

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Enantioseparace substituovaných binaftylů na chirální stacionární fázi
založené na *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) amylosy

Enantioseparation of substituted binaphthyls on CSP based on amylose
tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233148816

Praha 2009

Pavel Repko


Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a za přispění MŠMT v rámci projektu ME 895.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Z. Bosákové, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 27. 5. 2009



.....

podpis

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a konsultantce Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za vytvoření výborných pracovních podmínek, ochotu a cenné rady při řešení této bakalářské práce.

Předmětová hesla:

HPLC, chirální separace

Klíčová slova:

Substituované binaftyly, chirální stacionární fáze, *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát)
amylosy

POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

A	příspěvek vířivé difúze
ACN	acetonitril
α	separační faktor
B	příspěvek podélné molekulární difúze
C_M	odpor proti přenosu hmoty ve mobilní fázi
C_S	odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi
CSP	chirální stacionární fáze
GC	plynová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
H	výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRMS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie
IEC	iontově-výměnná chromatografie
K_D	distribuční konstanta
k	retenční faktor
L	délka kolony
LLC	kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	kapalinová adsorpční chromatografie
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
n	počet teoretických pater
$^1\text{H NMR}$	nukleární magnetická rezonance pro izotop ^1H
$^{13}\text{C NMR}$	nukleární magnetická rezonance pro izotop ^{13}C
R	rozlišení
TLC	tenkovrstvá chromatografie
t_M	mrtvý čas kolony
t'_R	korigovaný retenční čas
t_R	retenční čas analytu
u	lineární průtoková rychlost
V'_R	korigovaný retenční objem
w	šířka píku při základně
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině jeho výšky

OBSAH

1. Úvod	7
2. Teoretická část	8
2.1 Stereoisomery	8
2.2 Enantioseparace metodou HPLC	9
2.3 Chirální stacionární fáze	10
2.4 Deriváty binaftylů	13
2.4.1 Studované deriváty substituovaných binaftylů	14
2.4.1 Strukturní vzorce a názvy studovaných derivátů binaftylů v této bakalářské práci	15
2.4.2 Studované analyty	17
2.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	18
2.5.1 Veličiny charakterizující separaci	20
3. Experimentální část	23
3.1 Chemikálie	23
3.2 Přístroje a pomůcky	24
3.3 Separační podmínky	24
4. Výsledky a diskuse	25
4.1 Separace v mobilní fázi acetonitril/voda	26
4.2 Separace v mobilní fázi acetonitril/20 mM fosfátový pufr o pH 6,0	29
4.3 Separace v mobilní fázi acetonitril/20 mM fosfátový pufr o pH 3,0	32
4.4 Porovnání dosažených výsledků v mobilních fázích ACN/voda a ACN/20 mM fosfátový pufr o pH 6,0 a 3,0	35
5. Závěr	38
Použitá literatura	39

1. ÚVOD

V současnosti je velký zájem o stereoselektivní syntézu, umožňující přípravu opticky čistých nebo obohacených organických sloučenin. Jako vhodnou metodou pro stanovení optické čistoty nově syntetizovaných organických sloučenin se stala vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Syntézu opticky čistých enantiomerů lze uskutečnit dvěma odlišnými způsoby. První způsob spočívá v přípravě racemátu (směsi obsahující ekvivalentní množství molekul obou enantiomerů), který se reakcí s opticky čistou látkou převede na stabilní diastereoisomerní páry, které lze rozdělit achirální kapalinovou chromatografií, nebo s využitím preparativních metod, např. destilace, krystalizace. Nevýhodou takového způsobu přípravy je nutná pozdější izolace jednotlivých enantiomerů z diastereoisomerů. Druhý, v současné době častěji využívaný způsob přípravy, spočívá v přímé syntéze enantiomerů za použití opticky aktivních katalyzátorů a označuje se jako asymetrická syntéza. Opticky aktivní katalyzátory (chirální ligandy) musí pro úspěšnou syntézu chirálního produktu splňovat dvě základní podmínky. Musí mít stabilní konfiguraci (musí být odolné vůči racemizaci) a vysokou optickou čistotu.

Deriváty 1,1'-binaftylu se jako jedny z prvních začaly využívat jako asymetrické katalyzátory pro kontrolu mnoha asymetrických procesů. Vyznačují se výjimečnými chirálními rozlišovacími vlastnostmi, které jsou vyvolány jejich stabilitou, chiralitou a prostorovým uspořádáním.¹

Cílem této práce bylo nalézt metodou HPLC vhodné separační podmínky pro enantioseparaci 2,2'-disubstituovaných nebo 3,2,2'-trisubstituovaných 1,1'-binaftylů a 8,3'-disubstituovaného 1,2'-binaftylu s využitím chirální stacionární fáze založené na bázi *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) amylosy.

2. Teoretická část

2.1 Stereoisomery

Stereoisomery (prostorové isomery) jsou sloučeniny složené ze stejného počtu a typu atomů, mají tedy stejnou strukturu, liší se ale trojrozměrným uspořádáním atomů a vazeb v prostoru. Lze je rozdělit do dvou základních druhů podle toho, zda jsou opticky aktivní či nikoliv. Je-li stereoisomer opticky aktivní, stáčí rovinu polarizovaného světla o určitý měřitelný úhel α doleva (–) či doprava (+) a patří do skupiny optických isomerů, kterou tvoří zejména enantiomery a diastereoisomery. Pokud tuto vlastnost nevykazuje patří do kategorie geometrických isomerů, kam lze zařadit isomerii *cis-trans* nebo *meso*-diastereoisomery.²

Za chirální sloučeninu lze označit tu, jejíž molekuly jsou chirální, nejsou tedy totožné se svými zrcadlovými obrazy. Nutnou podmínkou pro chiralitu molekuly je absence prvků symetrie v molekule a to: středu a roviny symetrie či rotačně reflexní osy symetrie. Jestliže je nějaký z těchto prvků přítomen, je molekula symetrická a tím i achirální.

Chiralita molekul je nejčastěji vyvolána přítomností jednoho či více tzv. stereogenních center (centra chiralit). Stereogenním centrem bývá nejčastěji atom uhlíku nesoucí čtyři různé substituenty, mohou to být ale i jiné atomy např. křemík, dusík, fosfor nebo síra. Chiralita nemusí být vždy vyvolána přítomností asymetricky substituovaného atomu. Rozlišujeme dále např. axiální chiralitu u disubstituovaných bifenyly či binaftylů, způsobenou omezenou rotací atomů kolem jednoduchých vazeb tzv. atropisomerismus.^{3,4}

Dvě chirální molekuly, které jsou vzájemnými zrcadlovými obrazy a nelze je ztotožnit se označují jako enantiomery. Mají stejné fyzikální i chemické vlastnosti např. teplotu tání, rozpustnost, hustotu aj. Vzájemně se liší absolutní konfigurací atomů na stereogenním centru a směrem otáčení roviny polarizovaného světla, tedy znaménkem optické otáčivosti, nikoliv hodnotou. Enantiomery v ekvimolárním zastoupení (poměru 1:1) vytvářejí směs zvanou racemát, která je opticky inaktivní, protože optické otáčivosti jednotlivých forem enantiomerů se vzájemně vyruší.

Stereoisomerní molekuly, které nejsou vzájemnými zrcadlovými obrazy a nelze je ztotožnit se nazývají diastereoisomery. Tyto molekuly obsahují více než jedno stereogenní centrum. Na rozdíl od enantiomerů mají opačnou konfiguraci pouze na některých stereogenních centrech a mají již odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti a liší se i hodnotou optické otáčivosti.

Diastereoisomery typu *meso* obsahují sice více než jedno chirální centrum, přesto jsou achirální, protože molekuly mají rovinu symetrie.⁴

2.2 Enantioseparace metodou HPLC

Při běžné syntéze chirálních sloučenin vzniká obvykle racemát. Separace racemátu v jednotlivé enantiomery (chirální separace) patří k obtížným úkolům, protože v běžném achirálním prostředí se enantiomery chovají stejně a nelze je od sebe odlišit. K separaci je proto nutné zajistit, aby interagovaly s chirálním prostředím.

Chirální separaci v HPLC lze uskutečnit přímým či nepřímým způsobem. Při nepřímé metodě je analyt před vlastní separací derivatizován opticky čistým činidlem tj. pouze jednou formou enantiomeru za tvorby stabilního diastereoisomerního páru, který se díky odlišným fyzikálně-chemickým vlastnostem dá separovat v již nechirálním prostředí za použití achirální stacionární fáze. Na úspěšné oddělení diastereoisomerů má vliv řada faktorů. Nejdůležitější je znalost enantiomerní čistoty derivatizačního činidla, dále je nutné, aby derivatizační reakce proběhla zcela (nesmí dojít k racemizaci či epimerizaci) a vzdálenost chirálních center ve vzniklém diastereoisomerním derivátu by měla být co nejmenší.

Přímá metoda nevyžaduje žádnou předkolonovou chirální derivatizaci. Enantioseparace probíhá buď na chirální stacionární fázi (CSP) s nechirální mobilní fází nebo v systému s nechirální stacionární fází s chirální mobilní fází. Chiralita stacionární a mobilní fáze je způsobena přítomností opticky čisté látky tzv. chirálního selektoru v separačním prostředí. Tento selektor může být přidán do mobilní fáze pouze jako aditivum nebo jej lze navázat na inertní nosič (nejčastěji silikagel) a vytvořit tak chirální stacionární fázi. Při interakci obou enantiomerů racemátu s chirálním selektorem dochází ke tvorbě dvou nestabilních (přechodných) diastereoisomerních komplexů o příslušných konstantách stability. Jestliže jsou tyto konstanty dostatečně rozdílné, může být jeden z enantiomerů zadržován na koloně více a docházet tak k jejich vzájemnému oddělení. V praxi se mnohem častěji využívá systém s CSP než s chirální mobilní fází.²

Enantioselektivní rozpoznávání je popsáno teorií tzv. třibodové interakce, kterou navrhl Dalglish. Platí pro separaci jak v kapalinové, tak i v plynové chromatografii. Podle této teorie musí pro úspěšnou enantioseparaci probíhat mezi enantiomerem a chirálním selektorem současně tři (různé) interakce, přičemž minimálně jedna z nich je ovlivnitelná

prostorovým uspořádáním atomů, tj. má stereoselektivní charakter. Tím může být u jednoho z enantiomerů určitá interakce upřednostněna. Interakce, které se podílejí na chirálním rozlišení mají charakter přitažlivých, odpudivých i repulsních sil. Patří mezi ně vodíková vazba, interakce elektrostatické, hydrofobní i přenosu náboje, sterické stínění a dipól-dipól přitažlivé a odpudivé síly.^{2,5}

2.3 Chirální stacionární fáze

K chirálnímu rozlišení různých racemátů lze využít nejen chromatografické techniky např. HPLC, GC, TLC, ale i elektromigrační metody jako je kapilární elektroforéza, v principu dosahující dokonce vyšších účinností než kapalinová chromatografie. I přes tuto skutečnost se HPLC v posledních dvou desetiletích stala nejčastěji používanou metodou užívanou pro chirální separace. Jak již bylo uvedeno dříve, při přímé chirální separaci se mnohem častěji využívá chromatografický systém s chirální stacionární fází než s přidaným chirálním selektorem do mobilní fáze. Rozvoj aplikací kapalinové chromatografie v oblasti enantiomerního rozpoznávání vedl k vyvinutí mnoha chirálních stacionárních fází.² K nejrozšířenějším dnes patří CSP využívající jako chirální selektory derivatizované polysacharidy, makrocyclická antibiotika, cyklodextriny a jejich deriváty a proteiny. Obecné požadavky na tyto fáze jsou, aby umožňovaly dělit co nejširší okruh chirálních sloučenin a mohly být reverzibilně používány v různých separačních módech. Pro preparativní účely, dělení pouze určité dvojce enantiomerů nebo omezené skupiny chirálních látek, byly vyvinuty i tzv. na míru šité CSP (tailor-made CSP).⁵

CSP na bázi polysacharidů

Polysacharidy jsou přírodní polymery obsahující asymetrické struktury, které vyvolávají jejich optickou aktivitu a chiralitu. Díky těmto vlastnostem vytvářejí vhodné enantioselektivní prostředí, nezbytné pro separaci chirálních sloučenin. Polysacharidové CSP jsou v dnešní době velmi populární. Uvádí se, že na polysacharidových CSP lze rozdělit až 80 % všech chirálních sloučenin s dobře reprodukovatelnými výsledky.⁶⁻¹² Byla testována celá řada polysacharidů jako chirálních selektorů. Nejlepší rozpoznávací schopnosti vykazují celulóza a amyloza. Dlouhý polymerní řetězec celulózy je tvořen minimálně 1 500 D-(+) glukosovými jednotkami vázanými β -1,4 glykosidovou vazbou. Oproti tomu polymerní řetězec amylosy se skládá pouze z několika set D-(+) glukosových jednotek spojených α -1,4 glykosidovou vazbou. Celulóza a amyloza jako chirální selektory mají samy o sobě nízké rozlišovací schopnosti, proto byly tyto polymery derivatizovány.

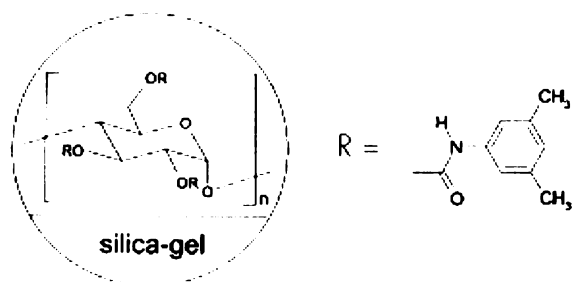
Z přírodní celulosy lze kyselou hydrolyzou připravit odolnější tzv. mikrokrytalickou celulosu jejíž polymerizační stupeň je nižší, okolo 200 – 300 glukosových jednotek. Modifikací volných hydroxylových skupin lze získat řadu derivátů amylosy i celulosy např. acetáty, karbamáty estery či nitráty.²

V současnosti existuje okolo dvaceti komerčně dostupných CSP založených na bázi derivatizované celulosy a amylosy. K nejčastěji používaným patří triacetát-, substituovaný tribenzoát- a *tris*(karbamát). Ze všech derivátů se nejvíce osvědčil *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulosy a amylosy. Chirální stacionární fáze na bázi polysacharidů se vzájemně liší podle způsobu navázání derivátů polysacharidů na nosič, nejčastěji silikagel. K dispozici jsou pokryté, tzv. „coated“ CSP, ve kterých je silikagel pokryt chirálním selektorem, a tzv. „immobilized“ CSP s chemicky navázaným chirálním selektorem na nosiči.¹³ Při přípravě pokrytých CSP se využívá rozpustnosti derivátů v polárních rozpouštědlech např. v chloroformu, tetrachlormethanu, acetonu, tetrahydrofuranu a jejich následné adsorpce na povrch silikagelu. Z tohoto důvodu vyplývá značné omezení v použití zmíněných rozpouštědel jako modifikátorů mobilních fází, protože jinak by docházelo k rozpouštění CSP či jinému znehodnocení navázaného chirálního selektoru. Ve srovnání s pokrytými CSP jsou imobilizované CSP stabilnější, a tak použitelnější v širším rozsahu organických rozpouštědel, nevýhodou je ale menší enantiosektivita.^{14,15} CSP založené na bázi derivatizovaných polysacharidů lze použít pro separaci neutrálních, kyselých i bazických analytů. Mechanismus chirálního rozpoznávání na těchto fázích není ještě zcela objasněn. Předpokládá se, že enantiomery analytů při dělení podléhají inkluzy (fitu) do dobře definovaných chirálních dutin (kavit), vytvářených v případě amylosy šroubovicovou strukturou řetězců. Celulosa má vlivem podstatně lineárnějšího a rigidnějšího tvaru řetězců kavity stéricky lépe přístupné, tudíž dostupné pro širší okruh analytů než amylosa, avšak obecně s nižší rozlišovací schopností. Amylosa proto vytváří specifitější chirální prostředí s obecně vyšší stereodiskriminací.¹⁶ Zmíněná inkluze může být stabilizována tvorbou vodíkových vazeb či interakcemi dipól-indukovaný dipól mezi elektronegativními atomy (kyslík, dusík nebo halogen) v polysacharidových derivátech a příslušnými atomy nebo skupinami přítomnými v enantiomerech. Jestliže je dělený racemát aromatické povahy, mohou se mezi fenylovými kruhy CSP a analytu objevit i π - π interakce. Pro úspěšné rozlišení enantiomerů je nutný odlišný stereogenně závislý fit do kavit CSP, který je stabilizovaný již zmíněnými vodíkovými vazbami, π - π interakcemi, interakcemi dipól-indukovaný dipól, mohou se projevit i slabé van der Waalovy síly či iontová vazba. Čím vyšší je vzájemný rozdíl

interakčních energií mezi oběma enantiomery a CSP, tím snadněji nastává rozlišení enantiomerů.¹⁷

Polysacharidové CSP lze použít pro separace jak v normální/separační módu, kdy nepolární mobilní fázi tvoří alkan (*n*-pentan, *n*-hexan) s malými přídávky polárnějšího rozpouštědla (propan-2-ol, ethanol), tak i v reverzním módu s mobilní fází obsahující směs organického modifikátoru (ACN, MeOH) s vodou či vodným roztokem pufru. Imobilizovanou CSP lze použít reverzibilně pro oba separační módy, zatímco v případě pokrytých verzí je nutné použít pro daný mód určenou CSP.

V této práci byla použita pokrytá verze CSP určená pro reverzní mód, obsahující silikagelový nosič pokrytý chirálním selektorem *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátem) amylosy (viz obr. 1).



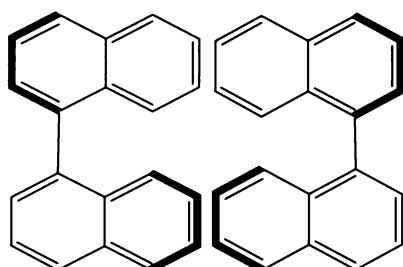
Obr. 1: Struktura *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) amylosy

2.4 Deriváty binaftylů

V posledních dvou desetiletích nabývala asymetrická syntéza, zprostředkovávaná přítomností asymetrických ligandů v reakční směsi, na významu, jak stoupal zájem o přímou syntézu chirálních sloučenin. Jednou z nejvýznamnějších skupin asymetrických ligandů se staly zejména binaftylové deriváty resp. 2,2'-disubstituované 1,1'-binaftily, kvůli jejich stabilní konfiguraci, axiální chiralitě a dobrým chemickým vlastnostem. V dnešní době se mnoho vědeckých prací věnuje přípravě, studiu vlastností a použitelnosti 2,2'-disubstituovaných 1,1'-binaftylů. Různě disubstituované deriváty binaftylů lze využít jako asymetrické katalyzátory a pomocné látky při stereoselektivní syntéze nebo k přípravě CSP pro kapalinovou chromatografii či chirálních materiálů s nelineárními optickými vlastnostmi.¹⁸

Struktura

Dva naftily spojené jednoduchou vazbou na C_1 a C_1' tvoří základní skelet 1,1'-binaftylu. Axiální chiralita této molekuly je vyvolána omezenou rotací naftylových zbytků kolem vazby $C_1 - C_1'$ (obr. 2). Deriváty 1,1'-binaftylu vykazující rovněž axiální chiralitu mají navázané různé druhy substituentů zejména v 2,2'-, 2,8'- a 8,8'- polohách. Existují symetrické deriváty, které mají shodné substituenty ve stejných polohách, a nesymetrické, obsahující ve stejných či rozdílných polohách různé substituenty. Velikost bránění rotace je ze stérického důvodu ovlivněna objemností a polohou substituentů. K tomu, aby enantiomery byly konfiguračně stabilní, je nutné, aby energetická bariéra vnitřní rotace kolem vazby byla dostatečně vysoká. To nastává, jestliže jsou v polohách 2,2'- přítomny dostatečně objemné substituenty.³ Jsou-li enantiomery konfiguračně nestabilní, dochází k nevratné přeměně jednoho enantiomeru ve druhý (k tzv. interkonverzi), což vede až ke vzniku racemátu.



Obr. 2: Enantiomery 1,1'-binaftylu

2.4.1 Studované deriváty substituovaných binaftylů

Všechny 2,2'-disubstituované nebo 3,2,2'-trisubstituované 1,1'-binaftyly a 8,3'-disubstituovaný 1,2'-binaftyl, které jsou studované v této bakalářské práci (viz kap. 2.4.1.1), byly syntetizovány na Katedře organické chemie ~~za~~ za účelem přípravy nových ~~//~~ potenciálních katalyzátorů asymetrických reakcí. Vzorky 4, 5 a 6 obsahují v poloze 3 další substituent, ostatní vzorky mají v polohách 2- a 2'- navázány různě objemné substituenty. Syntéza substituovaných binaftylových derivátů nejčastěji vychází z BINOLu. Ten byl poprvé připraven jako racemát v roce 1873, později jako opticky čistá látka, jejíž absolutní konfigurace byla určena roku 1971.¹⁹

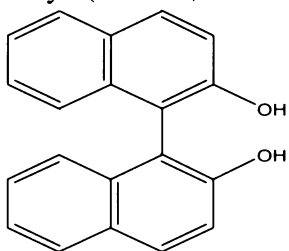
Hlavním krokem při přípravě BINOLu je oxidativní kopulace 2-naftolu pomocí železitých²⁰ nebo manganitých²¹ solí či komplexů měďnatých solí s aminy.²² Oxidační kopulace může být provedena dvěma způsoby – buď asymetricky (užitím komplexu Cu^{2+} s chirálním aminem²³) nebo přípravou racemického BINOLu a jeho následným rozdělením na enantiomery pomocí *N*-benzylcinchonidiniumchloridu²⁴ nebo (*R*)-1-fenylethylaminu.²⁵ Opticky aktivní BINOL slouží jako prekursor hydridového činidla, které se používá k asymetrickým redukcím.

Jediný zástupce 8,3'-disubstituovaného 1,2'-binaftylu, konkrétně 8-acetylamino-3'-methoxy-1,2'-binaftyl vznikl při syntéze aminoderivátů BINOLu jako vedlejší produkt reakce.²⁶

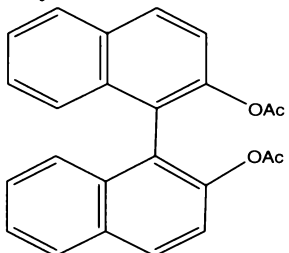
** celý materiál katedry!*

2.4.1.1 Strukturní vzorce a názvy studovaných derivátů binaftylů v této bakalářské práci

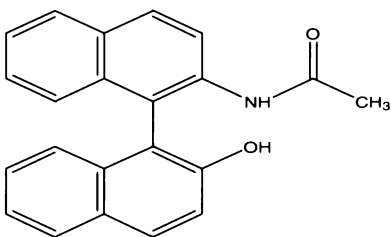
Vzorek 1: 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl (BINOL, BINAFTOL)



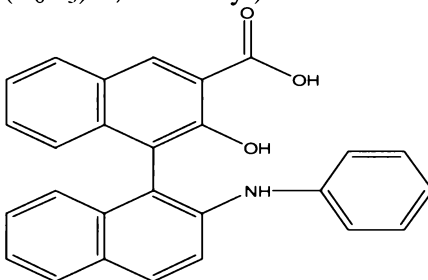
Vzorek 2: 2,2'-diacetoxy-1,1'-binaftyl (OBIN diAc)



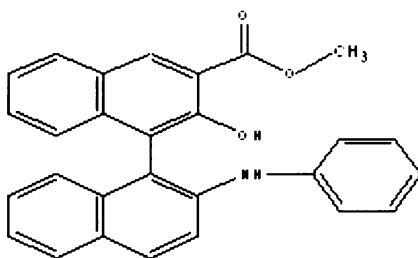
Vzorek 3: 2-acetylamid-2'-hydroxy-1,1'-binaftyl (2-NHAc-2'-OH-1,1'-binaftyl)



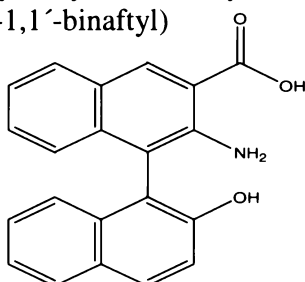
Vzorek 4: 3-karboxy-2-hydroxy-2'-fenylamin-1,1'-binaftyl
(3-COOH-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl)



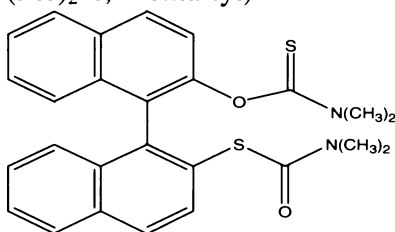
Vzorek 5: 3-methoxykarbonyl-2-hydroxy-2'-fenylamin-1,1'-binaftyl
(3-COOMe-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl)



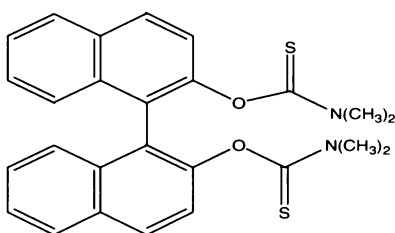
Vzorek 6: 3-karboxy-2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaftyl
(3-COOH-2-NH₂-2'-OH-1,1'-binaftyl)



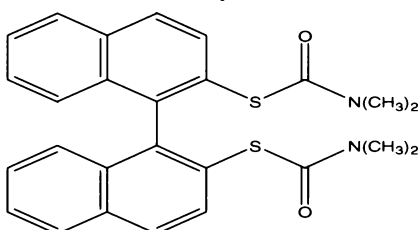
Vzorek 7: 2-(N,N-dimethylthiokarbamoyloxy)-2'-(N,N-dimethylkarbamoylthio)1,1'-
-binaftyl
(2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl)



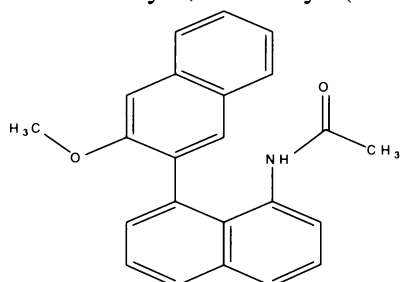
Vzorek 8: 2,2'-bis(N,N-dimethylthiokarbamoyloxy)-1,1'-binaftyl
(2-OCSN(Me)₂-2'-OCSN(Me)₂-1,1'-binaftyl)



Vzorek 9: 2,2'-bis(N,N-dimethylkarbamoylthio)-1,1'-binaftyl
(2-SCON(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl)



Vzorek 10: 8-acetylamino-3'-methoxy-1,2'-binaftyl (8-NHAc-3'-OMe-1,2'-binaftyl)



2.4.2 Studované analyty

Většina publikovaných prací o binaftylech jako chirálních ligandech se zabývá jejich syntézou. K separaci různě disubstituovaných 1,1'-binaftylů byla převážně použita metoda HPLC, kterou lze také využít v některých případech ke kontrole enantiomerní čistoty nebo výnosu konečného produktu asymetrické reakce.

K enantioseparaci byl nejčastěji využit systém tvořený CSP založenými na derivátech celulosy a amylosy v normálním separačním módu. K separaci enantiomerů 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftylu (vzorek 1) byla použita amylosa jako základ CSP a čistý methanol jako mobilní fáze⁹ nebo směs *n*-hexan/propan-1-ol 90/10 (v/v)²⁷, dále celulosa jako základ CSP a *n*-hexan/butanol 90/10 (v/v) jako mobilní fáze²⁸ a CSP založená na *tris*(5-fluor-2-methylfenylkarbamátu) celulosy s mobilní fází *n*-hexan/propan-2-ol 90/10 (v/v).¹² V separacích byl sledován vliv obsahu organického modifikátoru na hodnoty retenčních faktorů, enantiorozlišení a enantioselektivity.

K separaci enantiomerů 2,2'-diacetoxy-1,1'-binaftylu (vzorek 2) byly použity CSP založené na derivátech celulosy i amylosy v mobilních fázích složených z 1–5 % propan-2-olu (v) v *n*-hexanu.^{29–31}

Deriváty 2-(*N,N*-dimethylthiokarbamoyloxy)-2'-(*N,N*-dimethylkarbamoylthio)1,1'-binaftyl (vzorek 7) a 2,2'-*bis*(*N,N*-dimethylthiokarbamoyloxy)-1,1'-binaftyl (vzorek 8) byly enantioseparovány v mobilní fází *n*-hexan/ethanol 90/10 (v/v) na CSP založené na derivátech celulosy nebo amylosy.³²

Derivát OBIN, jeho etherový a esterový derivát a dibrom-substituovaný analog byly studovány na CSP založené na *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulosy v normálním separačním módu.³³

2.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) má v současnosti mezi analytickými separačními metodami významné postavení. Vyvinula se z plynové chromatografie. Z důvodu rychlého rozvoje v instrumentaci patří dnes k nejrozšířenějším a nejužitečnějším chromatografickým metodám. Umožňuje dělit, stanovit i analyzovat velmi složité směsi látek o nízkých koncentracích, které nelze nebo pouze s obtížemi lze analyzovat plynovou chromatografií.

Vlivem různých fyzikálně-chemických interakcí dochází při chromatografickém procesu k dělení (separaci) složek vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze tzv. fází mobilní (eluent) a fází stacionární (sorbet). Mezi těmito fázemi a dělenými látkami (soluty) probíhá opakované ustavování rozdělovacích rovnováh. Díky tomu lze rozdělení analytu mezi obě fáze popsat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D , která charakterizuje míru interakce analytu se stacionární fází. Ta závisí jak na vlastnostech analytu, tak i na vlastnostech mobilní a stacionární fáze. K_D je vyjádřena vztahem:

$$K_D = [X]_s / [X]_m, \quad (1)$$

kde $[X]_s$ je rovnovážná koncentrace složky ve stacionární fázi a $[X]_m$ je rovnovážná koncentrace složky v mobilní fázi.

Čím vyšší je hodnota K_D , tím delší dobu se analyt zdrží v separačním prostoru.³⁴

Podle převládajícího mechanismu separace lze kapalinovou chromatografií rozdělit do několika následujících typů: kapalinovou adsorpční chromatografií (LSC), kapalinovou rozdělovací chromatografií (LLC), iontově-výměnnou chromatografií (IEC), gelovou permeační chromatografií (GPC) a afinitní chromatografií.

Dalším způsobem jak lze rozdělit kapalinovou chromatografií je podle vzájemné polaritě stacionární a mobilní fáze. Rozlišujeme chromatografií s normálními a reverzními fázemi. Separační systém s normálními fázemi je tvořen polární stacionární fází, většinou reprezentovanou silikagelem či oxidem hlinitým, a nepolární mobilní fází tvořenou nejčastěji uhlovodíkem např. pentanem, hexanem aj. V tomto uspořádání eluují z kolony nepolární látky dříve než látky polární. V separačním módu s reverzními fázemi je tomu naopak. Stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze polární. Stacionární fází tvoří anorganický nosič (nejběžněji používaným je silikagel), na kterém jsou chemicky navázané různé funkční skupiny (většinou nepolární uhlovodíkové řetězce oktadecylové či oktylové). Výsledná polarita stacionární fáze je určena typem navázaných funkčních

skupin, mohou to být např. středně polární fenyl či amino skupina. Navázáním různých chirálních selektorů na nosič lze připravit chirální stacionární fáze vhodné pro separaci opticky aktivních látek. Díky schopnosti chemicky vázaných fází interagovat s velkým množstvím látek, patří dnes k nejpoužívanějším stacionárním fázím v HPLC. Tvoří téměř 80 % všech aplikací ve vysokoučinné kapalinové chromatografii.¹

Silikagel jako anorganický nosič má řadu výhod, ale i nevýhod, proto se používají jako nosiče i různé organické polymery a jiné anorganické oxidy např. oxid zirkoničitý. Hlavní výhodou silikagelu je dobře definovaný povrch, regulovatelná porozita a tím i dostatečně vysoký specifický povrch aj. Jednou z nejdůležitějších nevýhod je jeho omezená stabilita v prostředí o vyšších hodnotách pH. Doporučený rozsah použitelných hodnot pH pro modifikované silikagelové stacionární fáze je 3 – 7. Při vyšších hodnotách pH může docházet k rozpouštění vlastního silikagelu, při nižších hodnotách může dojít v důsledku kyselé hydrolyzy k odštěpení navázaných ligandů a ke ztrátě dělicí schopnosti. Další nevýhodou (zejména při separaci bázičkových látek) mohou být nezreagované (chemicky nemodifikované) hydroxylové tzn. silanolové skupiny. Ty mohou interagovat s vhodnými analyty tzv. silanofilními interakcemi, jejichž podstatou jsou polární interakce. U moderních stacionárních fází využívajících silikagelový nosič dochází po vlastní chemické modifikaci příslušným organosilanem k dodatečné deaktivaci povrchu silikagelu (tzv. endcapping) např. trimethylchlorsilanem.

Retenční mechanismus na reverzních fázích je značně složitý. Po nadávkování vzorku ve formě úzké ohraničené zóny do protékající mobilní fáze dochází k interakcím, které mají na mechanismus separace rozhodující vliv. Nejdůležitější z nich je interakce molekul analytu s mobilní fází, dále to jsou vzájemné interakce mezi mobilní a stacionární fází a v neposlední řadě i distribuce analytu mezi mobilní a stacionární fází. Výsledkem všech těchto interakcí je vzájemná separace analytů a vytvoření jejich jednotlivých zón, které se při postupu kolonou rozšiřují.²

Složení mobilní fáze, typ stacionární fáze, teplota a průtok mobilní fáze ovlivňují průběh separace. Složení mobilní fáze lze měnit: obsahem a typem použitého organického rozpouštědla, který má významný vliv na retenci, použitým pufrům a jeho koncentrací a hodnotou pH, popřípadě přidávkem iontově-párových činidel či teplotou aj. Separaci lze uskutečnit dvěma způsoby: izokraticky nebo gradientově. Při izokratické eluci je v průběhu analýzy složení mobilní fáze neměnné. Naopak při gradientové eluci lze složení měnit zvyšováním obsahu organického rozpouštědla, a tak ovlivňovat eluční sílu mobilní fáze. Tím se může zkrátit nebo prodloužit doba analýzy a ovlivnit tak i citlivost detekce.

V HPLC jsou nečastěji používanými kolonami kolony náplňové. Účinnost těchto kolon závisí na délce, která se pohybuje od 5 do 25 cm, velikosti a uspořádání částic tvořící stacionární fázi. K dosažení vysokých účinností je zapotřebí vysokých tlaků (řádově MPa) a stacionárních fází obsahujících velmi malé částice kulovitého tvaru o stejném průměru (3 – 10 μm). Částice homogenně vyplňují kolonu, čímž je zajištěn velký povrch stacionární fáze.

K detekci analytů na výstupu z kolony slouží citlivé detektory. Nejčastěji využívaným je absorpční fotometrický detektor, pracující v ultrafialové a viditelné oblasti, dále fluorimetrický, refraktometrický nebo elektrochemický detektor. V posledních letech se k vysoce citlivé detekci používá hmotnostní spektrometrie.

2.6.1 Veličiny charakterizující separaci

Blíží-li se chromatografický systém při distribuci analytu mezi mobilní a stacionární fází rovnováze, lze tento děj popsat distribuční konstantou K_D . Analyty s rozdílnými hodnotami K_D se budou při postupu kolonou vzájemně dělit a vytvářet tak jednotlivé oddělené zóny (eluční křivky) charakterizující koncentrační profil analytu. Tyto zóny dospějí do detektoru v různých **retenční (elučních) časech** t_R . Retenční čas charakterizuje dobu, kterou analyt stráví v koloně. Je to doba od nástřiku vzorku do průchodu maximální koncentrace analytu detektorem, tedy do maxima jeho eluční křivky.³⁴

K vyjádření doby, kterou analyt stráví pouze ve stacionární fázi slouží **korigovaný retenční (eluční) čas** t'_R , definovaný vztahem:

$$t'_R = t_R - t_M, \quad (2)$$

kde t_M je mrtvý čas kolony, tedy retenční čas složky vzorku, která není na koloně zadržována a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

Podobným vztahem je definován i korigovaný retenční objem V'_R . Mezi výhody korigovaných hodnot patří jejich nezávislost na délce kolony a to, že přesněji charakterizují osud analytu v koloně.

Pro nejobecnější vyjádření retence analytu slouží **retenční faktor** k , který se využívá k porovnání různých retenčních časů solutů a podobně jako K_D charakterizuje míru interakce se stacionární fází. Je dán vztahem:

$$k = (t_R - t_M) / t_M, \quad (3)$$

kde t_R je retenční čas analytu a t_M mrtvý čas kolony.

Eluční křivka je v ideálním případě symetrická a pík má Gaussovský tvar. Tvar píku popisují dvě charakteristické veličiny, **šířka píku** w a **výška píku** h . Šířku píku lze odečíst na základní linii, kde je vymezena dvěma tečnami vedenými ve vzestupné a sestupné části píku nebo v polovině jeho výšky či mezi jeho inflexními body. Vzdálenost mezi základní linií a maximem píku určuje výšku píku.

Rozlišení $R_{1,2}$ dvou sousedních píků je dáno vztahem:

$$R_{1,2} = 2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1}) / (w_1 + w_2), \quad (4)$$

kde $t_{R,2}$ a t_2 je retenční čas a šířka píku při základně později eluující složky, $t_{R,1}$ a w_1 charakterizují dříve eluující složku. Za dostatečnou hodnotu rozlišení je považována $R_{1,2} = 1$ s 2 % překrytím ploch sousedních píků. Je-li $R_{1,2} \geq 1,5$ jsou píky odděleny na základní linii.

Separční faktor $\alpha_{1,2}$ určuje selektivitu chromatografického systému k separovaným látkám. Je dán vztahem:

$$\alpha_{1,2} = k_2 / k_1, \quad (5)$$

kde k_1 je retenční faktor dříve eluujícího analytu, k_2 později eluujícího analytu. S rostoucí hodnotou $\alpha_{1,2}$ roste vzájemná vzdálenost těžišť elučních křivek, a tím je vyšší i selektivita systému. Je-li $\alpha_{1,2} = 1$ látky se vzájemně neseparují.

Účinnost chromatografické kolony určuje s jakou mírou dochází k rozmývání zón separovaných látek v koloně. Je vyjádřena **počtem teoretických pater kolony** n :

$$n = 5,545 \cdot (t_R / w_{1/2}), \quad (6)$$

kde t_R je retenční čas látky, $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině výšky.

Teoretické patro je pomyslný délkový úsek kolony, ve kterém dochází k opětovnému ustavování rovnováhy mezi látkou a stacionární a mobilní fází. S rostoucím počtem teoretických pater roste účinnost kolony a tím kolona poskytuje užší a vyšší píky.²

Výškový ekvivalent teoretického patra H slouží k porovnání účinnosti kolon o různých délkách. Je dán vztahem:

$$H = L / n, \quad (7)$$

kde L je délka kolony, n počet teoretických pater.

S klesající hodnotou H roste účinnost kolony a tím dochází k pomalejšímu rozmývání zón separovaných látek. Příčiny rozmývání zón separovaných látek během postupu kolonou vysvětluje dynamická van Deemterova teorie, podle níž rozšiřování zóny způsobují tyto teoreticky na sobě nezávislé procesy:

A - vířivá difúze

B - podélná molekulární difúze

C_S - odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi

C_M - odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi

Výškový ekvivalent teoretického patra H je dán součtem příspěvků jednotlivých procesů k rozšiřování zóny. Závislost H na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze u je vyjádřena **van Deemterovou rovnicí**, jejíž obecný vztah má tvar:

$$H = A + B / u + (C_S + C_M) \cdot u, \quad (8)$$

Grafická závislost H na lineární rychlosti u je hyperbola jejíž minimum odpovídá optimální průtokové rychlosti mobilní fáze při, které dosahuje kolona nejvyšší účinnosti.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- acetonitril R CHROMASOLV pro kapalinovou chromatografii, čistota 99,8 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyselina fosforečná H_3PO_4 , čistota 85,0 % (Lach-ner, Neratovice, ČR)
- dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, čistota 99,0 % (Penta, Chrudim, ČR)
- hydroxid sodný NaOH, čistota 89,0 % (Lach-ner, Neratovice, ČR)
- analyty:
 - 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl
 - 2,2'-diacetoxy-1,1'-binaftyl
 - 2-acetylamid-2'-hydroxy-1,1'-binaftyl
 - 3-karboxy-2-hydroxy-2'-fenylamin-1,1'-binaftyl
 - 3-metoxykarbonyl-2-hydroxy-2'-fenylamin-1,1'-binaftyl
 - 3-karboxy-2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaftyl
 - 2-(N,N-dimethylthiokarbamoyloxy)-2'-(N,N-dimethylkarbamoylthio)1,1'-binaftyl
 - 2,2'-bis(N,N-dimethylthiokarbamoyloxy)-1,1'-binaftyl
 - 2,2'-bis(N,N-dimethylkarbamoylthio)-1,1'-binaftyl
 - 8-acetylamino-3'-methoxy-1,2'-binaftyl

Všechny analyty byly syntetizovány na ^{a facu in chemie} Katedře organické chemie PřF UK. Pro potvrzení jejich struktury byla využita nukleární magnetická rezonance: 1H NMR, ^{13}C NMR, MS, HRMS a spektrofotometrie v UV oblasti.³⁵ Veškeré studované sloučeniny byly připraveny ve formě racemátu, kromě BINOLu. Pro jeho analýzu byly smíchány enantiomery S(-) a R-(+) v poměru 1:1.

100% masin kaready

3.2 Přístroje a pomůcky

Měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu, jehož součástí byla pumpa modelu PU 4015, UV-VIS detektor typu UV PU 4020 (Pye Unicam, Cambridge, UK) a dávkovací ventil Rheodyne 7725i (Cotati, CA, USA) s dávkovací smyčkou o objemu 20 μ l. Ke sběru dat a jejich vyhodnocení byl použit program CSW 32 (DataApex, Praha, ČR). K chirální separaci byla použita komerčně dostupná kolona Chiralpak AD-RH (Chiral Technologies, Illkirch, Francie) o rozměrech 150 x 4,6 mm I.D. určená pro reverzní mód, obsahující silikagelový nosič pokrytý chirálním selektorem *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátem) amylosy, velikost částic 5 μ m. K odplynění mobilních fází byla využita ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC30H (Elma, Praha, ČR). Hodnota pH pufrů byla regulována ~~pH~~-metrem modelu 3510 (Jenway, Anglie). Vzorky byly dávkovány skleněnou stříkačkou Hamilton (Reno, Nevada, USA) o objemu 25 μ l.

chybí H₂O systém - Millipore pro amonizovanou H₂O

3.3 Separční podmínky

K separaci 2,2'-disubstituovaných nebo 3,2,2'-trisubstituovaných 1,1'-binaftylů a 8,3'-disubstituovaného 1,2'-binaftylu byly použity mobilní fáze složené z ACN jako organického modifikátoru a vody nebo vodného roztoku 20 mM fosfátového pufru, pH 6,0 nebo 3,0 v různých objemových poměrech.

Průtoková rychlost mobilní fáze byla v celém experimentu konstantní a to 0,7 ml/min, UV detekce analytů probíhala při vlnové délce 254 nm.³⁶ Všechny analýzy probíhaly za laboratorní teploty 22 \pm 2 °C.

Zásobní roztoky racematů jednotlivých derivátů byly připraveny navážením 1 mg vzorku a jeho rozpuštěním v 1 ml ACN. Takto připravené vzorky byly skladovány v temnu při teplotě 5 °C.

Příprava 20 mM fosfátového pufru o pH 3,0 byla provedena navážením 3,12 g NaH₂PO₄·2H₂O a rozpuštěním tohoto množství v cca 800 ml deionizované vody. Požadované pH bylo upraveno přidávkem H₃PO₄ a roztok byl poté doplněn do celkového objemu 1 liter. Příprava 20 mM fosfátového pufru o pH 6,0 probíhala stejným způsobem, ale požadovaného pH bylo docíleno přidávkem 0,1 M NaOH. Pro přípravu všech vodných roztoků byla použita deionizovaná voda.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro studium retenčního a enantioseparačního chování 2,2'-disubstituovaných nebo 3,2,2'-trisubstituovaných 1,1'-binaftylů a 8,3'-disubstituovaného 1,2'-binaftylu byl zvolen reverzní separační mód s ohledem na rozpustnost³⁶ daných analytů. Pro separaci byly postupně vyzkoušeny binární mobilní fáze tvořené nejprve směsí acetonitril/voda a následně acetonitril/20 mM fosfátový pufr o pH 6,0 nebo 3,0, v různých objemových poměrech. Byly hledány optimální podmínky pro enantioseparaci studovaných binaftylových derivátů.

4.1 Separace v mobilní fázi acetonitril/voda

Jako první byla testována mobilní fáze acetonitril/voda, ve které byl sledován vliv obsahu acetonitrilu na retenci a enantioseparaci studovaných analytů. Získaná chromatografická data jsou uvedena v tab.1. Z té je patrné, že s klesající koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi dochází u všech analytů k prodlužování retence. To má za následek nárůst hodnot retenčních časů resp. retenčních faktorů, tedy doby analýzy. V mobilní fázi s nejvyšším obsahem acetonitrilu tj. 80 obj. % probíhala vlivem vysoké eluční síly mobilní fáze rychlá eluce všech derivátů. Derivát 3-COOH-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl eluoval dokonce téměř s mrtvým časem. Při stejném procentuálním zastoupení organického modifikátoru a vody tj. 50/50 (v/v) vzrostl významně retenční čas u analytů 3-COOMe-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl, 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl a 2-OCSN(Me)₂-2'-OCSN(Me)₂-1,1'-binaftyl, proto jako další proměřovaná mobilní fáze byla zvolena mezifáze s obsahem acetonitrilu 45 obj. %, ve které již derivát 3-COOMe-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl neeluoval z kolony do 120 min a u ostatních dvou zmíněných derivátů se výrazně zvýšila retence. V poslední proměřované mobilní fázi s nejvyšším obsahem vody (70 obj. %) analyty BINOL, OBIN diAc, 2-NHAc-2'-OH-1,1'-binaftyl, 8-NHAc-3'-OMe-1,2'-binaftyl, 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl, 2-OCSN(Me)₂-2'-OCSN(Me)₂-1,1'-binaftyl a 2-SCON(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl vykazovaly velmi dlouhé retenční časy a většina z nich neeluovala z kolony do 120 min.

S rostoucí dobou, kterou analyty strávily v koloně, docházelo u většiny derivátů ke stereoselektivním interakcím s chirální stacionární fází, které byly doprovázené zvyšující se hodnotou enantiozlišení a mírně vzrůstající enantioselektivitou. Stoupající rozlišení mezi enantiomery je dáno také zlepšující se symetrií obou píků. U derivátů 3-COOH-2-

OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl, 3-COOH-2-NH₂-2'-OH-1,1'-binaftyl a 2-SCON(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl nebyl pozorován ani náznak částečné enantioseparace v žádné proměřované mobilní fázi acetonitril/voda. Dva z těchto analytů patří mezi zástupce 3,2,2'-trisubstituovaných a jeden mezi 2,2'-disubstituované 1,1'-binaftyl. V mobilní fázi s nejvyšším zastoupením acetonitrilu došlo k enantioseparaci pouze u 8-NHAc-3'-OMe-1,2'-binaftylu až na základní linii (R = 1,65) a u 3-COOMe-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftylu byla pozorována pouze částečná enantioseparace (R = 0,49). V ostatních proměřovaných mobilních fázích s nižším obsahem organického modifikátoru se dělily i enantiomery BINOL, OBIN diAc, 2-NHAc-2'-OH-1,1'-binaftyl, 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl a 2-OCSN(Me)₂-2'-OCSN(Me)₂-1,1'-binaftyl. Různý obsah acetonitrilu v mobilní fázi měl největší vliv na enantiorozlišení u derivátů BINOL, 3-COOMe-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl, 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl a 8-NHAc-3'-OMe-1,2'-binaftyl. V mobilní fázi s 80 obj. % acetonitrilu se racemát 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl nedělil vůbec, zatímco v mobilní fázi s 45 obj. % ACN dosáhlo enantiorozlišení hodnoty 1,39 doprovázené, ale téměř 50 minutovou retencí. Podobné chování bylo pozorováno i u derivátu BINOL, u kterého zpočátku neproběhl ani náznak enantioseparace. Enantiomery tohoto analytu se začaly dělit s relativně krátkým retenčním časem do 20 minut až v mobilní fázi s 40 obj. % acetonitrilu. V mobilní fázi s nejnižším proměřovaným procentuálním zastoupením organického rozpouštědla dosáhlo enantiorozlišení hodnoty 0,97. Průběh této enantioseparace je pro ilustraci uveden na obr. 3. Jako jediný ze zástupců derivátů 1,1'-binaftylů, který se dělil ve všech proměřovaných mobilních fázích a jeho enantiomery se rozdělily až na základní linii byl [3-COOMe-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl] ^{MOVE (11)}. Nejvyšší hodnoty enantiorozlišení (R = 2,06) bylo dosaženo v mobilní fázi s 50 % zastoupením acetonitrilu. Opět ale za cenu dlouhé doby analýzy, jak je vidět z obr. 4.

Jediný zástupce 8,3'-disubstituovaného 1,2'-binaftylu podléhal enantioseparaci ve všech proměřovaných mobilních fázích a jeho enantiomery se rozdělily vždy až na základní linii. S klesajícím obsahem acetonitrilu se v jeho případě retenční čas nezvyšoval, tak dramaticky jako v případě derivátů 1,1'-binaftylu. Poskytované vysoké hodnoty enantiorozlišení v relativně krátkých retenčních časech umožňují aplikaci i semipreparativního módu. Průběh enantioseparace tohoto analytu v mobilní fázi s 80 obj. % acetonitrilu je znázorněn na obr. 5.

Tabulka 1. Vliv různého obsahu acetonitrilu na hodnoty retenčního faktoru dříve elujícího enantiomeru (k_1), enantiozlišení ($R_{1,2}$) a enantioselektivity ($\alpha_{1,2}$) studovaných binafitylových derivátů. Experimentální podmínky: stacionární fáze Chiralpak AD-RH, mobilní fáze acetonitril/voda v různých objemových poměrech, průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

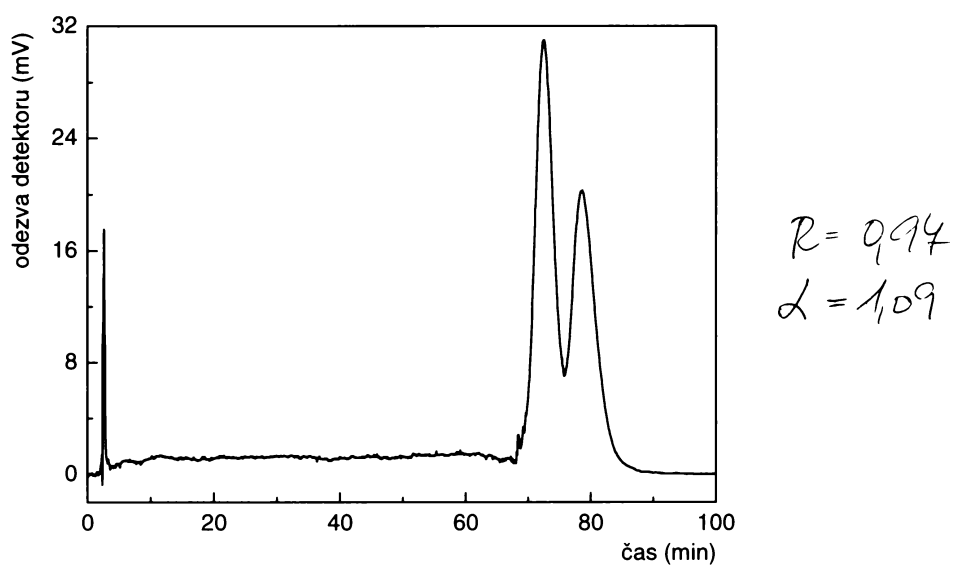
vzorek	ACN/voda (v/v)														
	80/20		70/30		60/40		50/50		45/55		40/60		30/70		
	k_1	$\alpha_{1,2}$	k_1	$\alpha_{1,2}$	k_1	$\alpha_{1,2}$	k_1	$\alpha_{1,2}$	k_1	$\alpha_{1,2}$	k_1	$\alpha_{1,2}$	k_1	$\alpha_{1,2}$	
BINOL	0,36	-	0,63	-	1,16	-	2,15	-	3,30	-	5,79	0,47	1,06	27,67	0,97
OBIN diAc	0,48	-	0,95	-	1,97	-	4,28	0,50	7,24	0,58	13,98	0,76	1,10	x	x
2-NHAc-2'-OH-1,1'-binafityl	0,37	-	0,62	-	1,01	-	1,60	0,41	2,28	0,52	3,73	0,61	1,19	16,40	0,89
3-COOH-2-OH-2'-NH(C ₆ H ₅)-1,1'-binafityl	0,04	-	0,08	-	0,28	-	0,32	-	0,38	-	0,58	-	-	5,57	-
3-COOMe-2-OH-2'-NH(C ₆ H ₅)-1,1'-binafityl	0,88	0,49	1,22	2,17	0,81	1,26	19,38	2,06	x	x	x	x	x	x	x
3-COOH-2-NH ₂ -2'-OH-1,1'-binafityl	0,11	-	0,39	-	0,60	-	0,73	-	0,87	-	1,13	-	-	7,21	-
2-OCSN(Me) ₂ -2'-SCON(Me) ₂ -1,1'-binafityl	0,79	-	1,61	0,54	1,25	3,69	0,68	1,28	16,41	1,39	x	x	x	x	x
2-OCSN(Me) ₂ -2'-OCSN(Me) ₂ -1,1'-binafityl	0,73	-	1,68	-	3,96	0,38	1,08	10,70	20,93	0,84	x	x	x	x	x
2-SCON(Me) ₂ -2'-SCON(Me) ₂ -1,1'-binafityl	0,69	-	1,32	-	2,67	-	5,78	-	9,62	-	18,90	-	-	x	x
8-NHAc-3'-OMe-1,2'-binafityl	0,65	1,65	1,75	1,08	1,89	1,75	1,94	2,21	5,25	3,25	1,87	1,87	1,87	x	x

x, analyt neeluoval do 120 min.

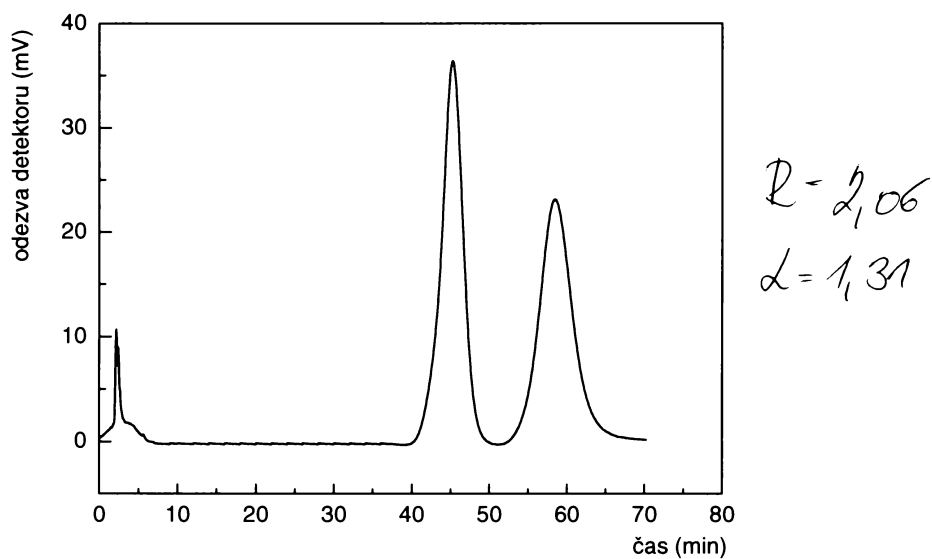
-, analyt nepodléhal enantioseparaci

↓ACN ↑R

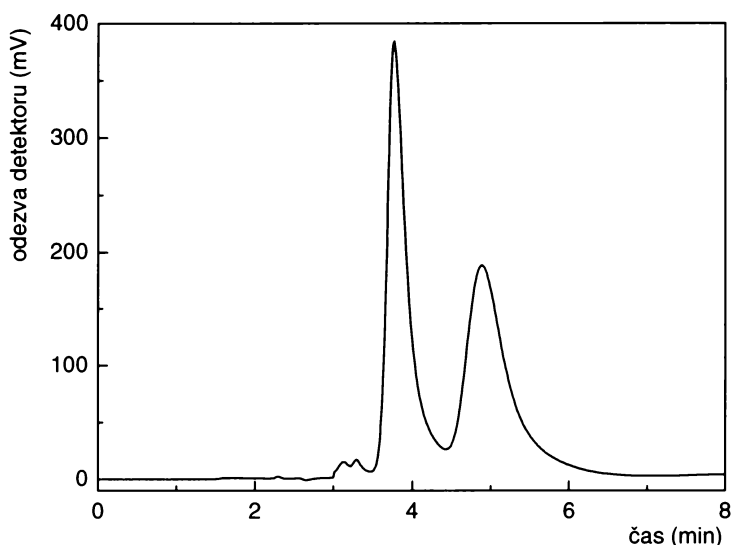
6 lalek k deti



Obr. 3: Enantioseparace BINOLu, kolona Chiralpak AD-RH, mobilní fáze acetonitril/voda 30/70 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.



Obr. 4: Enantioseparace 3-COOMe-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftylu, kolona Chiralpak AD-RH, mobilní fáze acetonitril/voda 50/50 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.



Obr. 5: Enantioseparace 8-NHAc-3'-OMe-1,2'-binaftylu, kolona Chiralpak AD-RH, mobilní fáze acetonitril/voda 80/20 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

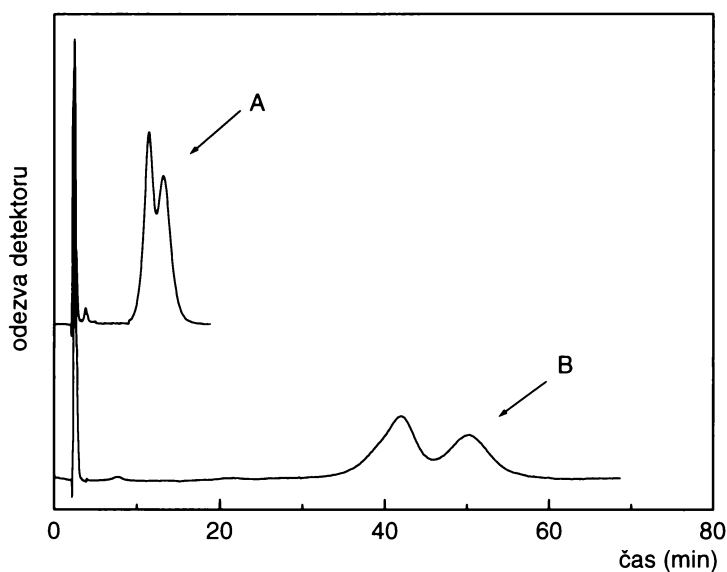
4.2 Separace v mobilní fázi acetonitril/20 mM fosfátový pufr o pH 6,0

Získané výsledky, které jsou sumarizovány v tab. 2, ukazují ovlivnění retenčního a enantioseparačního chování studovaných binaftylových derivátů různým obsahem acetonitrilu v pufované mobilní fázi (pH = 6,0). Ze zaznamenaných chromatografických dat vyplývá, že vliv acetonitrilu na retenci a enantioseparaci má obdobný trend jako v nepufovaném separačním systému. Se stoupajícím obsahem vodné složky v mobilních fázích docházelo opět k vyšší retenci, která byla u všech analytů podléhajících enantioseparaci doprovázená rostoucí hodnotou enantiorozlišení. Klesající koncentrace organického modifikátoru byla doprovázena mírným nárůstem enantioselektivity a zlepšením v symetrii píků, následovaném vyššími hodnotami rozlišení. V mobilní fázi s nejvyšším obsahem acetonitrilu docházelo k rychlé eluci všech analytů. Při snížení obsahu acetonitrilu z 50 obj. % na 45 obj. % výrazně vzrostly retenční časy u derivátů 3-COOMe-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl, 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl a 2-OCSN(Me)₂-2'-OCSN(Me)₂-1,1'-binaftyl. V poslední proměřované mobilní fázi s nejvyšším zastoupením vodné složky většina analytů podléhajících enantioseparaci

↓ ACN
↑ R_e
↓ ACN ↑ R_e

neeluovala do 120 min. Ovlivnění enantioseparace 2-NHAc-2'-OH-1,1'-binaftylu různým obsahem organického modifikátoru v mobilní fázi je dokumentováno na obr. 6.

Postup derivátů (3-COOH-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl, 3-COOH-2-NH₂-2'-OH-1,1'-binaftyl, 2-SCON(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl) separačním prostředím nebyl doprovázen sereoselektivními interakcemi v žádné proměřované pufované mobilní fázi. Jediný zástupce 1,1'-binaftylů, jehož enantiomery se rozdělily až na základní linii, v mobilní fázi s 50 obj. % acetonitrilu, byl opět 3-COOMe-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl. Dobrého enantiozlišení (R = 1,21) bylo dosaženo opět u derivátu 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl v mobilní fázi s 45 obj. % acetonitrilu. Zbylé 1,1'-binaftylové deriváty podléhaly pouze částečné enantioseparaci. U všech studovaných 1,1'-binaftylových derivátů byla nejvyšší hodnota enantiozlišení doprovázena pokaždé dlouhou dobou analýzy. Naopak jediný studovaný derivát 1,2'-binaftylu se chirálně rozdělil vždy až na základní linii v relativně krátkých retenčních časech. Hodnoty enantiozlišení tohoto analytu se pohybovaly v rozmezí 1,68 až 3,18.



Obr. 6: Vliv různého obsahu acetonitrilu v mobilní fázi ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 6,0 **A**) 40/60 (v/v) **B**) 30/70 (v/v) na enantioseparaci 2-NHAc-2'-OH-1,1'-binaftylu, kolona Chiralpak AD-RH, průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

Tabulka 2. Vliv různého obsahu acetonitrilu na hodnoty retenčního faktoru dříve elujícího enantiomeru (k_1), enantiozlišení ($R_{1,2}$) a enantioselektivity ($\alpha_{1,2}$) studovaných binafilylových derivátů. Experimentální podmínky: stacionární fáze Chiralpak AD-RH, mobilní fáze acetonitril/20 mM fosfátový pufr, pH 6,0 v různých objemových poměrech, průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

vzorek	ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 6,0 (v/v)																					
	80/20		70/30		60/40		50/50		40/60		30/70											
	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$							
BINOL	0,33	-	-	0,64	-	-	0,99	-	-	2,04	-	-	3,14	-	-	5,66	0,45	1,06	27,88	0,74	1,08	
OBIN diAc	0,45	-	-	0,96	-	-	1,68	-	-	4,14	0,49	1,08	6,75	0,60	1,09	14,26	0,72	1,10	x	x	x	x
2-NHAc-2'-OH-1,1'-binafilyl	0,36	-	-	0,63	-	-	0,84	-	-	1,54	0,30	1,10	2,14	0,48	1,17	3,81	0,61	1,19	16,30	0,87	1,21	
3-COOH-2-OH-2'-NH(C ₆ H ₅)-1,1'-binafilyl	0,09	-	-	0,28	-	-	0,31	-	-	0,56	-	-	0,82	-	-	1,74	-	-	13,58	-	-	
3-COOMe-2-OH-2'-NH(C ₆ H ₅)-1,1'-binafilyl	0,83	0,51	1,23	2,20	0,73	1,26	5,19	1,23	1,29	18,00	1,97	1,31	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
3-COOH-2-NH ₂ -2'-OH-1,1'-binafilyl	0,19	-	-	0,27	-	-	0,29	-	-	0,32	-	-	0,36	-	-	0,60	-	-	2,14	-	-	
2-OCSN(Me) ₂ -2'-SCON(Me) ₂ -1,1'-binafilyl	0,77	-	-	1,64	0,50	1,23	3,21	0,74	1,30	8,64	1,08	1,32	15,00	1,21	1,34	x	x	x	x	x	x	
2-OCSN(Me) ₂ -2'-OCSN(Me) ₂ -1,1'-binafilyl	0,72	-	-	1,70	-	-	3,66	0,19	1,04	10,17	0,62	1,12	19,04	0,67	1,12	x	x	x	x	x	x	
2-SCON(Me) ₂ -2'-SCON(Me) ₂ -1,1'-binafilyl	0,68	-	-	1,33	-	-	2,35	-	-	5,52	-	-	9,17	-	-	18,61	-	-	x	x	x	
8-NHAc-3'-OMe-1,2'-binafilyl	0,61	1,68	1,77	1,09	1,86	1,78	1,69	2,32	1,79	3,36	2,82	1,85	4,98	3,18	1,87	x	x	x	x	x	x	

x, analyt neeluoval do 120 min.

-, analyt nepodléhal enantioseparaci

4.3 Separace v mobilní fázi acetonitril/20 mM fosfátový pufr o pH 3,0

Hodnoty retenčních a enantioseparačních parametrů, naměřené v mobilních fázích ACN/20 mM fosfátový pufr pH = 3,0, s různým zastoupením acetonitrilu, jsou uvedeny v tab. 3. Ze získaných údajů je patrné, že retenční a enantioseparační chování derivátů vykazovalo obdobné trendy jako v mobilních fázích ACN/voda a ACN/20 mM fosfátový pufr o pH 6,0. S rostoucím zastoupením vodné složky v mobilní fázi se prodlužovala retence všech analytů, což mělo za následek rostoucí hodnotu enantiorozlišení spolu s mírným nárůstem hodnoty enantioselektivity u většiny analytů. Na rozdíl od nepufrované mobilní fáze a pufrované mobilní fáze na vyšší hodnotu pH, byla v tomto systému při 50 % obsahu ACN pozorována částečná enantioseparace 3-COOH-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftylu. U derivátu 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl došlo také k částečné enantioseparaci již v mobilní fázi s nejvyšším proměřovaným obsahem organického modifikátoru. V mobilní fázi s 45 obj.% acetonitrilu proběhlo enantiomerní dělení tohoto analytu až téměř na základní linii. Enantiorozlišení dosáhlo hodnoty 1,33, ale za cenu poměrně delší doby analýzy a rozmytých zón elučních křivek. Pro ilustraci je průběh enantioseparace tohoto derivátu v mobilní fázi s 50 obj. % acetonitrilu znázorněn na obr. 7.

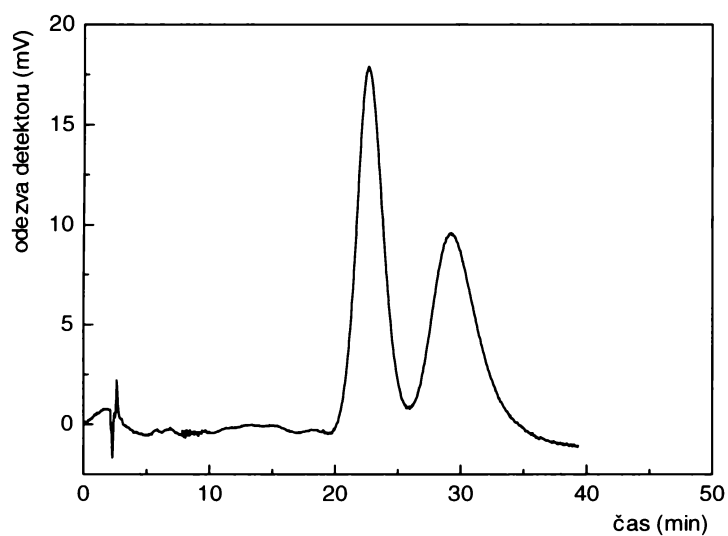
Derivát 8-NHAc-3'-OMe-1,2'-binaftyl vykazoval znovu velmi vysoké hodnoty enantiorozlišení ve všech proměřovaných mobilních fázích, zatímco u 2-SCON(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftylu a 3-COOH-2-NH₂-2'-OH-1,1'-binaftylu (obr. 8) opět nedošlo ani k náznaku enantioseparace v žádné z testovaných mobilních fází, i když retence těchto analytů byla dostatečně dlouhá na projevení stereoselektivních interakcí s chirálním selektorem.

Tabulka 3. Vliv různého obsahu acetonitrilu na hodnoty retenčního faktoru dříve eluujícího enantiomeru (k_1), enantiozlišení ($R_{1,2}$) a enantioselektivity ($\alpha_{1,2}$) studovaných binafitylových derivátů. Experimentální podmínky: stacionární fáze Chiralpak AD-RH, mobilní fáze acetonitril/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0 v různých objemových poměrech, průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

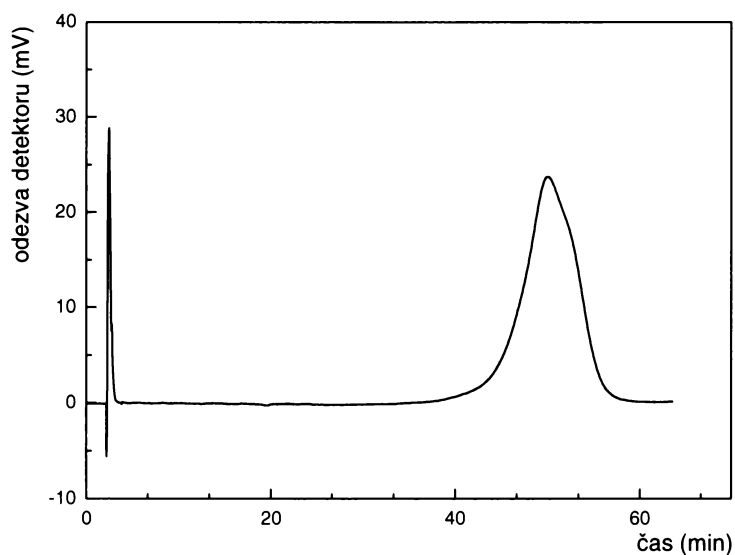
vzorek	ACN/20mM fosfátový pufr, pH 3,0 (v/v)																				
	80/20			70/30			60/40			50/50			45/55			40/60			30/70		
	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
BINOL	0,36	-	-	0,45	-	-	0,81	-	-	2,00	-	-	3,48	-	-	5,77	-	-	27,84	0,76	1,09
OBIN diAc	0,49	-	-	0,73	-	-	1,47	-	-	4,43	0,52	1,08	7,44	0,59	1,09	14,97	0,69	1,10	x	x	x
2-NHAc-2'-OH-1,1'-binafityl	0,35	-	-	0,42	-	-	0,69	-	-	1,54	0,40	1,13	2,38	0,51	1,17	4,00	0,59	1,19	16,46	0,90	1,20
3-COOH-2-OH-2'-NH(C ₆ H ₅)-1,1'-binafityl	0,34	-	-	0,49	-	-	1,14	-	-	4,04	0,41	1,10	7,74	0,54	1,13	20,77	0,85	1,16	x	x	x
3-COOMe-2-OH-2'-NH(C ₆ H ₅)-1,1'-binafityl	0,88	0,61	1,25	1,76	0,83	1,28	4,67	1,26	1,30	17,61	1,96	1,31	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3-COOH-2-NH ₂ -2'-OH-1,1'-binafityl	0,30	-	-	0,32	-	-	0,55	-	-	1,37	-	-	2,38	-	-	3,90	-	-	19,44	-	-
2-OCSN(Me) ₂ -2'-SCON(Me) ₂ -1,1'-binafityl	0,80	0,53	1,25	1,30	0,55	1,28	2,86	0,70	1,30	8,82	1,20	1,32	17,41	1,33	1,34	x	x	x	x	x	x
2-OCSN(Me) ₂ -2'-OCSN(Me) ₂ -1,1'-binafityl	0,75	-	-	1,34	-	-	3,17	0,18	1,04	9,94	0,65	1,12	22,57	0,81	1,12	x	x	x	x	x	x
2-SCON(Me) ₂ -2'-SCON(Me) ₂ -1,1'-binafityl	0,73	-	-	1,04	-	-	2,04	-	-	5,43	-	-	9,81	-	-	18,75	-	-	x	x	x
8-NHAc-3'-OMe-1,2'-binafityl	0,66	1,90	1,74	0,85	1,97	1,84	1,46	2,25	1,86	3,27	2,93	1,85	5,55	3,30	1,86	x	x	x	x	x	x

x, analyt neeluoval do 120 min.

-, analyt nepodléhal enantioseparaci



Obr. 7: Chromatogram enantioseparace 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftylu, kolona Chiralpak AD-RH, mobilní fáze acetonitril/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0, 50/50 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.



Obr. 8: Chromatogram enantioseparace 3-COOH-2-NH₂-2'-OH-1,1'-binaftylu, kolona Chiralpak AD-RH, mobilní fáze acetonitril/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0, 30/70 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 254 nm.

4.4 Porovnání dosažených výsledků v mobilních fázích ACN/voda a ACN/20 mM fosfátový pufr o pH 6,0 a 3,0

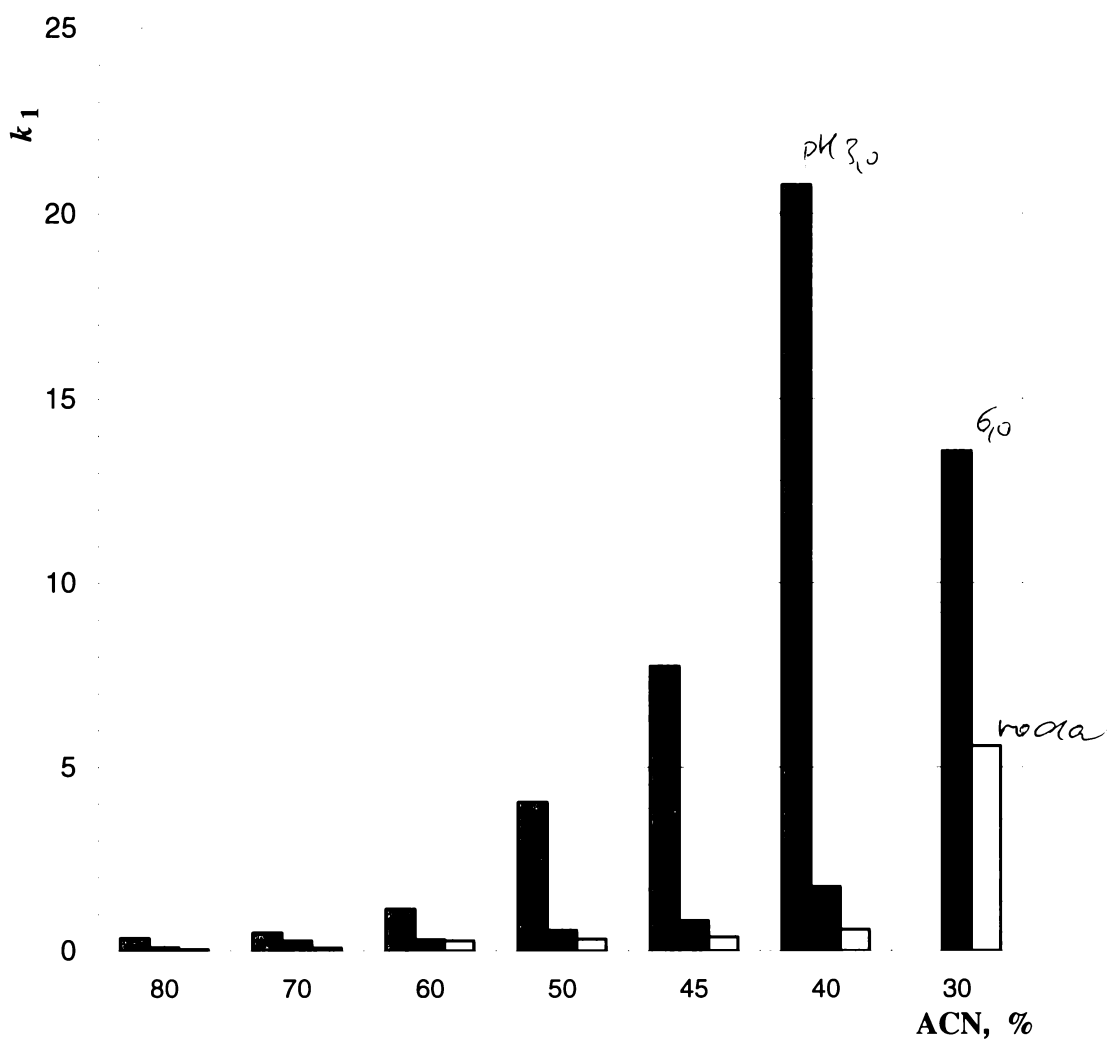
V dříve uvedených tabulkách tj. tab. 1, 2 a 3 jsou zaznamenány dosažené výsledky separací v mobilních fázích acetonitril/voda, acetonitril/20 mM fosfátový pufr, pH 6,0 a acetonitril/fosfátový pufr, pH 3,0. Porovnáním chromatografických dat jednotlivých derivátů v mobilních fázích ACN/voda a ACN/fosfátový pufr, pH 6,0 (tab. 1 vs. tab. 2) je zřejmé, že záměna vody pufrům v sobě si odpovídajících mobilních fázích zejména s 60, 50 a 45 obj. % acetonitrilu vedla ke snížení retence u všech analytů kromě 3-COOH-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftylu. Na enantiorozlišení neměla záměna vody a pufru výrazný vliv. Výjimku ale tvoří analyty 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl, 2-OCSN(Me)₂-2'-OCSN(Me)₂-1,1'-binaftyl a BINOL, u kterých došlo záměnou vody za pufr o pH = 6,0 k mírnému snížení ^{retence při pH 6,0} Hodnota enantiorozlišení prvně zmiňovaného derivátu klesla z hodnoty 1,39 na 1,21, ^{ale z jejího stupně} pro 2-OCSN(Me)₂-2'-OCSN(Me)₂-1,1'-binaftyl z hodnoty 0,84 na 0,67 u obou v identických mobilních fázích s 45 obj. % acetonitrilu. Rozlišení enantiomerů BINOLu kleslo z 0,97 na 0,74 ve srovnávaných mobilních fázích s 30 obj. % acetonitrilu.

Porovnáním získaných výsledků v pufovaných mobilních fázích na pH 6,0 a 3,0 (tab. 2 vs. tab.3) je vidět, že v korespondujících mobilní fázích s 45 a 40 % zastoupením acetonitrilu vedlo snížení pH fosfátového pufru k nárůstu hodnot retenčních faktorů všech studovaných derivátů, zejména u OBIN diAc, 3-COOH-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl, 3-COOH-2-NH₂-2'-OH-1,1'-binaftyl, 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl a 2-OCSN(Me)₂-2'-OCSN(Me)₂-1,1'-binaftyl.

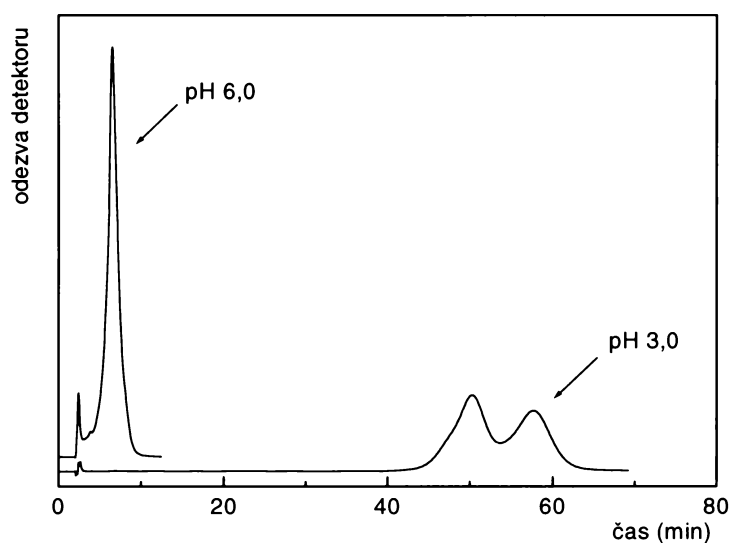
Na základě hodnot chromatografických parametrů získaných ve třech již zmiňovaných proměřovaných typech mobilní fáze se prokázala nejvýraznější změna retence (zvýšení) ~~ve~~ v pufované mobilní fázi o pH 3,0 u derivátů 3-COOH-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftylu (obr. 9) a 3-COOH-2-NH₂-2'-OH-1,1'-binaftylu. Jestliže v mobilní fázi o určitém obsahu acetonitrilu docházelo alespoň k částečné enantioseparaci, pak ovlivnění enantiomerního dělení přítomností či absencí fosfátového pufru o různém pH bylo minimální.

Ve srovnání s mobilními fázemi ACN/voda a ACN/20 mM fosfátový pufr pH 6,0, došlo v separačním systému ACN/20 mM fosfátový pufr pH 3,0 k částečnému dělení enantiomerů 3-COOH-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftylu (obr. 10) a již v mobilní fázi s 80 % obsahem ACN podléhal enantioseparaci 2-OCSN(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftyl.

výše žadil jak je to o retenci



Obr. 9: Porovnání retenčních faktorů (k_1) dříve eluujícího enantiomeru pro derivát 3-COOH-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftyl v mobilních fázích tvořených □ ACN/voda, ACN/20 mM fosfátový pufr ■ pH 6,0 nebo □ 3,0 v různých objemových poměrech (při 30 % obsahu ACN v pufované mobilní fázi o pH 3,0 měření nebylo provedeno z důvodu velmi dlouhé retence), kolona Chiralpak AD-RH, průtoková rychlost 0,7ml/min, UV detekce 254 nm.



Obr. 10: Chromatogram enantioseparace 3-COOH-2-OH-2'-NH(C₆H₅)-1,1'-binaftylu, mobilní fáze acetonitril/20 mM fosfátový pufr pH 6,0 nebo 3,0, 40/60 (v/v), kolona Chiralpak AD-RH, průtoková rychlost 0,7ml/min, UV detekce 254 nm.

Ze všech tří typů testovaných mobilních fází se jako nejvhodnější jevila mobilní fáze o složení 50/50 (v/v) acetonitril/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0 umožňující alespoň částečnou enantioseparaci sedmi z deseti studovaných derivátů v ještě akceptovatelné době analýzy. Enantiomery 2-SCON(Me)₂-2'-SCON(Me)₂-1,1'-binaftylu a 3-COOH-2-NH₂-2'-OH-1,1'-binaftylu nevykazovaly ani v jednom testovaném separačním systému náznak enantioseparace.

5. Závěr

- V rámci optimalizace podmínek pro enantioseparaci studovaných 2,2'-disubstituovaných nebo 3,2,2'-trisubstituovaných 1,1'-binaftylů a 8,3'-disubstituovaného 1,2'-binaftylu byly studovány binární mobilní fáze tvořené acetonitrilem jako organickým modifikátorem a vodnou složkou s využitím CSP na bázi *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) amylosy určené pro revezní mód. Byl sledován jak vliv obsahu acetonitrilu (v rozmezí 80 – 30 obj. %), tak i složení vodné složky mobilní fáze na hodnoty retenčního faktoru dříve eluujícího enantiomeru (k_1), enantiorozlišení ($R_{1,2}$) a enantioselektivity ($\alpha_{1,2}$) studovaných binaftylových derivátů. Postupně byly proměřeny mobilní fáze ACN/voda, ACN/20 mM fosfátový pufr pH 6,0 a ACN/20mM fosfátový pufr pH 3,0.
- V každé testované mobilní fázi měl snižující se obsah acetonitrilu za následek nárůst retence u všech analytů. Stoupající retence byla doprovázena u většiny derivátů zvyšující se hodnotou enantiorozlišení a mírně vzrůstající enantioselektivitou.
- V nepufrované a pufrované mobilní fázi vedla záměna vody za 20mM fosfátový pufr o pH= 6,0 v korespondujících mobilních fázích s 60, 50 a 45 % zastoupením ACN ke zkrácení retence u všech analytů. Na hodnoty enantiorozlišení neměla záměna vody pufrům výrazný vliv (s výjimkami). Snížení pH 20mM fosfátového pufru z hodnoty 6,0 na hodnotu 3,0 vedlo v identických mobilních fázích s 45 a 40 obj. % ACN k nárůstu retence a stoupajícímu enantiorozlišení u většiny analytů.
- Ze všech tří typů proměřovaných mobilních fází se jako optimální pro enantioseparaci jevila fáze o složení 50/50 (v/v) ACN/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0, umožňující alespoň částečnou enantioseparaci sedmi z deseti studovaných derivátů v ještě akceptovatelné době analýzy.

POUŽITÁ LITERATURA:

1. Loukotková, L.; Rambousková, M.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *Chirality* 2008; 20:900–909.
2. Štulík, K. a kolektiv: *Analytické separační metody*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2004.
3. Eliel, E.L.: *Stereochemie uhlíkatých sloučenin*, překlad z angličtiny, Academia, Praha, 1970.
4. McMurry, J.: *Organická chemie*, překlad z angličtiny, Vutium, Brno, 2007, kap. 9
5. Tesařová, E.: *Analýza chirálních sloučenin* (Tesařová, E.; ed.), kap. 4. Pražské analytické centrum inovací, Praha 2007.
6. Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Hatada, K.: *J. Am. Chem. Soc.* 1984;106:5357–5359.
7. Okamoto, Y.; Kaida, Y.: *J. Chromatogr. A* 1994;666:403–419.
8. Yashima, E.: *J. Chromatogr. A* 2001;906:105–125.
9. Tachibana, K.; Ohnishi, A.: *J. Chromatogr. A* 2001;906:127–154.
10. Yamamoto, C.; Okamoto, Y.: v: Gübitz, G.; Schmid, M.G.: *Methods in molecular biology*, vol. 243. *Chiral separations: methods and protocols*, Humana Press Inc., (Totowa), 2004, kap. 5
11. Chankvetadze, B.; Ikai, T.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y.: *J. Chromatogr. A* 2004;1042:55–60.
12. Okamoto, Y.; Yashima, E.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998;37:1020–1043.
13. Ghanem, A.; Hoenen, H.; Aboul-Enein, H.Y.: *Talanta* 2006;68:602–609.
14. Zhang, T.; Nguyen, D.; Franco, P.: *J. Chromatogr. A* 2008;1191:214–222.
15. Zhang, T.; Kientzy, Ch.; Franco, P.; Ohnishi, A.; Kagamihara, Y.; Kurosawa, H.: *J. Chromatogr. A* 2005;1075:65–75.
16. Helmy, R.; Wang, T.: *J. Sep. Sci.* 2005;28:189–192.
17. Aboul-Enein, H.Y.; Ali, I.: v: Gübitz, G.; Schmid, M.G.: *Methods in molecular biology*, vol. 243. *Chiral separations: methods and protocols*, Humana Press Inc., (Totowa), 2004, kap. 6
18. Putala, M.: *Chem. Listy* 2001;95:353–358.
19. Kočovský, P.; Vyskočil, Š.; Smrčina, M.: *Chem. Rev.* 2003;103:3213–3245.
20. Toda, F.; Tahaka, K.; Iwata, S.: *J. Org. Chem.* 1989;54:3007–3009.

21. Yamamoto, K.; Fukushima, H.; Okamoto, Y.; Hatada, K.; Nakazaki, M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1984;1111–1112.
22. Yamamoto, K.; Fukushima, H.; Nakazaki, M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1984;1490–1491.
23. Brussee, J.; Groenendijk, J.L.G.; Jansen, A.C.A.; Koupele, J.M.: *Tetrahedron* 1985;41:3313–3319.
24. Cai, D.; Hughes, D.L.; Verhoeven, T.R.; Reider, P.J.: *Tetrahedron Lett.* 1995;36:7991–7994.
25. Periasamy, M.; Venkatraman, L.; Sivakumar, S.; Sampathkumar, N.; Ramanathan, C.R.: *J. Org. Chem.* 1999;64:7643–7645.
26. Vyskočil, Š.; Meca, L.; Tišlerová, I.; Císařová, I.; Polášek, M.; Harutyunyan S.R.; Helikon, Y.N.; Stead, R.M.J.; Farrugia, L.; Lockhart, S.C.; Mitchell, W.L.; Kočovský, P.: *Chem. Eur. J.* 2002;820:4633–4648.
27. Weng, W.; Guo, H.; Zhan, F.; Fang, H.; Wang, O.; Yao, B.; Li, S.: *J. Chromatogr. A* 2008;1210:178–184.
28. Li, C.P.; Yang, H.L.; Li, J.H.; Shan, W.G.: *Chinese J. Anal. Chem.* 2006;34:1133–1136.
29. Huang, J.; Zhang, P.; Chen, H.; Li, T.: *Anal. Chem.* 2005;77:3301–3308.
30. Huang, J.; Chen, H.; Zhang, P.; Li, T.: *J. Chromatogr. A* 2006;1109:307–311.
31. Huang, J.; Chen, H.; Zhang, P.; Li, T.: *J. Chromatogr. A* 2006;1113:109–115.
32. Smrčina, M.; Vyskočil, Š.; Polívková, J.; Poláková, J.; Sejbal, J.; Hanuš, V.; Polášek, M.; Verier, H.; Kočovský, P.: *Tetrahedron: Asymmetry* 1997;8:537–546.
33. Weng, W.; Zhan, F.; Fu, J.; Li, T.; Chen, X.; Huang, X.: *Chromatographia* 2007;67:119–123.
34. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2003.
35. Meca, L.: *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha, 2000.
36. Rambousková, M.: *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha, 2007.