v rozmezí 50 – 90 obj. %. Retence analytů byla při nižším obsahu nepolární složky velice krátká (eluce analytů s mrtvým časem), ale s rostoucím podílem *n*-hexanu v MF rostla. V MF s 90 % obsahem *n*-hexanu přestaly některé látky eluovat z kolony, zatímco některé (8,3'-disubstituované binaftyly) i nadále eluovaly s mrtvým časem. Vyšší retence a lepší symetrie píků pro většinu analytů byla pozorována na koloně HP- β -CD. I přes to, že kolona HP- β -CD byla z hlediska retence a symetrie vhodnější než β -CD, nebyl ani na jedné z chirálních stacionárních fází testovaných v systémech NP pozorován náznak enantioseparace některého z analytů. Vzhledem k rozdílné retenci jednotlivých derivátů by se dal NP velmi dobře využít pro achirální separace komponent reakční směsi.

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. Acetonitril, jehož obsah se pohyboval v rozsahu 50 – 5 obj. %, se jako OM neosvědčil, protože analyty eluovaly nezávisle na jeho množství v MF s mrtvým časem a byl tedy nahrazen methanolem, jehož obsah se pohyboval v rozmezí 90 – 10 obj. %. Retence analytů stoupala s klesajícím množstvím MeOH v MF. Vhodný obsah MeOH se pohyboval pro obě kolony v rozmezí 45 – 20 % (obj.). V MF s více než 45 % MeOH eluovaly analyty s mrtvým časem a při obsahu nižším než 20 % MeOH byla retence látek příliš vysoká.

Zástupci skupiny 2,2'-disubstituovaných a 3,2,2'-trisubstituovaných 1,1'-binaftylových derivátů eluovaly ve výše zmíněných MF (45 – 20 obj. %) na obou cyklodextrinových kolonách v rozmezí 15 – 60 minut od nástřiku na kolonu. Retence analytů byla obecně vyšší na derivatizovaném CD. Výjimku tvořil analyt **2**, jehož retence se na HP- β -CD CSP snížila oproti β -CD na polovinu. Příčinou je s největší pravděpodobností vzájemné sterické uspořádání HP- β -CD a tohoto derivátu, které neumožňuje dostatečnou inkluzi analytu do cyklodextrinové kavity. Nejvhodnější složení MF z hlediska retence bylo tedy 20/80 MeOH/voda (v/v) pro β -CD CSP a 30/70 MeOH/voda (v/v) pro HP- β -CD CSP. Ze skupiny 1,1'-binaftyků byla pozorována částečná enantioseparace pouze u analytu **1**, který se separoval s rozlišením $R = 0,7$ na HP- β -CD CSP v MF MeOH/voda 30/70 (v/v) – viz tab. 4.

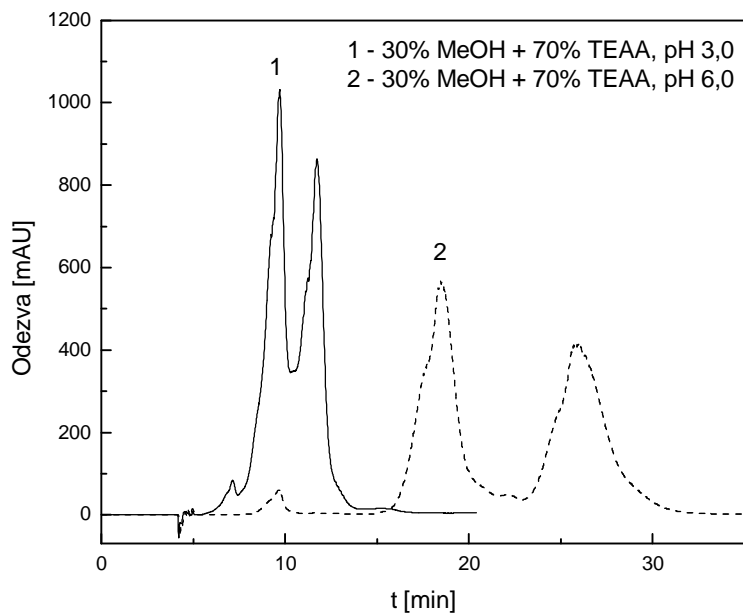
V případě 8,3'-disubstituovaných 1,2'-binaftyků došlo alespoň k částečné enantioseparaci obou derivátů jak na β -CD, tak na HP- β -CD, přičemž se oba deriváty v korespondujících mobilních fázích lépe separovaly na koloně HP- β -CD. Obecně vyšší hodnoty chirálního rozlišení v kratší době vykazoval derivát **10**.

Nahrazení vody 0,5% vodným roztokem TEAA pufru, pH 3,0 nebo 6,0, vedlo na β -CD CSP k poklesu retence zejména při nižší hodnotě pH pufru, což lze přičíst účinnějšímu omezení silanofilních interakcí analytu se silikagelovým nosičem β -CD. Záměna vody za pufr však nevedla ke zlepšení symetrie píků, ani k enantiomerní separaci dalších analytů.

Tab. 4: Separační parametry těch analytů, které se alespoň částečně separovaly na cyklodextrinových CSP. Symboly v tabulce znamenají: k_I – retenční faktor dříve eluujícího atropisomeru, R – rozlišení mezi píky jednotlivých atropisomerů, α - enantioselektivita.

analyt	β -cyklodextrin						HP- β -cyklodextrin		
	MeOH/voda 20/80 (v/v)			MeOH/voda 30/70 (v/v)			MeOH/voda 30/70 (v/v)		
	k_I	R	α	k_I	R	α	k_I	R	α
1	2,94	0,52	1,16	0,84	0,22	1,08	2,82	0,76	1,20
2							3,00	0,96	1,39
4							10,79	0,21	1,08
8							3,97	0,77	1,36
9	2,51	0,51	1,33	1,10	0,91	1,10	4,10	1,08	1,37
10	2,13	2,24	1,32	1,11	0,43	1,21	3,30	1,93	1,56

Změna složení MF, tedy náhrada vody pufrům, nevedla ani na CSP s derivatizovaným cyklodextrinem k enantioseparaci dalších analytů vyjma analytu **1**, jenž byl částečně separován již v MF MeOH/voda (tab. 4). Rozlišení analytu **1** se v MF obsahující vodný roztok pufru o pH 6,0 mírně zvýšilo ($R = 0,94$), ale bylo doprovázeno snížením symetrie píků. Analyt **9** dosahoval vyšší hodnoty enantiorozlišení ($R = 1,52$) v pufované MF o nižší hodnotě pH (MeOH/TEAA, pH 3,0, 30/70 (v/v)). V pufru o pH 6,0 došlo k výraznému zhoršení symetrie píků, což mělo rozhodující vliv na celou separaci. Analyt **10** eluoval s nejvyšším rozlišením ($R = 1,87$) v MF MeOH/TEAA, pH 6,0, 30/70 (v/v). V pufru o nižší hodnotě pH se retence analytu zkrátila o třetinu, což vedlo i ke snížení hodnoty rozlišení ($R = 1,1$) – obr. 15.



Obr. 15: Vliv pH vodné složky mobilní fáze na separaci analytu **10** na HP- β -CD chirální stacionární fázi. Experimentální podmínky: kolona Cyclobond I 2000 RSP, mobilní fáze MeOH/TEAA, pH 3,0 a 6,0, 30/70 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

4.1.2 Přídavek chirálního selektoru do mobilní fáze

Chirální selektor nemusí být vázán pouze ve formě stacionární fáze, ale může být také přidán do mobilní fáze. V tom případě lze použít achirální stacionární fázi. Přítomnost volného chirálního selektoru (nevázaného na silikagel) může v některých případech poskytovat lepší steric dostupnost zejména pro rozměrné analyty. Nejprve byla změněna retence analytů v MF MeOH/0,5% TEAA, pH 4,0, 50/50 (v/v) na dvou testovaných reverzních achirálních kolonách s navázaným C-8 (LiChrospher 100 RP-8) a C-18 (Spherisorb ODS-2) řetězcem. Retence všech analytů byla výrazně delší na C-18 stacionární fázi, což koreluje s nepolárním charakterem analytů. Navíc byla C-18 kolona o 10 cm delší než kolona C-8. Pro studium separačního chování binaftylových derivátů na achirální stacionární fázi s přídavkem chirálního selektoru do MF byla vybrána kolona s navázaným C-8 řetězcem.

Byla testována MF MeOH/0,5% TEAA, pH 4,0, 50/50 (v/v) s přídavkem 5 mM hydroxypropyl- β -cyklodextrinu. V tomto separačním systému nedošlo k enantioseparaci žádného z analytů. Po zvýšení koncentrace chirálního aditiva na hodnotu 12,5 mM bylo

pozorováno zkrácení retence všech analytů (z $k \sim 60$ na $k \sim 40$) a 8,3'-disubstituované 1,2'-binaftyly se začaly částečně enantioseparovat. Analyty však stále eluovaly s dlouhými retenčními časy ($t_R \sim 50$ min). Symetrie píků jednotlivých enantiomerů byla velmi nízká. Použití vyšší koncentrace HP- β -CD v MF nebylo kvůli nízké rozpustnosti HP- β -CD možné. Výsledky jednoznačně ukázaly, že přídavek chirálního selektoru do mobilní fáze není pro separaci binaftylových derivátů vhodný.

Závěr

V normálním módu nebyla pozorována enantioseparace žádného z analytů ani na jedné z testovaných CD CSP. V reverzním separačním módu došlo na β -CD CSP k separaci tří analytů, na HP- β -CD CSP byla pozorována enantioseparace šesti látek. Analyt **10** se jako jediný separoval na obou CSP na základní linii, zatímco enantioseparace ostatních analytů byla vždy pouze částečná. Přídavek chirálního selektoru - HP- β -CD - do mobilní fáze vedl k částečné enantioseparaci 8,3'-disubstituovaných 1,2'-binaftyly. Analyty ovšem eluovaly s dlouhými retenčními časy a se špatnou symetrií píků. β -Cykloextrin nebo hydroxypropylether- β -cykloextrin jako chirální selektor, ať volný nebo vázaný na nosič se pro enantioseparaci binaftylových derivátů příliš neosvědčily.

4.2 Chirální stacionární fáze založená na *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy^{II}

Vzhledem k tomu, že cykloextrinové CSP nepřinesly příliš pozitivní výsledky a došlo na nich k enantioseparaci malého počtu studovaných derivátů, byly jako druhé vyzkoušeny polysacharidové CSP. Celulosové CSP vykazují dobré enantioselektivní vlastnosti pro celou řadu analytů [1,2,3,4,5] Mezi celulosovými CSP vyniká vysokou schopností chirálního rozpoznávání CSP založená na *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy, a proto byla tato CSP vybrána ke studiu enantioseparačního chování sady binaftylových derivátů, již proměřované na cykloextrinových CSP, v normálním a reverzním separačním módu. Kolony na bázi *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy jsou komerčně dostupné ve dvou variantách – pro normální separační mód pod názvem Chiralcel OD-H a pro reverzní separační mód pod názvem Chiralcel OD-RH (obě prodává firma Chiral Technologies Europe, Illkirch, France).

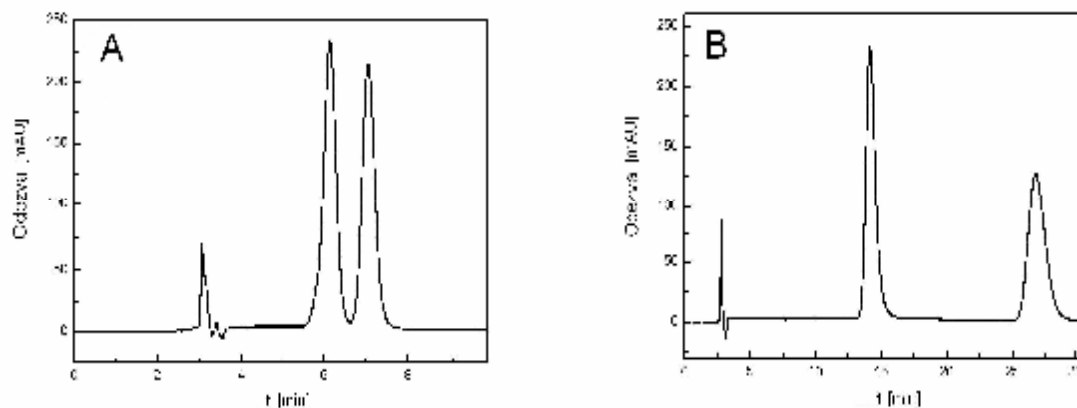
4.2.1 Normální separační mód

Stejně jako v případě cyklodextrinových CSP byl jako první testován normální separační mód. Mobilní fáze byly tvořeny směsí *n*-hexanu (HEX) a propan-2-olu (IPA) 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 s výjimkou analytů **2** a **7**. Tyto látky neeluovaly z kolony v žádné z testovaných mobilních fází. Z deseti látek byla pozorována enantioseparace u čtyř analytů (tab. 5). Z této tabulky je zřejmé, že nejvyšších hodnot separačních parametrů bylo dosaženo v MF s nejvyšším proměřovaným obsahem *n*-hexanu. Enantioseparace analytů **1** a **4** probíhala ve velmi krátkém čase s dobrým rozlišením (tab. 5). Naproti tomu retenční časy disubstituovaných 1,2'-binaftylových derivátů (**9** a **10**) byly proti 1,1'-binaftylyům delší a byly doprovázeny jak výrazně větším rozlišením píků jednotlivých enantiomerů, tak vyšší enantioselektivitou. Změny ve složení MF ve sledovaném rozsahu pouze lehce ovlivnily enantioseparační chování 1,2'-binaftylových derivátů, měly však podstatný vliv na retenci, tj. dobu analýzy. Rostoucí retence s klesajícím obsahem IPA v MF měla pro všechny studované deriváty stereodiskriminační charakter. Pro ilustraci je na obr. 16 uveden průběh enantioseparace derivátu **4** a **9** v mobilní fázi *n*-hexan/propan-2-ol 80/20 (v/v).

Tab 5: Vliv obsahu propan-2-olu v MF *n*-hexan/propan-2-ol na chromatografická data těchto analytů, u kterých byla pozorována separace na atropisomery na CSP Chiralcel OD-H. Symboly použité v tabulce – viz tab. 4.

analyt	<i>n</i> -hexan/propan-2-ol (v/v)											
	95/5			90/10			80/20			70/30		
	<i>k_I</i>	<i>R</i>	α	<i>k_I</i>	<i>R</i>	α	<i>k_I</i>	<i>R</i>	α	<i>K_I</i>	<i>R</i>	α
1	0,58	1,23	1,28	0,55	0,91	1,20	0,53	0,81	1,15	0,50	0,74	1,13
4	1,24	1,90	1,35	1,05	1,87	1,33	1,00	1,64	1,30	0,92	1,38	1,24
9	13,43	4,92	1,59	6,46	4,62	1,46	4,24	4,60	1,43	3,88	4,55	1,40
10	7,48	4,98	1,77	3,95	4,80	1,69	2,20	4,73	1,65	1,58	4,70	1,64



Obr. 16: 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.

4.2.2 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. Naměřená data jsou sumarizována v tab. 6 a vyplývá z nich, že v MF ACN/voda docházelo u všech analytů s klesajícím podílem ACN k nárůstu retence.

Analyty **4**, **5** a **6** měly již v MF obsahující 50 obj. % ACN velice dlouhé retenční časy, takže v mobilní fázi se 40 obj. % ACN již neeluovaly do 120 min. Také u derivátů **1**, **8** a **9** došlo s dalším snižováním obsahu ACN v MF ke značnému nárůstu retence. Delší retence byla u většiny analytů spojena jak s vyšší enantioselektivitou, tak s vyšším rozlišením. Enantioseparace nebyla v mobilních fázích ACN/voda pozorována u analytů **2**, **5**, **6** a **8**. 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. Rozlišení nadále stoupalo s klesajícím podílem ACN v MF. Značnou citlivost vůči poměru ACN/voda vykazoval analyt **7**, nesoucí ve své struktuře skupiny schopné poskytovat i akceptovat vodíkovou vazbu (-COOH, -NH₂ a -OH).

S ohledem na předchozí výsledky byl vliv pufrované složky mobilní fáze na retenci a enantioseparaci sledován v MF ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0 nebo 6,0, s nižším obsahem ACN (60 – 40 obj. %). Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. Retenční

chování analytů vykazovalo obdobné trendy jako v případě mobilních fází ACN/H₂O, tj. nižší obsah ACN vedl k silnějšímu zadržování látek na koloně doprovázenému pro většinu analytů vyššími hodnotami chirálního rozlišení.

Při porovnání výsledků získaných v korespondujících MF bez přítomnosti pufru a s přítomností pufru o dvou různých hodnotách pH (tab. 6 vs. 7) vyplývá, že největší rozdíly v retenci a rozlišení jsou patrné v MF s nejnižším obsahem ACN (40%) a při nižší hodnotě pH pufru. Nejvýrazněji je to vidět u analytů **1**, **2** a **7**. U analytu **1** došlo proti ostatním MF (ACN/voda a ACN/pufř, pH 6,0) ke zkrácení retence téměř na polovinu a k nárůstu hodnoty rozlišení. Analyty **2** a **7** ve své struktuře obsahují funkční skupiny schopné tvorby stereoselektivních vodíkových vazeb. S rostoucí silou interakce mezi *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátem) celulosy a analytem stoupá retence, která je doprovázena vyšším rozlišením a vyšší enantioselektivitou. Srovnání separačního chování analytů **2** a **7** ukazuje, že objemný aromatický substituent amino skupiny (R₃) nacházející se v blízkosti hydroxylové skupiny (R₂) analytu **2** snižuje možnosti stereoselektivní vodíkové vazby nebo dokonce brání jejímu vytvoření. Látka **2** dosahuje proto sice vyšší retence, ale výrazně nižšího rozlišení než analyt **7** (tab. 7).

Tab. 6: Vliv obsahu acetonitrilu na chromatografická data binaftylových derivátů na koloně Chiralcel OD-RH CSP. Symboly použité v tabulce – viz tab. 4.

analyt	ACN/voda (v/v)																	
	80/20			70/30			60/40			50/50			40/60			30/70		
	k_1	R	α	k_1	R	α	k_1	R	α	k_1	R	α	k_1	R	α	k_1	R	α
1	1,00	0,00	1,00	1,84	0,00	1,00	2,61	0,65	1,05	7,22	1,09	1,04	26,28	1,10	1,04	x	x	x
2	0,13	0,00	1,00	0,15	0,00	1,00	0,27	0,00	1,00	0,41	0,00	1,00	2,43	0,00	1,00	9,63	0,00	1,00
3	0,37	0,40	1,14	0,41	1,00	1,15	0,75	1,22	1,16	1,69	1,75	1,15	4,63	2,54	1,15	20,58	3,24	1,17
4	1,58	0,66	1,06	2,02	0,77	1,06	4,51	1,03	1,06	13,40	1,24	1,06	x	x	x	x	x	x
5	1,68	0,00	1,00	2,30	0,00	1,00	5,62	0,00	1,00	19,53	0,00	1,00	x	x	x	x	x	x
6	1,36	0,00	1,00	1,66	0,00	1,00	3,35	0,00	1,00	9,18	0,00	1,00	x	x	x	x	x	x
7	0,00	0,00	1,00	0,14	0,64	1,93	0,31	1,38	2,58	1,44	1,68	1,53	2,86	1,85	1,55	10,45	1,43	1,62
8	0,54	0,00	1,00	0,68	0,00	1,00	1,30	0,00	1,00	3,62	0,00	1,00	10,26	0,00	1,00	x	x	x
9	1,77	3,56	1,31	1,43	3,83	1,36	2,59	4,52	1,35	5,90	5,49	1,36	16,40	6,28	1,36	22,40	6,35	1,35
10	0,95	2,81	1,34	0,77	3,01	1,40	1,32	3,93	1,41	2,96	4,97	1,40	7,10	5,84	1,40	12,10	5,94	1,40

x – analyt neeluoval do 120 minut

Tab 7: Vliv množství acetonitrilu a pH vodné složky MF na chromatografické chování binaftylových derivátů na koloně Chiralcel OD-RH CSP. Symboly použité v tabulce – viz tab. 4.

analyt	ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 6,0						ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0					
	60/40			40/60			60/40			40/60		
	k_1	R	α	k_1	R	α	k_1	R	α	k_1	R	α
1	3,41	0,66	1,04	28,06	0,78	1,05	2,74	0,63	1,05	10,48	1,79	1,13
2	0,23	0,00	1,00	1,55	0,00	1,00	1,12	0,00	1,00	13,90	0,74	1,10
3	0,67	1,35	1,18	4,76	2,12	1,15	0,79	1,25	1,16	4,65	2,14	1,15
4	5,88	1,05	1,06	x	x	x	4,77	0,95	1,06	x	x	x
5	7,51	0,00	1,00	x	x	x	5,14	0,00	1,00	x	x	x
6	4,36	0,00	1,00	x	x	x	3,13	0,00	1,00	x	x	x
7	0,16	0,86	1,44	0,61	2,42	1,46	1,02	4,37	1,55	7,12	6,93	1,58
8	1,75	0,00	1,00	8,83	0,00	1,00	1,43	0,00	1,00	10,32	0,00	1,00
9	3,20	4,54	1,37	16,67	5,27	1,37	2,74	4,41	1,37	16,50	4,96	1,38
10	1,66	3,97	1,52	7,17	5,18	1,42	1,35	3,68	1,41	7,05	4,96	1,42

x – analyt neeluoval do 120 minut

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 obtížná. Navíc látky **5** a **6** nesou v polohách 2 a 2' poměrně objemné substituenty, které nemají odpovídající ionizovatelné skupiny vhodné pro stereoselektivní interakce. Analyt **4** je strukturně velmi podobný látkám **5** a **6**, také neobsahuje ionizovatelné skupiny, je ale méně symetrický, což je pravděpodobná příčina alespoň částečně úspěšné separace tohoto analytu. Binaftylový skelet analytu **8** je na uhlících C2 a C2' symetricky substituován hydroxylovými skupinami, které poměrně ochotně vytvářejí intramolekulární vodíkové vazby, a tím blokují možnost stereoselektivní interakce s chirálním selektorem a ve výsledku ztěžují enantioseparaci. Toto tvrzení podporuje fakt, že v MF obsahujících MeOH, který je vodíkovým donorem, je enantioseparace analytu **8** proveditelná [6].

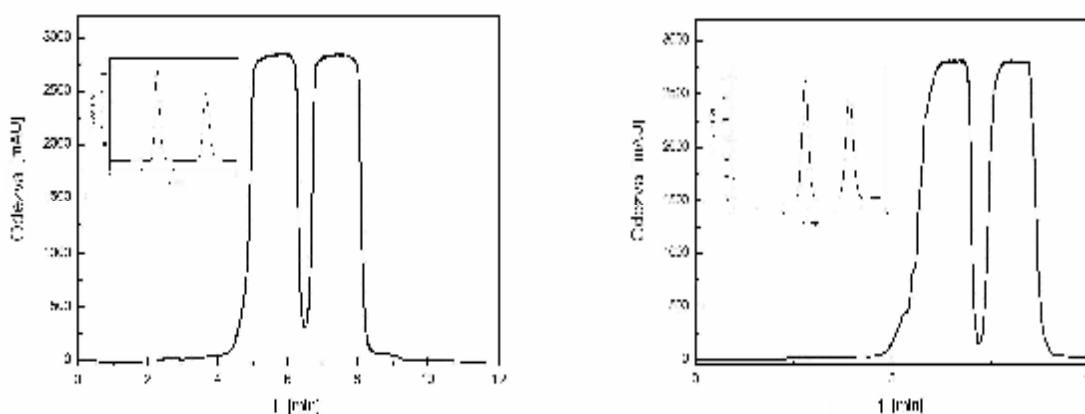
8,3'-disubstituované 1,2'-binaftyly se ve všech mobilních fázích separovaly na základní linii. Změny ve složení MF měly vliv na retenční chování těchto látek, enantiomerní rozlišení však stále dosahovalo vysokých hodnot. Prostorové uspořádání těchto derivátů pravděpodobně umožňuje jejich lepší „fit“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

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.3.2, mechanismus chirálního rozpoznávání je založen na stérickém „fitu“ analytů do kavit CSP a na polárních interakcích mezi polárními substituenty binaftylu a karbamátovými skupinami derivátu celulosy. Právě polární

karbamátové skupiny jsou nejdůležitějšími interakčními místy pro chirální rozpoznávání [5] ověřit, ke kterému přispívají π - π i interakce mezi fenylem chirálního selektoru a naftyllovými kruhy analytů.

Z výsledků získaných v reverzním separačním módu vyplývá, že analyty **1**, **2** a **7** se nejlépe separovaly v MF složené z ACN/20 mM fosfátového pufru, pH 3,0, 40/60 (v/v). Látky **3**, **9** a **10** upřednostňovaly MF obsahující ACN/vodu 40/60 (v/v) a pro analyt **4** je 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 enantiorozlišení. 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 μ l) o jednotné koncentraci 5,0 mg/ml byly dávkovány na kolonu. Dostatečné enantiorozlišení bylo zachováno až do 50 μ l nastříkovaného objemu. Chromatogramy separací v semipreparativním měřítku analytů **7** a **10** jsou uvedeny na obr. 17.



Obr. 17: Separace analytů **7** (vlevo) a **10** (vpravo) v semipreparativním měřítku.

Experimentální podmínky: kolona Chiralcel OD-RH,

mobilní fáze: analyt **7**: ACN/1% HAc, pH 3,3 60/40 (v/v),

analyt **10**: ACN/voda 60/40 (v/v);

průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm; dávkované množství analytu 250 μ g (koncentrace zásobního roztoku analytu 5,0 mg/ml, objem vzorku 50 μ l).

Závěr

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.

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 π - π 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. Ze srovnání výsledků získaných v NP a RP módu jednoznačně vyplývá, že reverzní separační mód je pro separaci studovaných analytů vhodnější.

4.3 Chirální stacionární fáze tvořené syntetickými polymery^{III}

Třetím typem chirálních stacionárních fází, na kterých bylo studováno retenční a enantioseparační chování derivátů 1,1'- a 1,2'-binaftylu, byly kolony naplněné zcela novými syntetickými polymery navázanými na silikagelový nosič. Výhoda těchto CSP spočívá v jejich velké strukturní a chemické variabilitě, v možnosti připravit obě enantiomerní verze daného polymeru a v termální stabilitě plynoucí z charakteru polymerů [7,8,9,10,11,12]. To dovoluje používat např. i halogenovaná rozpouštědla [7]. V této práci byly použity CSP na bázi poly(*trans*-1,2-diaminocyklohexandiyl-bis-akrylamidu) (P-CAP), poly(*N,N'*-[(1*R*,2*R*)-1,2-difenyl-1,2-ethandiyl]bis-2-propenamidu) (P-CAP-DP) a poly([*trans*-9,10-dihydro-9,10-ethanoantracen-(1*S*,12*S*)-11,12-dikarboxy]bis-4-vinylfenylamidu) (DEABV). Struktury polymerů jsou uvedeny na obr. 9 na str. 32, obr. 10 na str. 34 a na obr. 11 na str. 36. Syntetické polymerní CSP se používají především v normálním a polárně-organickém separačním módu [7,8,9,13]. Vzhledem k tomu, že se jedná o zcela nové chirální stacionární fáze, laboratorně připravené (viz experimentální část), jsou získané výsledky včetně negativních prezentovány a diskutovány podrobněji, než v případě dvou předcházejících typů CSP.

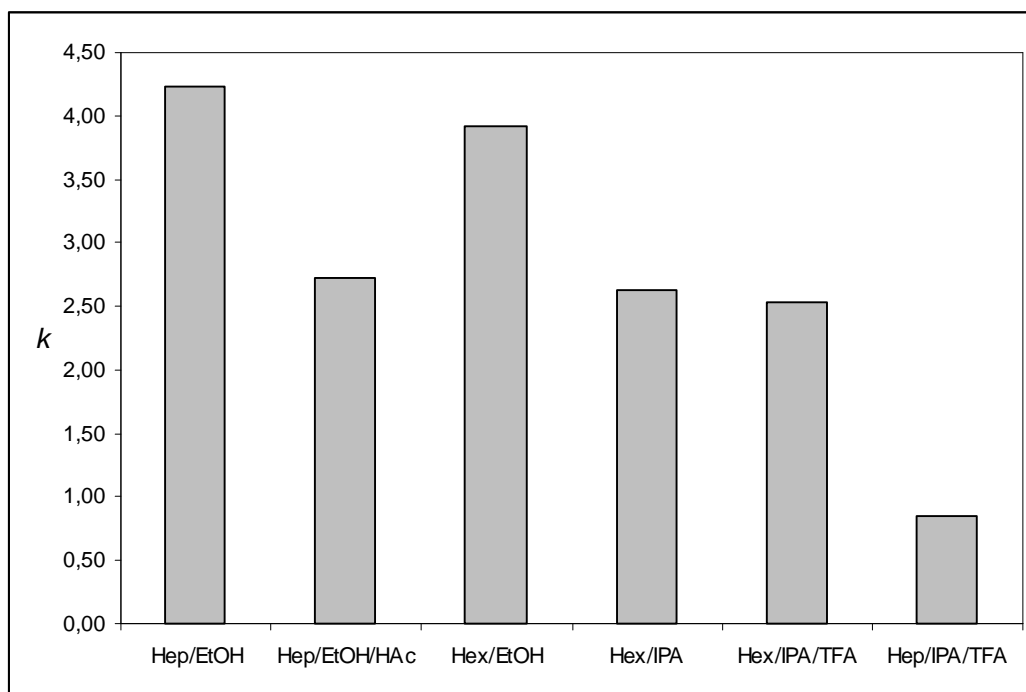
4.3.1 Chirální stacionární fáze P-CAP

4.3.1.1 Normální separační mód

Mobilní fáze normálního módu byly tvořeny *n*-heptanem (HEP) nebo *n*-hexanem ve směsi s polárnějším organickým modifikátorem, kterým byl buď ethanol (EtOH), nebo propan-2-ol. Objem *n*-heptanu byl měněn po 10 obj. % v rozmezí od 30 do 100 obj. %. Separací chování binaftylových derivátů bylo v MF obsahujících *n*-hexan (jako nepolární složku této fáze) sledováno při dvou procentuálních složeních – 50 a 80 obj. %. Studován byl také vliv použitého polárního modifikátoru (EtOH x IPA) a přísadků 0,1% octové kyseliny (HAc) nebo 0,1% trifluoroctové kyseliny (TFA) na enantioseparaci analytů.

Retence všech analytů rostla podle předpokladu s množstvím nepolární složky v MF. Avšak při vyšším než 92 % zastoupení nepolární složky (HEP) v MF docházelo k výraznému poklesu retence všech analytů, což je v rozporu jak s teoretickým předpokladem, tak s některými publikovanými výsledky [7]. Retence analytů **1**, **4**, **5**, **6** a **9** stoupala s rostoucím zastoupením *n*-heptanu v MF, nicméně látky stále eluovaly s krátkými retenčními časy, a změny v retenci se složením MF u nich byly malé. Větší změny v retenci se projevily u analytů **3**, **8** a **10**, tj. u všech analytů, kde lze předpokládat výrazný vliv substituentu –OH. Analyt **2** se na koloně ireverzibilně zadržoval a látka **7** měla velmi dlouhou retenci už v MF obsahující 50 % HEX nebo HEP a v MF s vyšším obsahem nepolární složky přestala z kolony eluovat. Jak ilustruje obr. 18 typ nepolárního rozpouštědla neměl na retenci analytů výrazný vliv.

Záměna EtOH za IPA v MF obsahující *n*-hexan vedla ke snížení retence většiny analytů (obr. 18), které bylo doprovázeno zhoršením symetrie píků a poklesem účinnosti kolony. Přídavek 0,1% HAc do MF vedl ke zkrácení retence většiny analytů, které nebylo doprovázeno výraznějšími změnami v enantioseparaci. Zkrácení retence v MF obsahující 0,1% TFA bylo větší než v případě HAc a nejvýrazněji se projevilo u analytů **2** a **7**. Právě analyt **2** eluoval pouze v MF obsahujících TFA.



Obr. 18: Závislost retenčního faktoru analytu **3** na složení mobilní fáze. Experimentální podmínky: kolona P-CAP, mobilní fáze HEP/EtOH, HEP/EtOH/HAc (0,1 obj.%), HEX/EtOH, HEX/IPA, HEX/IPA/TFA a HEP/IPA/TFA (0,1 obj.%) vždy 80/20 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

Analyty **7**, **8** a **10** se na P-CAP CSP v NP rozdělily na základní linii, u analytu **3** byla pozorována pouze částečná enantioseparace (tab. 8). Nejvyšší hodnoty rozlišení analytů **3** a **7** byly dosaženy v MF HEX/IPA/TFA 80/20/0,1 (v/v/v). Separace analytů **8** a **10** probíhala téměř ve všech testovaných MF s vysokými hodnotami rozlišení. Enantioselektivita analytů **3** a **7** byla největší v MF složené z HEX a IPA resp. s přídavkem TFA. Zatímco hodnota α pro analyt **3** byla nejvyšší v MF tvořené pouze HEX a IPA v obj. poměru 80/20, v případě analytu **7** teprve přídavek TFA umožnil rozdělení atropisomerů téměř na základní linii; dosažená hodnota enantioselektivity byla 1,2. Pro analyty **8** a **10** se hodnoty enantioselektivity se složením MF mírně měnily, vždy byly větší než 1,3 resp. 1,2. Nejvyšší hodnota enantioselektivity byla pro oba analyty pozorována v MF HEX/IPA 80/20 (v/v), ovšem v této MF byla symetrie píků jednotlivých atropisomerů nízká, což mělo za následek snížení hodnot rozlišení.

Tab. 8: Hodnoty retenčních faktorů, enantioselektivního rozlišení a enantioselektivít těch analytů, u kterých byla pozorována alespoň částečná enantioseparace na P-CAP CSP.

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_I	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
	α	1,15	1,07	1,06	1,06	1,13	1,00
7	k_I	x	x	x	x	10,27	2,21
	R	x	x	x	x	1,62	0,69
	α	x	x	x	x	1,22	1,10
8	k_I	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
	α	1,59	1,43	1,36	1,39	1,58	1,34
10	k_I	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
	α	1,36	1,19	1,18	1,17	1,35	1,15

x – analyt neeluoval z kolony do 120 min.

Píky většiny analytů byly v testovaných MF normálního módu symetrické s hodnotou faktoru asymetrie okolo 1,1. Jedinou výjimkou byla mobilní fáze HEX/IPA, ve které byla u všech analytů pozorována nejnižší retence, ale i účinnost kolony, stejně jako nejnižší symetrie píků. Účinnost CSP P-CAP byla pro všechny analyty kromě **7** vysoká s počtem teoretických pater (N/m délky kolony) převyšujícím 15 000 a často i vyšším.

4.3.1.2 Polárně-organický separační mód

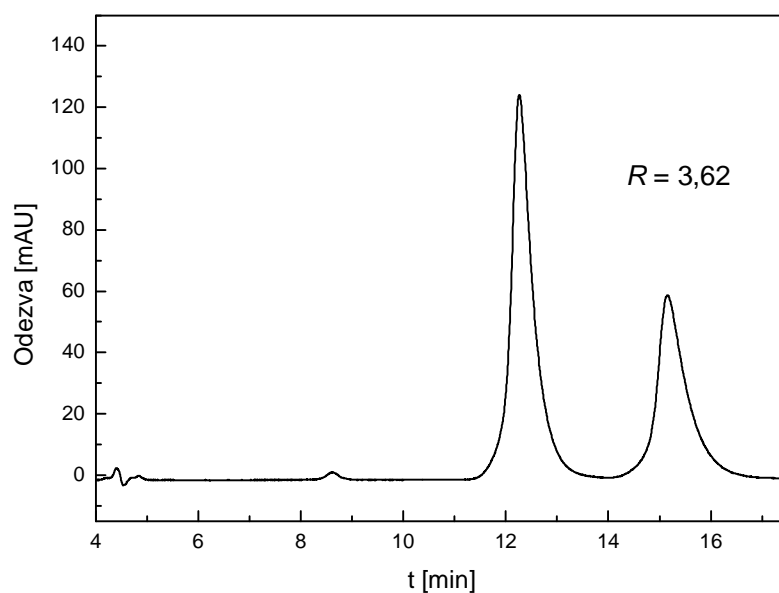
Mobilní fáze polárně-organického módu byly tvořeny směsí ACN a MeOH, kde se objem MeOH pohyboval v rozmezí 10 - 0 obj.%. Do mobilních fází byly přidávány octová kyselina a směs octové kyseliny a triethylaminu (TEA) ve vzájemném látkovém poměru 1:1 a celkové koncentraci 10 mM nebo 0,3 M.

Retence většiny analytů byla krátká ($k \sim 1,0$) a stoupala s množstvím ACN v MF. Delší retenční časy byly zaznamenány pouze u analytu **8** a u analytu **7** pak výrazné prodloužení retence s rostoucím množstvím ACN. Přítomnost 10 mM HAc v mobilní fázi vedla k mírnému poklesu retence všech látek. Směs TEA a HAc (10 mM) v MF ACN/MeOH 95/5 (v/v) neměla na retenci analytů vliv. Pouze v případě analytu **7** se retence zkrátila. Zřetelné snížení retence bylo pozorováno až v MF obsahující 0,3 M směs HAc a TEA, a opět se nejvíce projevilo u analytu **7**.

V polárně-organickém módu se separovalo 5 analytů, jejichž separační parametry v závislosti na složení mobilní fáze uvádí tab. 9. Analyty **3**, **8** a **10** se alespoň částečně separovaly ve všech testovaných MF a rozlišení analytů **3** a **8** rostlo s obsahem ACN v mobilní fázi. Hodnoty rozlišení analytu **8** byly ve všech MF vysoké. Ukázka enantioseparace této látky je na obr.19. Všechny analyty v tab. 9 nesou ve své struktuře jednu nebo dvě hydroxylové skupiny schopné tvorby stereoselektivních H-vazeb, které jsou v mechanismu chirálního rozlišení na P-CAP CSP významné. Octová kyselina zřejmě přispívá k omezení nestereoselektivních interakcí mezi těmito analyty a CSP – retence se v její přítomnosti snižuje, avšak separace atropisomerů se zlepšuje [7]. Analyt **3** se separoval s nižšími hodnotami rozlišení v porovnání s analyty **8** a **10**. Příčinou je pravděpodobně přítomnost objemného substituentu umístěného na uhlíku C2 analytu **3**, který stericicky brání OH- skupině na uhlíku C'2' interagovat s amidovými skupinami kolony P-CAP za tvorby H-interakcí. Tuto hypotézu by podpořilo i separační chování analytu **2**, u kterého rovněž objemný substituent na uhlíku C'2' stericicky brání potřebné stereoselektivní interakci. Na druhé straně analogické chování analytu **2** s analytem **7** spíše ukazuje na negativní roli karboxylové kyseliny v separačním mechanismu. Analyty **2** a **7** se separovaly pouze v MF obsahujících směs HAc a TEA. Separace analytu **2** probíhala téměř na základní linii, zatímco analyt **7** se podařilo rozdělit pouze částečně (viz tab. 9.). Analyt **7** obsahuje v relativní blízkosti OH-, COOH- i NH₂- skupiny (C3, C2, C'2'), které mohou vytvářet intramolekulární vodíkové můstky, a tím omezit potřebné interakční možnosti. To vede v důsledku k nižším hodnotám rozlišení, případně ke znemožnění enantioseparace. Enantioselektivita analytu **2** rostla s obsahem ACN v mobilní fázi ACN/MeOH + 10 mM HAc + TEA. Hodnoty enantioselektivity pro analyt **7** zůstávaly v jednotlivých MF téměř beze změny. Dva hydroxylové substituenty analytu **8** jsou dobře přístupné amidovým skupinám CSP pro stereoselektivní vodíkovou interakci, což potvrzují vysoké hodnoty rozlišení, přičemž s rostoucím množstvím ACN v MF byl pozorován nárůst enantioselektivity a rozlišení analytu **8** (tab. 9). Enantioselektivita analytů **3** a **10** zůstávala v jednotlivých MF bez velkých změn.

Tab. 9: Vliv složení MF na enantioseparaci analytů na CSP P-CAP.

Mobilní fáze / analyt		2	3	7	8	10
ACN	R	0,00	0,75	0,00	3,82	1,29
	a	1,00	1,11	1,00	1,54	1,19
100% ACN + 10 mM HAc	R	0,00	1,01	0,00	4,22	1,83
	a	1,00	1,12	1,00	1,57	1,21
ACN/MeOH 95/5 (v/v)	R	0,00	0,538	0,00	3,64	1,64
	a	1,00	1,07	1,00	1,37	1,18
ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 10 mM HAc	R	0,00	0,57	0,00	3,86	1,88
	a	1,00	1,07	1,00	1,37	1,19
ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 10mM HAc/TEA	R	1,21	0,62	0,66	3,29	1,75
	a	1,20	1,09	1,13	1,34	1,20
ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 0,3M HAc/TEA	R	1,00	0,56	0,64	3,22	1,69
	a	1,20	1,08	1,12	1,35	1,20
ACN/MeOH 99/1 (v/v) + 10mM HAc/TEA	R	1,12	0,83	0,59	3,62	1,74
	a	1,25	1,10	1,14	1,49	1,23
ACN/MeOH 90/10 (v/v) + 10mM HAc/TEA	R	1,04	0,43	0,64	2,80	1,40
	a	1,15	1,06	1,10	1,30	1,16



Obr. 19: Enantioseparace analytu **8** na chirální stacionární fázi P-CAP v mobilní fázi ACN/MeOH 95/5 (v/v); průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

Píky analytů **1**, **2**, **4**, **5**, **6**, **7** a **9** byly ve všech mobilních fázích PO módu poměrně symetrické (složení MF nemělo vliv na jejich symetrii). Analyt **3** měl v MF tvořených 100% ACN, 100% ACN/10 mM HAc a ACN/MeOH/HAc + TEA 99/1/10 mM (1:1) symetrické píky, v ostatních MF byla naopak pozorována nízká symetrie píků s faktorem asymetrie $A_s \sim 0,4$. Analyty **8** a **10** vykazovaly dobrou symetrii píků v MF obsahujících 10 mM HAc a TEA. V MF jiného složení docházelo ke zhoršení symetrie. Účinnost CSP P-CAP se pro většinu analytů pohybovala kolem hodnoty 25 000 teoretických pater na metr délky kolony. Změny ve složení MF měly na účinnost kolony pro jednotlivé analyty většinou zanedbatelný vliv - patrné byly pouze u analytů **8** a **10**, u nichž byl nejnižší počet teoretických pater pozorován v MF s vysokým podílem acetonitrilu tj. v 100% ACN a ACN/HAc, ve kterých látky eluovaly s delšími retenčními časy ($k \sim 5,0$), a tudíž symetrie píků výrazně poklesla.

4.3.2 Chirální stacionární fáze P-CAP-DP

Vzhledem ke struktuře této CSP (obr. 10 na str. 34) a analytů jsme předpokládali, že by enantioseparace mohla probíhat s dobrými výsledky. V retenčním a enantioseparačním mechanismu jsme očekávali/předpokládali uplatnění π - π interakcí. I v případě této kolony bylo postupováno obdobně jako u P-CAPu, tzn. nejprve byl testován normální separační mód s obdobnými mobilními fázemi. Všechny binaftylové deriváty se v normálním módu v MF *n*-hexan/EtOH ireverzibilně zadržovaly na koloně. Variace ve složení mobilní fáze nevedly ke zlepšení, tedy k eluci analytů ze stacionární fáze.

Retenční a separační chování analytů v polárně-organickém módu bylo sledováno v mobilních fázích ACN/MeOH, kde se obsah ACN pohyboval od 95 do 100 obj. %. V jednom z experimentů byl methanol nahrazen propan-2-olem, ovšem pozorovaná změna v retenci látek byla nevýznamná. Stejně jako na P-CAP CSP byly do MF přidávány 10 mM HAc, 10 mM nebo 0,3 M směs HAc a TEA ve vzájemném poměru látkových množství 1:1.

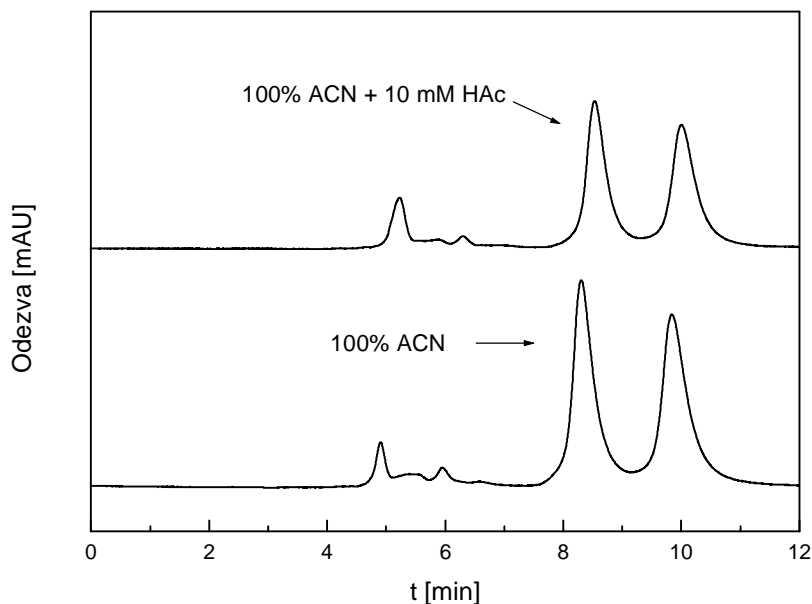
Retence jednotlivých analytů stoupala s množstvím ACN v MF. Nejdelší retence byla pozorována u analytů **2** a **7** – oba analyty přestaly eluovat z kolony v čistém ACN. V přítomnosti octové kyseliny došlo k poklesu retence všech analytů, což se nejvýrazněji projevilo opět u látek **2** a **7**. Stejný účinek na retenci látek, tedy její pokles, měl přírůstek směsi octové kyseliny a triethylaminu.

Částečná enantioseparace na této CSP byla pozorována u látek **2** a **8** s hodnotami rozlišení $R \sim 0,6$ (tab. 10). Zatímco se analyt **2** separoval pouze v MF obsahujících směs HAc a TEA, přičemž koncentrace této směsi neovlivňovala ani hodnoty rozlišení ani selektivity,

analyt **8** se dělil v mobilní fázi ACN/MeOH 98/2 (v/v) a 100% ACN a nejvyššího rozlišení enantiomerů této látky bylo dosaženo v ACN s 10 mM HAc (tab.10). Jak vyplývá z této tabulky, separace analytu **10** probíhala kromě MF obsahující směs HAc a TEA vždy na základní linii. Rozlišení stoupalo s obsahem ACN v MF a maximální hodnota byla dosažena v čistém acetonitrilu a v ACN s přídatkem HAc - viz obr. 20. Octová kyselina v MF ACN/HAc rozlišení ani enantioselektivitu analytu **10** příliš neovlivnila. Naproti tomu v MF složené z ACN/MeOH 95/5 (v/v) vedla přítomnost HAc k mírnému nárůstu rozlišení bez změny v enantioselektivitě. V mobilních fázích obsahujících směs HAc a TEA došlo ke snížení retence, které bylo doprovázeno poklesem hodnoty rozlišení, ne však jednoznačně enantioselektivity.

Tab. 10: Separační parametry analytů získané v polárně-organickém módu na koloně P-CAP-DP.

Mobilní fáze / analyt		2	8	10
ACN	<i>R</i>	0,00	0,78	2,31
	<i>a</i>	1,00	1,13	1,37
100% ACN + 10 mM HAc	<i>R</i>	0,00	0,86	2,30
	<i>a</i>	1,00	1,12	1,37
ACN/MeOH 98/2 (v/v)	<i>R</i>	0,00	0,58	1,75
	<i>a</i>	1,00	1,09	1,33
ACN/MeOH 95/5 (v/v)	<i>R</i>	0,00	0,00	1,47
	<i>a</i>	1,00	1,00	1,28
ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 10 mM HAc	<i>R</i>	0,00	0,49	1,53
	<i>a</i>	1,00	1,06	1,27
ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 10mM HAc/TEA	<i>R</i>	0,62	0,00	0,72
	<i>a</i>	1,32	1,00	1,43
ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 0,3M HAc/TEA	<i>R</i>	0,62	0,00	0,83
	<i>a</i>	1,33	1,00	1,29



Obr. 20: Chromatogram separace analytu **10** na chirální stacionární fázi P-CAP-DP v mobilní fázi 100% ACN a ACN/HAc 100/10 mM; průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

Symetrie píků jednotlivých analytů byla na této CSP v porovnání s P-CAP CSP nižší. Hodnoty faktoru asymetrie analytů **1**, **4**, **6**, **8** a **9** byly vždy menší než 1,0, analyt **7** měl naopak faktor asymetrie vysoký – kolem hodnoty 3,0. Pouze analyty **3**, **5** a **10** eluovaly se symetrickými píky. Účinnost kolony P-CAP-DP byla v porovnání s P-CAP CSP pro většinu analytů nižší. Pouze u tří látek - **4**, **6** a **9** – byla pozorována vyšší účinnost kolony P-CAP-DP než P-CAP s hodnotami pohybujícími se okolo 30 000 teoretických pater na metr délky kolony. V případě analytů **2** a **7** byla naopak účinnost kolony velice nízká, často s $N < 1\ 000$.

4.3.3 Chirální stacionární fáze DEABV

Separční chování bylo studováno i na chirální stacionární fázi DEABV (viz struktura na obr. 11, str. 36) v normálním a polárně-organickém separačním módu. Sledován byl opět vliv složení mobilních fází na retenční a enantioseparační chování jednotlivých analytů.

4.3.3.1 Normální separační mód

Mobilní fáze NP módu se skládaly z binární směsi *n*-heptanu a propan-2-olu, kde se zastoupení *n*-heptanu pohybovalo od 50 od 70 obj.% (s krokem po 5 obj.%). Retence analytů rostla na této CSP s rostoucím podílem *n*-heptanu v MF a v porovnání s chirální stacionární fází P-CAP byla vyšší. Přídavek 0,1% HAc do MF vedl k poklesu retence všech 1,1'-binaftylů, zatímco disubstituované 1,2'-binaftyly (**9** a **10**) měly v MF obsahující HAc retenci nejdelší. Jedině analyt **2** neeluoval v žádné z testovaných MF.

V normálním separačním módu se na DEABV CSP částečně separovaly tři analyty – **8**, **9** a **10** (viz tab. 11). Rostoucí retence látek s množstvím *n*-heptanu v MF byla doprovázena stoupajícími hodnotami enantiozlišení všech analytů. Octová kyselina v MF ovlivnila pouze retenci látek, ale neměla vliv na jejich rozlišení. Přídavek HAc do MF však vedl ke zlepšení symetrie píků z hodnoty 2,8 na hodnotu 1,7. Z tab. 11 je zřejmé, že enantiosektivita látek nebyla složením MF výrazně ovlivněna. Rozlišení vykazovalo mírný nárůst při vyšší retenci analytů, tj. v MF s vyšším obsahem *n*-heptanu. Nejvyšší hodnota chirálního rozlišení analytu **9** v MF HEP/IPA/HAc 70/30/0,1 (v/v/v) souvisí s nejdelší retencí této látky. Na DEABV CSP se v NP módu opět významně uplatňují v mechanismu chirálního rozpoznávání vodíkové interakce mezi funkčními skupinami analytu a CSP. Nicméně ze získaných výsledků je patrné, že disociovatelné či protonizovatelné skupiny analytů na dané CSP k těmto interakcím významně nepřispívají nebo nejde o stereoselektivní interakce.

Tab. 11: Hodnoty rozlišení a enantioselektivit těch analytů, u kterých byla pozorována v NP módu na DEABV CSP alespoň částečná enantioseparace.

MF		HEP/IPA (v/v)					HEP/IPA/HAc
analyt		50/50	55/45	60/40	65/35	70/30	70/30/0,1
8	<i>R</i>	0,50	0,52	0,52	0,54	0,53	0,55
	<i>α</i>	1,08	1,09	1,09	1,09	1,10	1,09
9	<i>R</i>	1,00	1,05	1,07	1,15	1,26	1,27
	<i>α</i>	1,29	1,30	1,29	1,30	1,29	1,30
10	<i>R</i>	0,90	0,86	0,89	0,91	1,03	1,03
	<i>α</i>	1,26	1,26	1,26	1,25	1,25	1,24

Symetrie všech sedmi z deseti studovaných derivátů byla na DEABV CSP velmi nízká. Hodnota faktoru asymetrie byla u většiny látek vyšší než 2,0. Například analyt **9** měl

faktor asymetrie vyšší než 3,0, a v případě látky **6** dosáhl dokonce hodnoty 6,0. Účinnost kolony DEABV se pohybovala v rozmezí 200 – 7 000 teoret. pater/m délky kolony. Nejnižší účinnost byla zaznamenána u analytů **4**, **5**, **6** a **7**, nejvyšší pak u **8**.

4.3.3.2 Polárně-organický separační mód

Retence analytů v polárně-organickém módu tvořeném mobilními fázemi ACN/MeOH 95/5 (v/v) a 100% ACN byla vyšší v MF tvořené samotným ACN. Obecně však byla retence většiny analytů nízká, hodnoty retenčních faktorů byly menší než jedna. Výjimkou byl pouze analyt **7**. Přídavek 0,1% HAc do testovaných mobilních fází vedl pouze k zanedbatelným změnám v retenci. Výrazněji se zkrácení retenčních časů projevilo pouze u analytu **7**, jehož retence se v přítomnosti HAc snížila na polovinu.

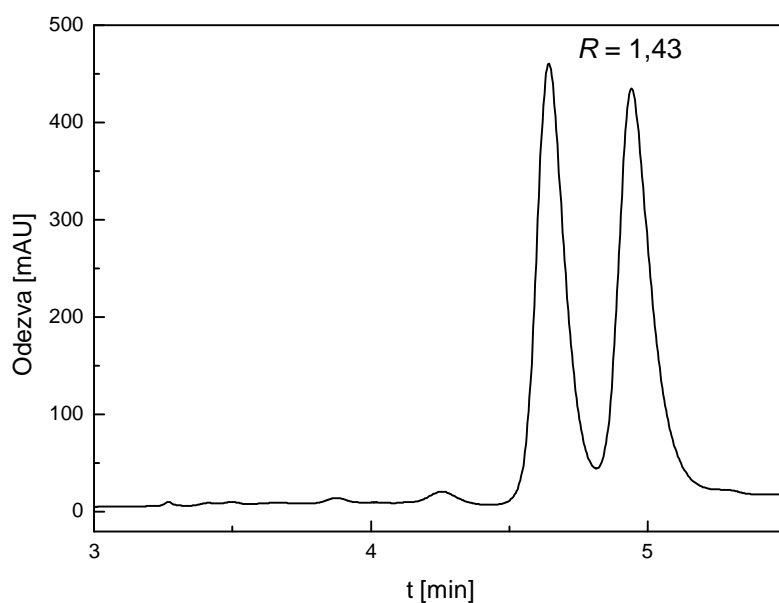
Na DEABV CSP se podařilo rozdělit, stejně jako na P-CAP-DP CSP (viz tab. 10), tři látky – analyt **5** částečně a analyty **9** a **10** téměř na základní linii (viz tab. 12). Analyty **5** a **9** se separovaly s nejvyššími hodnotami rozlišení v MF tvořené acetonitrilem s přídavkem HAc. Ilustrativní chromatogram je uveden na obr. 21. Z tabulky 12 je zřejmé, že složení mobilních fází PO módu nemělo příliš velký vliv na hodnoty enantioselektivity.

Tab. 12: Hodnoty rozlišení a enantioselektivit analytů separovaných v PO módu na DEABV CSP.

Mobilní fáze / analyt		5	9	10
ACN/MeOH 95/5 (v/v)	<i>R</i>	0,60	1,33	1,40
	<i>a</i>	1,08	1,17	1,16
ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 10 mM HAc	<i>R</i>	0,58	1,27	1,37
	<i>a</i>	1,08	1,16	1,16
ACN	<i>R</i>	0,61	1,40	1,35
	<i>a</i>	1,09	1,17	1,17
100% ACN + 10 mM HAc	<i>R</i>	0,63	1,43	1,31
	<i>a</i>	1,11	1,18	1,17

Stejně jako enantioselektivita, nebyla ani symetrie píků ovlivněna změnami ve složení MF. Sedm analytů (**1**, **2**, **3**, **4**, **8**, **9**, **10**) eluovalo se symetrickými píky, u nichž se faktor asymetrie pohyboval okolo hodnoty 1,3. Zbylé tři analyty – **5**, **6** a **7** – měly píky nesymetrické. Faktor asymetrie analytu **5** se pohyboval kolem hodnoty $A_s = 0,6$, u látek **6** a **7**

se naopak faktor asymetrie pohyboval kolem hodnoty $A_s \sim 3,0$. Účinnost kolony byla pro většinu analytů vysoká, často s 50 000 teoretickými patry na jeden metr délky kolony. Jedinou výjimkou byl analyt **7**, u kterého účinnost kolony nepřekročila 900 pater. Z hlediska interakčního mechanismu v PO na DEABV CSP ukazují výsledky spíše než na hlavní úlohu H-vazeb na důležitost π - π interakcí, prostorového uspořádání, příp. dipolárních interakcí.



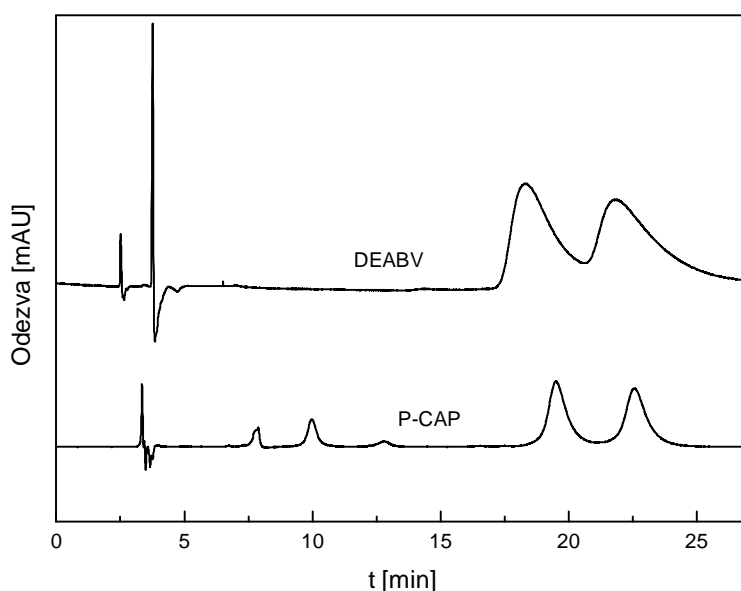
Obr. 21: Enantioseparace analytu **9** na DEABV CSP v mobilní fázi ACN/HAc 100/0,1 (v/v), průtoková rychlost 1,0 ml/min, UV detekce 254 nm.

4.3.4 Vzájemné srovnání polymerních CSP P-CAP, P-CAP-DP a DEABV

4.3.4.1 Normální separační mód

Na chirální stacionární fázi P-CAP-DP docházelo k ireverzibilnímu zadržování analytů, které v žádné z MF tvořících normální mód neeluovaly. Srovnáváme-li další dvě CSP, na P-CAP a DEABV byl shodně pozorován nárůst retence analytů s rostoucím množstvím nepolární složky (HEX nebo HEP) mobilní fáze, přídavek HAc do MF vedl ve většině případů k poklesu retence, který byl často doprovázen vyšším rozlišením, což souviselo se zvýšením symetrie píků. Analyty **2** a **7** měly nejvyšší retenci na daných CSP ze

všech studovaných derivátů (v některých MF neeluovaly z kolony vůbec). Vyšší retence analytů byla pozorována na DEABV CSP. Na P-CAP CSP byly alespoň částečně rozděleny čtyři analyty – **3**, **7**, **8** a **10**, na DEABV tři látky – **8**, **9** a **10** (tab. 13) – z celkového počtu deseti testovaných. Separace analytů **7**, **8** a **10** probíhala na P-CAP CSP ve všech testovaných MF na základní linii. Analyty **8** a **10** (obr. 22) se separovaly na obou CSP, avšak rozlišení bylo výrazně vyšší na P-CAP. Na této CSP byly v porovnání s DEABV lepší také další parametry charakterizující separaci – symetrie píků i účinnost kolony.



Obr. 22: Chromatogram enantioseparace analytu **10**.

Stacionární fáze P-CAP, mobilní fáze HEX/EtOH 80/20 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min
 Stacionární fáze DEABV, mobilní fáze HEP/IPA/HAc 70/30/0,1 (v/v/v), průtoková rychlost 1,0 ml/min; UV detekce 254 nm.

Separace různých analytů na jednotlivých CSP dokládá vzájemnou komplementaritu těchto fází, neboli analyt, který se neseperuje na jedné stacionární fázi, se může rozdělit na jiné/druhé. V případě, že se daný analyt separuje na obou chirálních stacionárních fázích, často se separace na jednotlivých CSP liší rozlišením a enantioselektivitou [9]. Vodíkové vazby jsou považovány za dominantní v mechanismu chirálního rozlišení na obou CSP v NP. Na DEABV k interakčnímu mechanismu ještě přispívají π - π a dipólové interakce. Tyto však

spíše přispívají ke zvýšení retence než k chirálnímu rozlišení, nejsou tedy stereoselektivní. Vyšší hodnoty enantiorozlišení analytů **8** a **10** na P-CAP CSP (tab. 13) lze vysvětlit lepší přístupností příslušných funkčních skupin analytů k funkčním skupinám chirální stacionární fáze. Chirální selektor DEABV CSP je objemný, takže jeho funkční skupiny mohou být špatně přístupné pro stereoselektivní interakci s molekulami analytů.

V normálním módu se podařilo alespoň částečně rozdělit polovinu studovaných látek. Lepší separační parametry analytů dělících se na obou CSP byly získány na P-CAP CSP. Nedělily se analyty **1**, **2**, **4**, **5** a **6**, přestože vykazovaly poměrně vysokou retenci. Analyty **1**, **4**, **5** a **6** jsou v polohách C2 a C'2' symetricky substituované funkčními skupinami, které nemohou vytvářet stereoselektivní vodíkové vazby se stacionární fází (ty jsou na P-CAP CSP důležité pro chirální rozlišení).

4.3.4.2 Polárně-organický separační mód

Na všech třech polymerních CSP byl v polárně-organickém módu pozorován nárůst retence se stoupajícím množstvím ACN v MF tvořených ACN s MeOH jako základními složkami. Naopak přidavek octové kyseliny do MF vedl ke snížení retence studovaných látek. Z tabulky 14, která uvádí přehled analytů separovaných na jednotlivých polymerních CSP v PO módu, vyplývá, že nejvíce analytů – pět látek z deseti - bylo rozděleno na P-CAP CSP. Na dalších dvou CSP (P-CAP-DP a DEABV) byla pozorována enantioseparace tří analytů.

Srovnání separace atropisomerů analytu **8** na CSP P-CAP-DP a P-CAP ukazuje obr. 23. Vyšší rozlišení bylo získáno na CSP P-CAP, kde se analyt **8** separoval na základní linii s velmi symetrickými píky a vysokou účinností kolony ve všech testovaných MF. Na P-CAP-DP CSP se tento analyt dělil pouze částečně s hodnotami rozlišení $R < 1,0$. Nejvhodnější složení MF s ohledem na sledované separační parametry bylo na P-CAP-DP CSP ACN s 10 mM HAc. Na všech třech polymerních CSP se separoval analyt **10**, který nejlepších separačních parametrů (R , α , A_s , N) dosáhl na P-CAP-DP CSP v kombinaci s jednoduchou MF tvořenou pouze acetonitrilem. Lepší symetrie píků a vyšší účinnost kolon P-CAP a P-CAP-DP pro separaci tohoto analytu byla pozorována v MF obsahujících HAc, zatímco na DEABV tomu bylo naopak (vyšší N , lepší symetrie v MF bez přídavku HAc). Látky **2** a **7** se separovaly pouze v MF obsahujících směs HAc a TEA. Analyt **2** se separoval na P-CAP a P-CAP-DP, ale vyšší chirální rozlišení bylo pozorováno na prvně jmenované CSP (tab. 14). Analyt **7** se podařilo částečně rozdělit pouze na P-CAP CSP.

Tab. 13: Přehled analytů separovaných na polymerních CSP v normálním módu s uvedenými hodnotami enantiozlišení a selektivity.

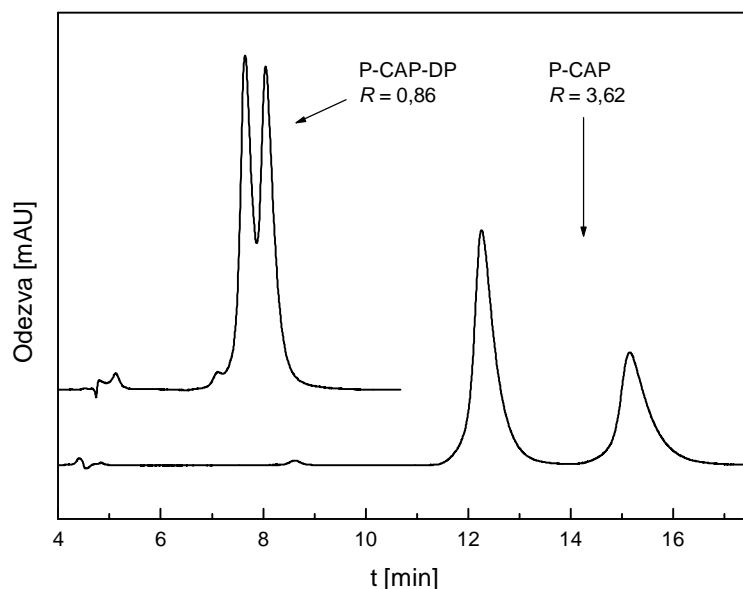
CSP	P- CAP								DEABV					
Analyt	3		7		8		10		8		9		10	
Mobilní fáze (v/v)	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α
HEX/IPA 80/20 (v/v) + 0,1% TFA	1,06	1,13	1,62	1,22	3,66	1,58	1,96	1,35	x	x	x	x	x	x
HEX/IPA 80/20 (v/v)	0,91	1,15	x	x	3,43	1,59	1,97	1,36	x	x	x	x	x	x
HEX/EtOH (v/v)	0,85	1,07	x	x	5,02	1,43	2,28	1,19	x	x	x	x	x	x
HEP/EtOH 80/20 (v/v)	0,75	1,06	x	x	4,22	1,36	2,28	1,18	x	x	x	x	x	x
HEP/IPA 70/30 (v/v) + 0,1% HAc	x	x	x	x	x	x	x	x	0,55	1,09	1,27	1,30	1,01	1,24
HEP/IPA 70/30 (v/v)	x	x	x	x	x	x	x	x	0,53	1,10	1,26	1,29	1,03	1,25

x – analyt buď v dané MF neeluoval, nebo nebyla daná MF testována.

Tab. 14: Analyty separované na polymerních CSP v polárně-organickém separačním módu a zjištěné hodnoty enantiozlišení a selektivity.

CSP	P-CAP										P- CAP - DP						DEABV					
Analyt	2		3		7		8		10		2		8		10		5		9		10	
Mobilní fáze (v/v)	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α	R	α
ACN/MeOH 95/5 (v/v)	x	x	0,54	1,07	x	x	3,64	1,37	1,64	1,18	x	x	x	x	1,47	1,28	0,60	1,08	1,33	1,17	1,40	1,16
ACN	x	x	0,75	1,11	x	x	3,82	1,54	1,29	1,19	x	x	0,78	1,13	2,31	1,37	0,61	1,09	1,40	1,17	1,35	1,17
ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 10 mM HAc	x	x	0,57	1,07	x	x	3,86	1,37	1,88	1,19	x	x	0,49	1,06	1,53	1,27	0,58	1,08	1,27	1,16	1,37	1,16
100% ACN + 10 mM HAc	x	x	1,01	1,12	x	x	4,22	1,57	1,83	1,21	x	x	0,86	1,12	2,30	1,36	0,63	1,11	1,43	1,18	1,31	1,17
ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 10 mM HAc/TEA	1,21	1,20	0,62	1,09	0,66	1,13	3,29	1,34	1,75	1,20	0,62	1,32	x	x	0,72	1,44	x	x	x	x	x	x
ACN/MeOH 95/5 (v/v) + 0,3 M HAc/TEA	1,00	1,20	0,56	1,08	0,64	1,12	3,22	1,35	1,69	1,20	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

x – analyt buď v dané MF neeluoval, neseparoval se nebo nebyla daná MF testována.



Obr. 23: Chromatogramy enantioseparace analytu **8** na

P-CAP CSP v mobilní fázi ACN/MeOH 95/ 5 (v/v) a

P-CAP-DP CSP v mobilní fázi 100% ACN + 10 mM HAc;

průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

V polárně-organickém separačním módu se podařilo rozdělit celkem sedm analytů z deseti, čtyři látky byly rozděleny na základní linii a tři látky se separovaly částečně. Dva analyty, které se nepodařilo rozdělit na P-CAP a P-CAP-DP, se úspěšně dělily na DEABV CSP, což znovu potvrzuje komplementaritu těchto CSP. Na žádné z polymerních kolon se nepodařilo rozdělit látky **1**, **4** a **6**. Tyto látky neobsahují ve svých strukturách žádné skupiny vhodné pro stereoselektivní interakce s danými CSP ani v PO ani v NP módu.

Vyšší hodnoty enantiozlišení a větší počet analytů separovaných na P-CAP v porovnání s ostatními CSP v polárně-organickém módu jsou, stejně jako v normálním módu, pravděpodobně způsobeny lepší dostupností funkčních skupin (karbonylové a amidové) této CSP pro analyty. Struktura P-CAP CSP je „nejjednodušší“ a chirální selektor navázaný na silikagel je v porovnání s dalšími dvěma polymery nejmenší. Struktura P-CAP-DP je podobná P-CAP, ale obsahuje navíc aromatické skupiny schopné tvorby π - π interakcí, které přispívají k retenci, ale ne vždy k chirálnímu rozlišení. Chirální selektor tvořící CSP DEABV je strukturně odlišný od P-CAP a P-CAP-DP, je poměrně prostorově objemný, a

proto pro některé analyty hůře přístupný, pro jiné je naopak vhodnější, jak potvrzuje separace analytů **5** a **9** (tab. 14), které se v PO módu jinde neseparovaly.

4.4. 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 β -cyklodextrinu, hydroxypropylether- β -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. 15, 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. 15: Přehled analytů, které se separovaly na jednotlivých CSP a v daných separačních módech.

Separací mód Stacionární fáze	NP	RP	PO
β-cyklodextrin	žádná separace	1 (0.5) 9 (0.9) 10 (2.2)	-
HP-β-cyklodextrin	žádná separace	1 (0.7) 2 (1.0) 4 (0.2) 8 (0.8) 9 (1.1) 10 (1.9)	-
Celulosa	1 (1.2) 4 (1.9) 9 (4.9) 10 (5.0)	1 (1.8) 2 (0.7) 3 (3.2) 4 (1.2) 7 (6.9) 9 (6.3) 10 (5.9)	-
P-CAP	3 (1.1) 7 (1.6) 8 (5.0) 10 (2.3)	-	2 (1.1) 3 (1.0) 7 (0.6) 8 (4.2) 10 (1.9)
P-CAP-DP	-	-	2 (0.6) 8 (0.9) 10 (2.3)
DEABV	8 (0.6) 9 (1.3) 10 (1.0)	-	5 (0.6) 9 (1.4) 10 (1.4)

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

Literatura

1. C. Perrin, V. A. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, D. L. Massart, Y. Vander Heyden; J. Chromatogr. A 947 (2002) 69-83.
2. C. Yamamoto, Y. Okamoto; Bull. Chem. Soc. Jpn. 77 (2004) 227-257.
3. T. J. Ward, B. A. Baker; Anal. Chem. 80 (2008) 4363-4372.
4. E. Yashima; J. Chromatogr. A 906 (2001) 105-125.
5. E. Yashima, Ch. Yamamoto, Y. Okamoto; J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 4036-4048.
6. K. Tachibana, A. Ohnishi; J. Chromatogr. A 906 (2001) 127-154.
7. Q. Zhong, X. Han, L. He, T. E. Beesley, W. S. Trahanovsky, D. W. Armstrong; J. Chromatogr. A 1066 (2005) 55-70.
8. F. Gasparrini, D. Misiti, R. Rompietti, C. Villani; J. Chromatogr. A 1064 (2005) 25-38.
9. X. Han, J. W. Remsburg, L. He, T. E. Beesley, D. W. Armstrong; Chromatografia 67 (2008) 199-210.
10. F. Gasparrini, D. Misiti, M. Pierini, C. Villani; J. Chromatogr. A 724 (1996) 79-90.
11. F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani; J. Chromatogr. A 906 (2001) 35-50.
12. N. M. Maier, G. Uray; J. Chromatogr. A 740 (1996) 11-19.
13. X. Han, L. He, Q. Zhong, T. E. Beesley, D. W. Armstrong; Chromatographia 63 (2006) 13-23.

5 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 odlišně. Na další polymerní CSP - DEABV – se dělily tři, nikoli však shodně, látky.

Na chirálních stacionárních fází na bázi sacharidů i polymerů se separují pouze zástupci 1,2'-disubstituovaných binaftyků (**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 π - π 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 (π - π).

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.

Příloha 1 Přehled publikací a prezentací

Publikace:

L. Loukotková, E. Tesařová, Z. Bosáková, D. W. Armstrong: *Comparison of enantioseparation of substituted binaphthyls on cyclodextrin-, cellulose- and synthetic polymer-based chiral stationary phases.* J. Sep. Sci. Článek odeslán do tisku

V. Pacáková, L. Loukotková, Z. Bosáková, K. Štulík: *Analysis for estrogens as environmental pollutants – A review.* J. Sep. Sci. 32 (2009) 867-882.

L. Loukotková, Z. Bosáková, E. Tesařová: *Cyclodextrin- and Cellulose-Based Chiral Stationary Phases for Enantioseparation of Series of Substituted Binaphthyls* Chem. Listy (Bulletin) 103 (2009) 327-362.

http://www.chemicke-listy.cz/docs/supplements/2009_04_331_336_s08.pdf

L. Loukotková, M. Rambousková, Z. Bosáková, E. Tesařová: *Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) Based Chiral Stationary Phase as Effective Tools for Enantioselective HPLC Separation of Structurally Different Disubstituted Binaphthyls.* Chirality 20 (2008) 900 – 909.

L. Loukotková, D. Zlesáková, K. Kalíková, E. Tesařová, Z. Bosáková: *Identification and Quantification of Selected Estrogens Using HPLC Method.* Book of Proceedings, 4th International Student Conference, ISBN 978-80-903103-2-2, Praha 2008, 83-88.

L. Loukotková, Z. Bosáková, E. Tesařová: *Study of the Influence of Experimental Conditions on the Retention and Enantioseparation of Series of Newly Synthesized Disubstituted Binaphthyls.* Book of Proceedings, 3rd International Student Conference, ISBN 80-86238-96-2, Praha 2007, 28-39.

*** Publikace tučně vtištěné jsou předmětem diskuse předkládané disertační práce.**

Přednášky:

L. Loukotková: *Cyclodextrin- and Cellulose-Based Chiral Stationary Phases for Enantioseparation of Series of Substituted Binaphthyls*. New molecular systems for advanced environment-friendly applications beneficial for human health; PřF UK Praha, 23. 10. 2008.

L. Loukotková: *Cyklodextrinové a celulosové chirální stacionární fáze pro enantioseparaci substituovaných binaftylů*. 60. jubilejní sjezd Asociace českých a slovenských chemických společností, Olomouc, 1.-5. 9. 2008

přednáška v sekci Soutěž firmy Shimadzu

L. Loukotková: *Identification and Quantification of Selected Estrogens Using HPLC Method*. 4th International Student Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha, 28-29. 1. 2008

L. Loukotková: *Study of the Influence of Experimental Conditions on the Retention and Enantioseparation of Series of Newly Synthesized Disubstituted Binaphthyls*. 3rd International Student Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha, 29.-30. 1. 2007

Plakátová sdělení:

L. Loukotková, Z. Bosáková, E. Tesařová, D. W. Armstrong: *Cyclodextrin-, cellulose- and synthetic polymer-based chiral stationary phases for enantioseparation of substituted binaphthyls*. 21st Symposium on Chirality 2009, Breckenridge, Colorado, USA, 12.-15. 7. 2009

Z. Bosáková, M. Honetschlägerová-Vadinská, E. Tesařová, K. Kalíková, L. Loukotková, J. Vašinová, M. Jursová, K. Dvořáková-Hortová: *Separation and Quantification of Selected Estrogens in Water and Biological Matrix by HPLC*. The 33rd International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Kyoto, Japonsko, 2.-5. 12. 2008

L. Loukotková, M. Rambousková, Z. Bosáková, E. Tesařová: *Study of Enantioseparation Behavior of Disubstituted Binaphthyls on Cellulose Based Chiral Stationary Phase Using HPLC Method*. Advances in Chromatography and Electrophoresis 2007 and Chiranal 2007, Olomouc, 20.-24.6.2007

L. Loukotková, M. Rambousková, Z. Bosáková, E. Tesařová: *Study of enantioseparation behaviour of series of newly synthesized potential asymmetric catalysts using HPLC method.* 13th International Symposium on Separation Sciences, Štrbské pleso, Slovakia, 24.-27.6.2007

L. Loukotková, Z. Bosáková, E. Tesařová: *Cellulose-based CSPs as effective tools for enantioselective separation of structurally different disubstituted binaphthyls.* 19th Symposium on Chirality 2007, San Diego, Kalifornie, USA, 8.-11. 7.2007