

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



**SEPARACE VYBRANÝCH DERIVÁTŮ TRYPTOFANU S VYUŽITÍM
CHIRÁLNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE NA BÁZI CYKLOFRUKTANU**

**Separation of some tryptophan derivatives using cyclofructan based
chiral stationary phase**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Klinická a toxikologická analýza

Praha 2015

Vypracovala: Monika Martínková

Školitel: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Prohlašuji,

že tuto bakalářskou práci jsem vypracovala

samostatně a využila jsem pouze zdroje,

které jsou uvedeny v seznamu referencí.

V Praze 25. 3. 2015

Monika Martínková

ABSTRAKT

Chirální stacionární fáze na bázi R-naftylethylem derivatizovaného cyklofruktanu byla využita pro separaci enantiomerů vybraných derivátů tryptofanu. Dělení probíhalo v normálním separačním módu, kde byla testována různá složení mobilní fáze a přísady minoritních modifikátorů. Cílem práce bylo nalézt vhodné podmínky pro enantioseparaci.

ABSTRACT

Chiral stationary phase based on R-naphtylethyl derivatized cyclofructan was used for separation of tryptophan derivatives. In normal mode were tested different compositions of mobile phase and minorite modifiers. The aim of this work was to find suitable separation conditions.

KLÍČOVÁ SLOVA

enantioselektivní separace, cyklofruktany, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, tryptofan

KEYWORDS

enantioselective separation, cyclofructans, high-performance liquid chromatography, tryptophan

Ráda bych poděkovala mé školitelce prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za její odborné vedení, ochotu, mnoho užitečných rad a především čas, který se mnou strávila během tvorby mé bakalářské práce.

Poděkování také patří Mgr. Radimu Gerykovi a všem z katedry fyzikální a makromolekulární chemie.

OBSAH

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
2. ÚVOD.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	9
3.1.1 Vztahy charakterizující děje při separaci.....	9
3.2 Chiralita a související pojmy.....	10
3.2.1 Chiralita	10
3.2.2 Enantiomery	11
3.3 Chirální stacionární fáze.....	12
3.3.1 CSP na bázi polysacharidů	12
3.3.2 Cyklodextrinové CSP	13
3.3.3 CSP na bázi makrocyclických antibiotik.....	13
3.3.4 Proteinové CSP	14
3.3.5 Cyklofruktanové CSP	14
3.4 Analyzované látky.....	16
3.4.1 Získání čistých enantiomerů aminokyselin v praxi.....	16
3.4.2 Tryptofan a jeho deriváty	17
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
4.1 Přístroje a pomůcky	20
4.2 Použité chemikálie.....	20
4.3 Příprava vzorků a mobilní fáze	21
4.4 Podmínky separace.....	21
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	22
5.1 Vliv složení mobilní fáze na enantioseparaci	22
5.1.1 Mobilní fáze s proměnným poměrem HEX/IPA.....	22
5.1.2 Mobilní fáze s proměnným přídatkem TFA.....	24
5.1.3 Mobilní fáze s bazickým modifikátorem TEA.....	26
6. ZÁVĚR	28
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	29

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AK	aminokyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CE	kapilární elektroforéza
t_R	retenční čas
t_R'	redukovaný retenční čas
t_M	mrtvý čas
K_D	distribuční konstanta
c_s	koncentrace analytu ve stacionární fázi
c_m	koncentrace analytu v mobilní fázi
k	retenční faktor
α	selektivita
R	rozlišení
W	šířka píku při základně
CSP	chirální stacionární fáze
CD	cyklodextriny
MA	makrocyclická antibiotika
HSA	lidský sérový albumin
BSA	hovězí sérový albumin
CF	cyklofruktany
DiPAMP	(<i>R,R</i>)-1,2-bis(o-anisylfenylfosfano)ethan
EDMA	ethylenglykol dimethakrylát
HEX	hexan
IPA	2-propanol
TFA	kyselina trifluoroctová
TEA	triethylamin
MF	mobilní fáze

2. ÚVOD

K enantioselektivním separacím se v posledních letech upírá stále více pozornosti. Rozvoj účinnějších separačních metod umožňuje oddělit i stereoizomerní sloučeniny. Největším stimulem k rozmachu těchto metod byla snaha vyrábět enantiomerně čistá léčiva, kterých se dříve vyrábělo až 80% ve formě racemátů¹. Pozornost zvýšily i nešťastné případy jako byl prodej thalidomidu, přípravku pro těhotné ženy, jehož R-enantiomer působí jako sedativum, avšak S-enantiomer má teratogenní účinky.

Neméně důležitou roli hrají enantioselektivní separace v rámci výroby agrochemikálií, jelikož ani účinky enantiomerů pesticidů nemusí být totožné, a mohou tak mít rozdílný dopad na životní prostředí.

Už L. Pasteur objevením rozdílu mezi krystalky soli kyseliny vinné dokázal, že i složky našeho jídelníčku obsahují chirální látky. Analýzou jednotlivých enantiomerů můžeme získat informace o stáří potravin, kontaminaci mikroorganismy nebo identifikovat nežádoucí příměsy².

Výskyt chiralit je důležitý také mezi aminokyselinami (AK). Dlouho převládal názor, že aminokyseliny se v tkáních savců nacházejí pouze jako L-enantiomery, opak prokázal až objev D-alaninu v séru prasat a myší³. Rozlišování enantiomerů AK je v organismech tak striktní, že některé mikroorganismy dokonce využívají D-formu jako toxických zbraní vůči ostatním organismům⁴. Pro člověka má zvláštní význam například D-enantiomer kyseliny asparagové, která se podílí na rozvoji centrálního nervového systému. Zvýšení hladiny D-serinu zase souvisí s výskytem onemocnění, jako je schizofrenie. Sledovat zastoupení jednotlivých enantiomerů aminokyselin v lidském organismu má tedy široké potenciální využití³.

Pro dělení enantiomerů, ať už aminokyselin nebo jiných chirálních látek, se využívá dvou způsobů - přímé a nepřímé separace. Přímá separace spočívá v dělení enantiomerů původních sloučenin v asymetrickém prostředí. Nepřímá metoda využívá derivatizace analytů chirálním činidlem vedoucí ke vzniku diastereoizomerů a jejich následné rozdělení na achirální stacionární fázi nebo obecně v achirálním prostředí.

Mezi moderní a dnes nejpoužívanější enantioselektivní separační metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE). Oproti CE nabízí HPLC vyšší citlivost a reprodukovatelnost výsledků, rychle se rozrůstá i výzkum nových chirálních stacionárních fází pro HPLC¹.

Cílem této bakalářské práce je nalézt optimalizované podmínky pro enantioselektivní separaci vybraných derivátů tryptofanu s využitím chirální stacionární fáze na bázi cyklofruktanu derivatizovaného R-naftylethylem.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography) je separační metoda rozdělující analyzované látky mezi dvě nemísitelné fáze. Pohyblivá fáze se nazývá mobilní a nepohyblivá fáze je označována jako stacionární. Separace látek probíhá na základě fyzikálně-chemických interakcí, mezi které patří rozpouštění, adsorpce, iontová výměna a další. Analyty vykazující větší afinitu ke stacionární fázi jsou zadržovány déle a pohybují se kolonou pomaleji, naopak látky s nižší afinitou eluují dříve. Základem úspěšné separace je dostatečná rozdílnost distribučních konstant dělených analytů.

Výhodou této separační metody je použitelnost pro obrovské spektrum látek, které se liší svými fyzikálními i chemickými vlastnostmi. Jednoduchým způsobem jako je změna složení mobilní fáze lze efektivně ovlivnit průběh separace, jelikož mobilní fáze se také podílí na interakcích analytu se stacionární fází⁵.

3.1.1 Vztahy charakterizující děje při separaci

Retenční čas (t_R) označuje dobu, kterou stráví analyzovaná látka v koloně. Část tvoří redukovaný retenční čas (t_R' - doba, kterou analyt stráví ve stacionární fázi) a mrtvý čas (t_M - doba, kterou nesorbující se látka stráví v separačním systému) (viz vztah 1).

$$t_R = t_R' + t_M \quad (1)$$

Distribuční konstanta (K_D) kvantitativně vyjadřuje poměr koncentrací analytu ve stacionární (c_s) a mobilní (c_m) fázi (viz vztah 2).

$$K_D = c_s / c_m \quad (2)$$

Retenční faktor (k) udává, jakého násobku hodnoty mrtvého času je nutno k eluci analytu (viz vztah 3).

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

Selektivita (α), čím vyšší nabývá hodnoty, tím je systém pro danou dvojici dělených látek selektivnější (viz vztah 4) a přispívá tak k lepšímu rozdělení.

$$\alpha_{1,2} = k_2/k_1 \quad (4)$$

k_1 ...retenční faktor dříve eluující látky

k_2 ...retenční faktor později eluující látky

Rozlišení (R) dvou separovaných látek je dáno rozdílem vzdáleností těžišť elučních křivek (viz vztah 5)⁵.

$$R_{1,2} = 2(t_{R2} - t_{R1})/(w_1 + w_2) \quad (5)$$

t_{R1} ...retenční čas dříve eluující látky

t_{R2} ...retenční čas později eluující látky

w_1 ...šířka dříve eluujícího píku při základně

w_2 ...šířka později eluujícího píku při základně

3.2 Chiralita a související pojmy

3.2.1 Chiralita

Termín chiralita byl odvozen od řeckého označení pro ruku, dlaň – *chiros*. Chiralita je nejběžněji způsobena přítomností stereogenního centra v molekule, ale jako vlastnost je jí nutno vztahovat k celé molekule. Nejčastějším stereogenním centrem bývá atom uhlíku se čtyřmi různými substituenty, takový uhlík pak často označujeme jako asymetrický. Za chiralitu molekuly mohou být odpovědné ale i další atomy jako je křemík, dusík, síra nebo fosfor. V molekule se může nacházet i několik stereogenních center neboli středů chiraloty, avšak pokud se v ní vyskytuje stejný počet

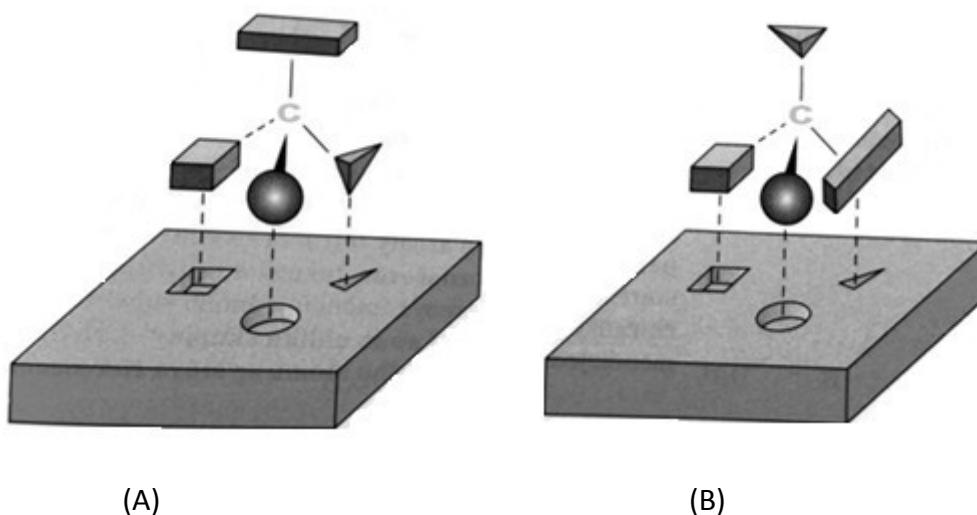
strukturně totožných středů chiralit opačného smyslu, bude se tato molekula jevit navenek achirální, jestliže neobsahuje další nepárový střed chiralit⁶.

3.2.2 Enantiomery

Podmínkou pro existenci enantiomerů je výskyt asymetrie v molekule. Jako enantiomery označujeme molekuly, které jsou přesným zrcadlovým obrazem jedna druhé, stejně jako naše pravá a levá ruka, proto řecký název *chiros*. Setkat se můžeme i se starším a dnes již nevhodným označením *optické antipody*, nesprávné je také označení *optické izomery*, jelikož enantiomery nemusí být nutně opticky aktivní. V názvu sloučenin rozlišujeme enantiomery pomocí afixů (+) nebo (-), které charakterizují otáčení roviny polarizovaného světla o určité vlnové délce. Absolutní konfiguraci na jednotlivých stereogenních centrech vyjadřujeme označením (R) a (S).

Ekvimolární směs obou zrcadlových enantiomerů se nazývá racemát. Racemát nevykazuje optickou aktivitu, jelikož má stejné zastoupení (+) i (-) formy⁷.

Enantiomery vykazují většinou shodné fyzikální vlastnosti, avšak mohou se lišit svými biologickými vlastnostmi. Tyto odlišnosti mohou přinejmenším způsobit změnu vůně, například (R)-limonen má vůni pomeranče, ale jeho druhý enantiomer (S)-limonen naše receptory identifikují jako citronovou vůni. Velice důležité jsou tyto rozdíly, jedná-li se o léčiva, kdy jeden enantiomer může mít léčivé schopnosti, avšak druhý může být neaktivní nebo i škodlivý. Má-li molekula správně „padnout“ do svého biologického receptoru, musí mít vhodnou prostorovou orientaci a zapadnout přesně jako pravá ruka do pravé rukavice. Pouze určitý stereoisomer je tedy tvarem komplementární ke svému receptoru viz obrázek 3.1. Většina léčiv získávaných z přírodních zdrojů nebo jejich následnou přeměnou je často chirálních. Například známý lék ibuprofen obsahuje jedno stereogenní centrum, tvoří tedy dva enantiomery, ale pouze S-enantiomer má léčivé účinky, působí proti bolesti a protizánětlivě. Jeho druhý R-enantiomer je neúčinný a dokonce snižuje rychlost nástupu účinku u S-enantiomeru⁷.



Obr. 3.1 Jeden enantiomer je komplementární ke svému biologickému receptoru (A), druhý do něj není schopen zapadnout (B). Převzato z citace 7.

3.3 Chirální stacionární fáze

Na dnešním trhu je k dispozici nepřehledné množství chirálních stacionárních fází (CSP), ty mohou být určeny k dělení rozmanité škály látek nebo být specifické pro danou dvojici enantiomerů tzv. na míru šité CSP (tailor-made CSP).

Chirální stacionární fáze jsou nejčastěji rozdělovány podle typu interakce, která má největší podíl na samotné separaci. Vzhledem k tomu, že při separaci enantiomerů se uplatňuje více interakcí současně a mohou se lišit v různých separačních módech, je toto dělení spíše přibližné⁸.

3.3.1 CSP na bázi polysacharidů

Tyto CSP využívají polysacharidů s levotočivou helikální strukturou amylosy a konformačně stabilnější celulosy. Tyto selektory jsou derivatizovány za vzniku např. triacetátu, benzoátu nebo trifenyلكarbamátu⁸. Takto derivatizované polysacharidy

nachází široké využití v oblasti farmaceutické chemie⁹. Mechanismy odpovědné za separaci enantiomerů jsou převážně vodíkové vazby a π - π interakce⁸.

3.3.2 Cyklodextrinové CSP

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy, které se skládají z několika glukopyranosových jednotek. Nejvíce prozkoumané jsou α , β , a γ CD, které obsahují 6, 7 a 8 glukopyranosových jednotek¹⁰. CD jsou také často derivatizovány na svých hydroxylových skupinách, což ovlivňuje tvar i přístupnost kavity pro analyzovanou látku⁸. Jedna z výhod CD je, že je můžeme použít ve všech typech rozpouštědel, což také znamená ve všech separačních módech tj. v normálním, reverzním i polárně organickém módu⁹.

Využití nachází cyklodextriny jako chirální selektory také při separacích pomocí kapilární elektroforézy¹¹.

3.3.3 CSP na bázi makrocyclických antibiotik

Glykopeptidy jsou široce využívané chirální selektory, reprezentují je makrocyclická antibiotika (MA) jako je teikoplanin, vankomycin, ristocetin A a avoparcin¹². Teikoplanin lze odštěpením jeho cukerných částí převést na tzv. teikoplanin aglykon, který má v některých případech ještě lepší separační výsledky, hlavně při dělení aminokyselin⁷. Tyto glykopeptidy mají ve své struktuře velké množství chirálních center a funkčních skupin zprostředkovávajících celou řadu potřebných interakcí⁹. Použít se tedy dají při separaci neutrálních, kyselých i zásaditých vzorků. Předností MA je jejich dobrá stabilita ve všech separačních módech, slabší stránkou je nižší rozlišení. V HPLC se MA obvykle kovalentně váží na silikagelový nosič, a tak vytvářejí široce použitelné stacionární fáze¹².

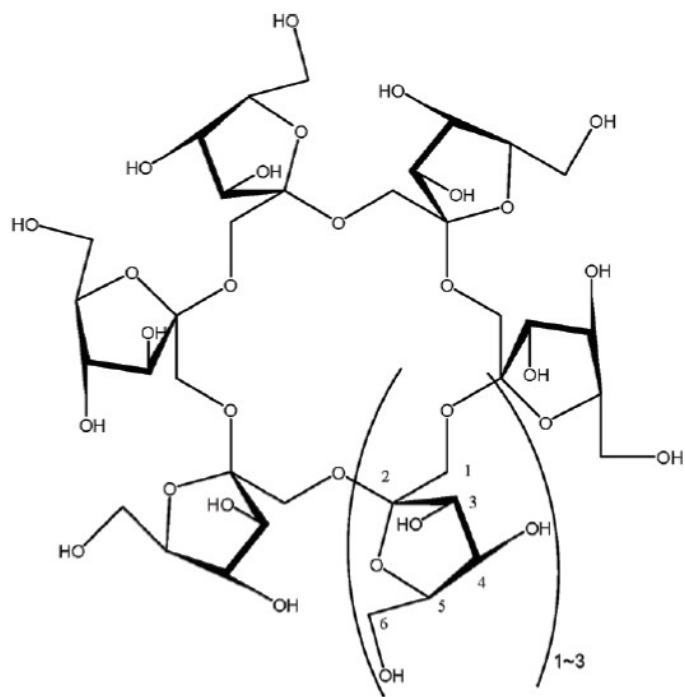
3.3.4 Proteinové CSP

Pro přípravu chirálních stacionárních fází se dá využít i látek jako jsou proteiny, například lidský sérový albumin (HSA), hovězí sérový albumin (BSA), avidin, ovomukoid a další⁹. Proteiny mají schopnost tvořit trojrozměrnou strukturu, která vytváří stereoselektivní prostředí pro separaci enantiomerů. Při práci s proteinovými CSP je vhodné vodné prostředí, jelikož organická rozpouštědla mohou změnit konformaci chirálního selektoru, a tím znemožnit separaci⁸.

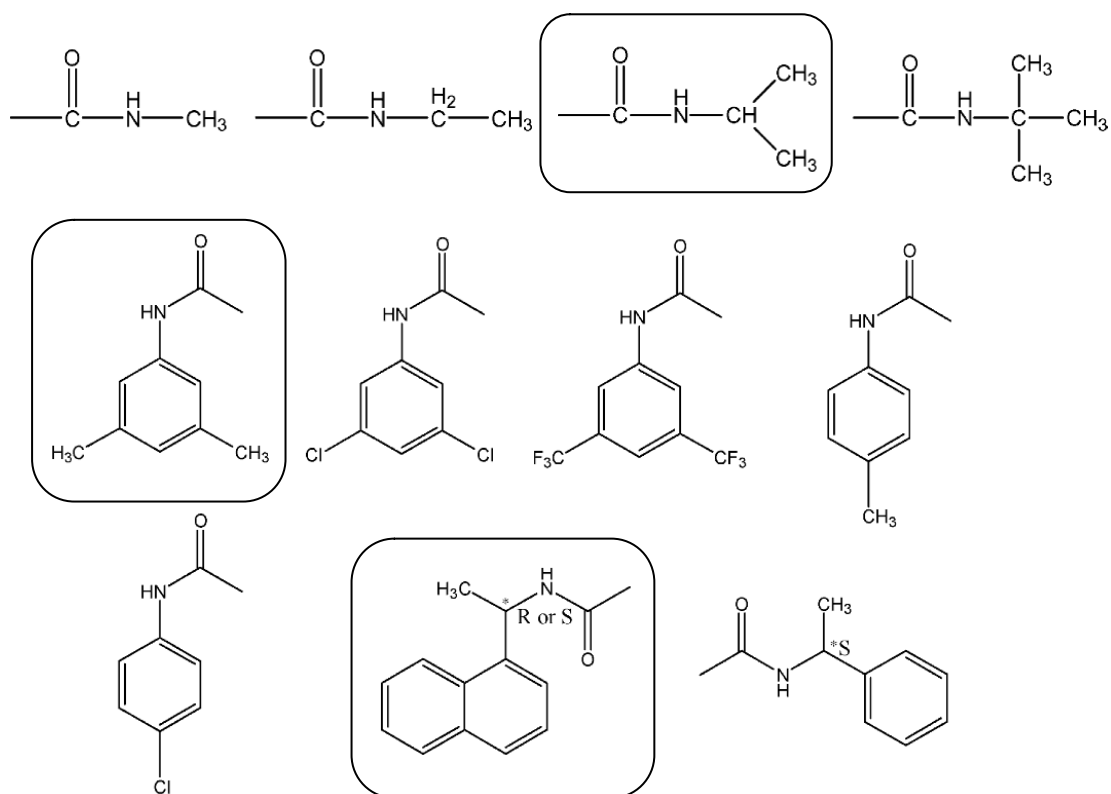
3.3.5 Cyklofruktanové CSP

Cyklofruktany (CF) použité v této bakalářské práci (obr. 3.2) tvoří poměrně malou skupinu makrocyclických oligosacharidů. Skládají se z šesti, sedmi i více D-fruktofuranosových jednotek. Pro tyto molekuly používáme označení CF6, CF7 atd.¹³. Každá z fruktofuranosových jednotek vlastní čtyři stereogenní centra a tři hydroxylové skupiny, které jsou často využity pro derivatizaci¹⁴.

Pro separaci enantiomerů se využívá částečně derivatizovaných cyklofruktanů, jelikož po jejich derivatizaci dochází k narušení vnitřních molekulových vodíkových vazeb a jádro sloučeniny je tak přístupnější novým interakcím. K derivatizaci můžeme využít mnoho různých skupin viz obr. 3.3, ze kterých se nejlépe osvědčil izopropyl, dimethylfenyl a R-naftylethyl. Nejčastěji se tyto CSP používají v normálním separačním módu, tj. s nepolárními organickými rozpouštědly jako mobilními fázemi¹⁵.



Obr. 3.2 Struktura cyklofruktanu



Obr. 3.3 Alifatické a aromatické derivatizační skupiny

3.4 Analyzované látky

3.4.1 Získání čistých enantiomerů aminokyselin v praxi

Získat čisté enantiomery lze dvěma způsoby. Můžeme provést přímo syntézu vedoucí ke vzniku čistého enantiomeru nebo separovat enantiomery ze směsi. Efektivnější cesta však vede přes enantioselektivní syntézu^{1,7}.

3.4.1.1 *Enantioelektivní syntéza*

Tato metoda je výhodnější než syntéza racemátu, kdy pak 50% výtěžku tvoří nežádoucí enantiomer. Pomocí chirálního katalyzátoru, který udrží molekulu substrátu dočasně v asymetrickém prostředí, je podpořen vznik žádaného enantiomeru. Mezi nejpoužívanější chirální katalyzátory patří (R,R)-1,2-bis(o-anisylfenylfosfano)ethan tzv. DiPAMP, kde zdrojem asymetrie je trisubstituovaný atom fosforu⁷.

3.4.1.2 *Dělení enantiomerů*

Rozdělení enantiomerů aminokyselin dosáhneme nepřímým postupem převedením jejich aminoskupiny na amid. Vzniklé amidy pak reagují s jedním enantiomerem chirálního aminu za vzniku diastereoizomerních solí, které lze po oddělení převést zpět na aminokyselinu hydrolyzou amidové skupiny. Využívá se také enantioselektivní aktivity některých enzymů, které hydrolyticky štěpí pouze jeden enantiomer a druhý nechávají v původní formě⁷.

Přímou separaci AK nám v HPLC umožňují chirální stacionární fáze např. CSP na bázi makrocyclických antibiotik¹⁶, CSP na bázi polysacharidů¹⁷, polymerní CSP s vtištěnými templáty¹⁸, ligandově-výměnné CSP¹⁹, nebo i CSP na bázi derivátů alkaloidu chininu²⁰.

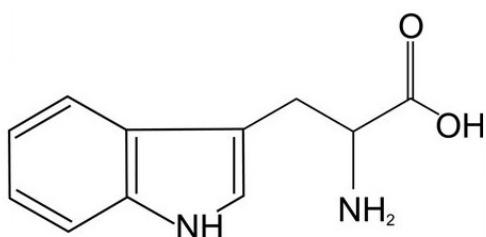
3.4.2 Tryptofan a jeho deriváty

3.4.2.1 Tryptofan

Aminokyselina tryptofan (obr. 3.4) pro nás není pouze nepostradatelnou živinou, ale hraje další významné role v našem organismu. L-tryptofan je například prekurzorem pro syntézu serotoninu, což je důležitý neurotransmitter, avšak jeho zrcadlový obraz D-tryptofan je inaktivní²¹.

Struktura tryptofanu obsahuje aromatický kruh, který funguje jako chromofor absorbující záření o vlnové délce mezi 260 až 300 nm. Této vlastnosti se využívá při jeho stanovování nebo sledování koncentrace bílkovin, kterých je tato AK součástí⁴.

Tryptofan řadíme společně s argininem, glutaminem, cysteinem, prolinem a leucinem do skupiny tzv. funkčních aminokyselin. Ty se podílejí na řízení hlavních metabolických drah v organismu důležitých pro růst, reprodukci a imunitu. Jako doplňky stravy se dají tyto AK využít také ke zmírnění zdravotních potíží²².

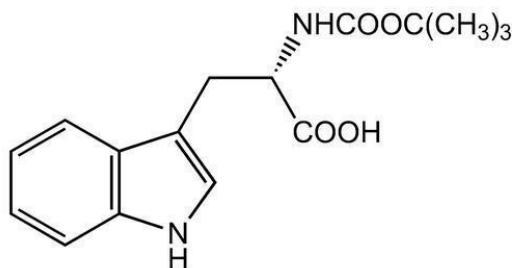


Obr. 3.4 Struktura tryptofanu

3.4.2.2 N-BOC-L-tryptofan

N-BOC-L-tryptofan (obr. 3.5) našel v roce 2009 díky skupině japonských vědců jedinečné využití k přípravě 1-butyl-tryptofanu, u kterého byly prokázány inhibiční účinky na růst tumorových buněk²³.

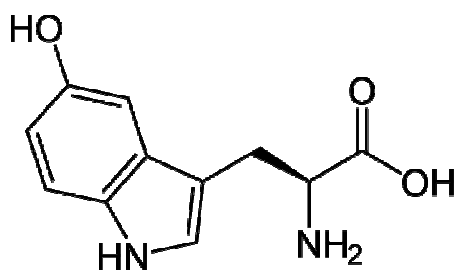
Separovat enantiomery *N*-BOC-tryptofanu je možné např. pomocí HPLC s vtištěnými polymery. Byl použit ethylenglykol dimethakrylátu (EDMA), který dokázal interagovat pouze s L-enantiomerem a tak jej oddělit²⁴.



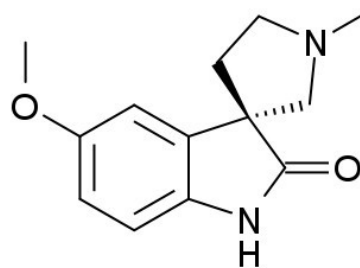
Obr. 3.5 Struktura *N*-BOC-L-tryptofanu

3.4.2.3 5-hydroxy-L-tryptofan

Další derivát tryptofanu, 5-hydroxy-L-tryptofan (obr. 3.6), je doposud jediným známým zdrojem pro syntézu alkaloidu horsifilinu (obr. 3.7), který je produkován rostlinou *Horsfieldia superba* a mohl by být využit ve farmacii pro své analgetické účinky²⁵.



Obr. 3.6 Struktura 5-hydroxy-L-tryptofanu

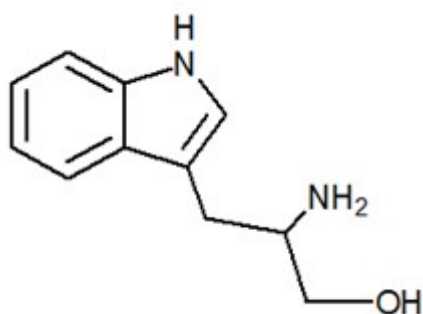


Obr. 3.7 Struktura horsifilinu

3.4.2.4 Tryptofanol

Tryptofanol (obr. 3.8) má dnes velký význam pro farmaceutický průmysl. Jeho L-enantiomer se využívá jako chirální prekurzor pro syntézu některých alkaloidů²⁶.

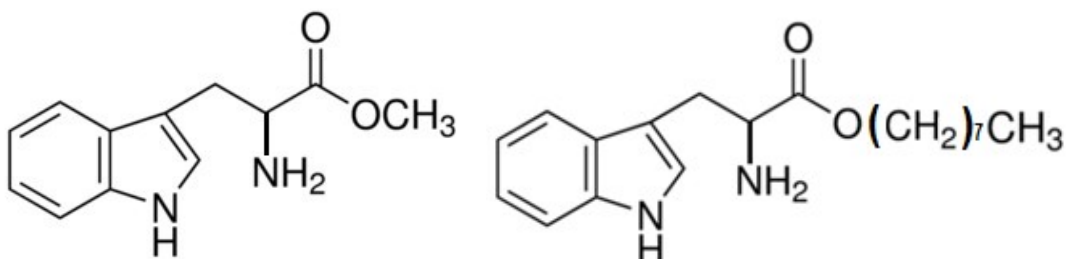
Pro separaci enantiomerů tryptofanolu byla též skupinou odborníků z Texasu použita chirální stacionární fáze -izopropylem derivatizovaného cyklofruktanu, se kterou bylo dosaženo nadějných výsledků¹⁵.



Obr. 3.8 Struktura tryptofanolu

3.4.2.5 Estery tryptofanu

Tryptofan methyl ester (obr. 3.9) nachází využití při syntéze nových látek, které mají velký potenciální význam pro svou biologickou aktivitu. Jednou z těchto látek je acetonitrilokarbonyltryptofan methyester, který je nadějným kandidátem pro syntézu dále využitelných indolových derivátů²⁷.



Obr. 3.9 Struktura tryptofan methyl esteru Obr. 3.10 Struktura tryptofan oktyl esteru

Tryptofan oktyl ester (obr. 3.10) hraje důležitou roli jako modelová látka pro imobilizaci tryptofanu na membránu²⁸.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a pomůcky

Kapalinový chromatograf

Pumpa: Waters 1525 Binary HPLC pump (Milford, USA)

Detektor: Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Milford, USA)

Autosampler: Waters 717_{plus} Autosampler (Milford, USA)

Kolona: LARIHC CF6-RN (Arlington, USA)

Počítačový program: Breeze (Milford, USA)

Injekční stříkačka: objem 20 ml, P-LAB (Praha, Česká republika)

Jednorázová stříkačková fritra: Watrex (Praha, Česká republika)

Váhy: METTLER AE 240 (Greifensee, Švýcarsko)

Ultrazvuková lázeň: ELMASONIC, P-LAB (Praha, Česká republika)

4.2 Použité chemikálie

Hexan (čistota $\geq 97,0\%$), Chromasolv®Riedel-de Haën, SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA

2-Propanol (čistota 99,9%), Chromasolv®Riedel-de Haën, SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA

Kyselina trifluorooctová (99%) Chromasolv®Riedel-de Haën, SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA

Triethylamin (99%) Chromasolv®Riedel-de Haën, SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA

Methanol (99,9%) Chromasolv®Riedel-de Haën, SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA

Deionizovaná voda

4.3 Příprava vzorků a mobilní fáze

Pro měření byly připraveny vzorky o koncentraci 1 mg/ml. *N*-BOC-DL-tryptofan, DL-tryptofan methyl ester, DL-tryptofan butyl ester, DL-tryptofan oktyl ester, DL-tryptofan benzyl ester a DL-tryptofanol byly rozpuštěny pouze v methanolu a vzorky DL-tryptofan, 5-fluoro-DL-tryptofan a 5-hydroxy-DL-tryptofan rozpuštěny v methanolu a deionizované vodě v objemovém poměru 4:1. Rozpuštění bylo dosaženo v ultrazvukové lázni. Vzorky byly skladovány v lednici.

Při separaci byly testovány různé poměry hexanu/2-propanolu (HEX/IPA) a přídavky modifikátorů kyseliny trifluoroctové (TFA) a triethylaminu (TEA). Mobilní fáze (MF) byla před každým měřením umístěna na 20 minut do ultrazvukové lázně a tím odvzdušněna.

4.4 Podmínky separace

Pro separaci byla použita chirální stacionární fáze na bázi cyklofruktanu CF6 derivatizovaného *R*-naftylethylem. Kolona byla termostatována na teplotu 25 °C. Měření probíhalo v normálním separačním módu.

Parametry měření: průtoková rychlost mobilní fáze 1ml/min

tlak 3 407-5 200 kPa (34-52 bar) dle druhu použité mobilní fáze

detekce při vlnové délce $\lambda=254$ nm a $\lambda=280$ nm

Hodnota t_M byla určena pomocí methanolu.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem práce bylo najít podmínky pro separaci enantiomerů výše zmíněných analytů. Byly studovány vlivy složení mobilní fáze (poměr HEX/IPA) a přidavku různých minoritních modifikátorů (TFA, TEA) na retenci, rozlišení a symetrii píku.

5.1 Vliv složení mobilní fáze na enantioseparaci

5.1.1 Mobilní fáze s proměnným poměrem HEX/IPA

Jako vhodný přídavek TFA byl na základě předchozích studií zvolen objem 0,05 ml na 100 ml mobilní fáze HEX/IPA (v/v). Složení MF, konkrétně poměr HEX/IPA (v/v), bylo měněno. Přídavek TFA byl po celou dobu měření konstantní. Proběhla sada měření pro různé poměry HEX/IPA/TFA : 60/40/0,05 (v/v/v), 70/30/0,05 (v/v/v), a 80/20/0,05 (v/v/v). Získané hodnoty retenčního faktoru, selektivity a rozlišení jsou uvedeny v tabulce 5.1.

Tab. 5.1 Vliv zvyšování obsahu hexanu v mobilní fázi na enantioseparaci

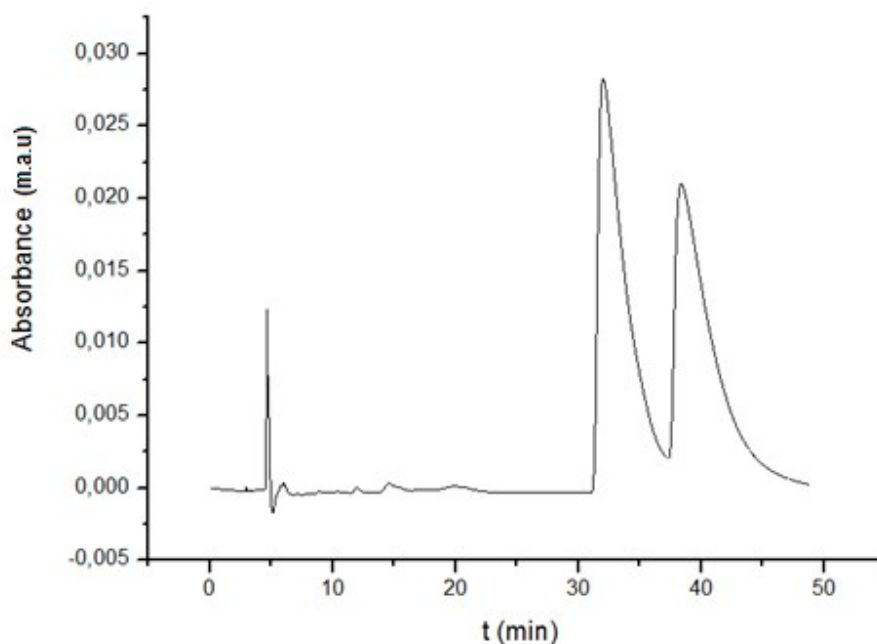
VZORKY	HEX/IPA/TFA								
	60/40/0,05			70/30/0,05			80/20/0,05		
	k ₁	α	R	k ₁	α	R	k ₁	α	R
DL-tryptofan	0,29	1,00	0,00	0,35	1,00	0,00	0,49	1,00	0,00
N-BOC-DL-tryptofan	0,58	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,99	1,00	0,00
DL-tryptofanol	9,91	1,22	1,24	22,90	1,19	1,18	*		
5-hydroxy-DL-tryptofan	11,20	1,14	0,56	26,20	1,15	0,78	*		
5-fluoro-DL-tryptofan	6,60	1,00	0,00	12,40	1,00	0,00	23,40	1,07	0,61
DL-tryptofan methyl ester	6,56	1,13	0,71	13,50	1,13	0,79	21,60	1,14	0,78
DL-tryptofan butyl ester	3,38	1,09	0,79	5,71	1,10	0,66	10,60	1,09	0,97
DL-tryptofan oktyl ester	2,72	1,08	0,67	4,02	1,09	0,77	7,48	1,09	0,76
DL-tryptofan benzyl ester	6,98	1,13	0,69	12,30	1,12	0,80	23,10	1,13	0,79

V tabulce 5.1 označuje k₁ retenční faktor dříve elujícího píku, α selektivitu a R rozlišení.

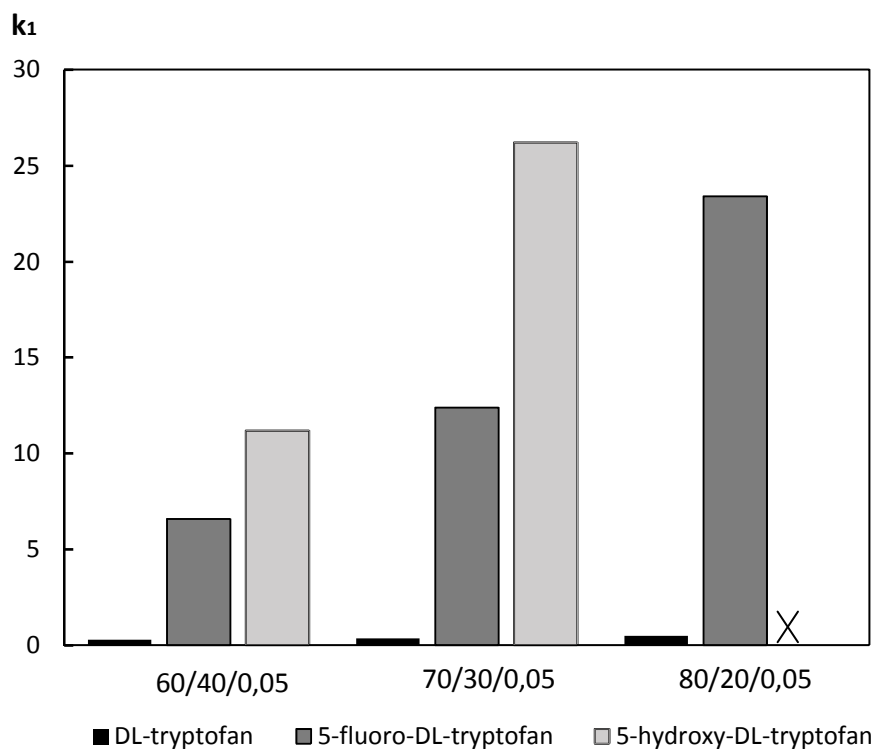
* Analyt neeluoval do 90 minut.

Se zvyšujícím se obsahem hexanu v MF výrazně vzrůstá u všech analytů hodnota retenčního faktoru a doba separace se tak značně prodlužuje. Delší retenci však většinou neodpovídá zlepšení separace (hodnoty rozlišení se příliš nezvýšily). Dva vzorky nevykazují žádný náznak separace a to DL-tryptofan a *N*-BOC-DL-tryptofan. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo u DL-tryptofanolu, za což je pravděpodobně odpovědná jeho hydroxylová skupina; chromatogram lze vidět na obr. 5.1. Vliv přítomnosti substituentu benzenového jádra tryptofanu na retenci dobře ukazuje obr. 5.2. Z obrázku je patrné, že tyto substituenty významně přispívají k retenci. Zatímco DL-tryptofan je na CSP zadržován velmi málo, jeho 5-F- a především 5-OH- derivát vykazují násobně silnější interakci se stacionární fází.

Jako nejvhodnější MF vzhledem k době separace a hodnotě rozlišení bylo zvoleno složení 60/40/0,05 (v/v/v).



Obr. 5.1 Chromatogram separace DL-tryptofanolu. CSP na bázi cyklofruktanu derivatyzovaného R-naftylethylem, složení MF HEX/IPA/TFA v poměru 60/40/0,05 (v/v/v), průtok MF 1 ml/min, teplota 25 °C, detekce $\lambda=280$ nm



Obr. 5.2 Závislost retenčního faktoru (k_1) na různém složení MF pro odlišné substituenty benzenového jádra tryptofanu.

X Analyt neeluoval do 90 minut.

5.1.2 Mobilní fáze s proměnným přídávkem TFA

Další měření probíhalo v mobilních fázích s poměrem HEX/IPA/TFA o hodnotách 60/40/0,1 a 60/40/0,2. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.2. Na separaci DL-tryptofanu a *N*-BOC-DL-tryptofanu neměl zvyšující se přídavek kyselého modifikátoru žádný vliv. Separace esterů tryptofanu probíhala téměř shodně jako s nejnižším přídávkem a nebylo znát žádné výrazné zlepšení dělení viz obr. 5.3. Z diagramu nelze vystopovat žádný zevšeobecnující trend. Příznivé bylo zvyšování přídávku TFA pro separaci 5-fluoro-DL-tryptofanu, který dosáhl nejvyššího rozlišení při přídávku 0,2 TFA, stejně

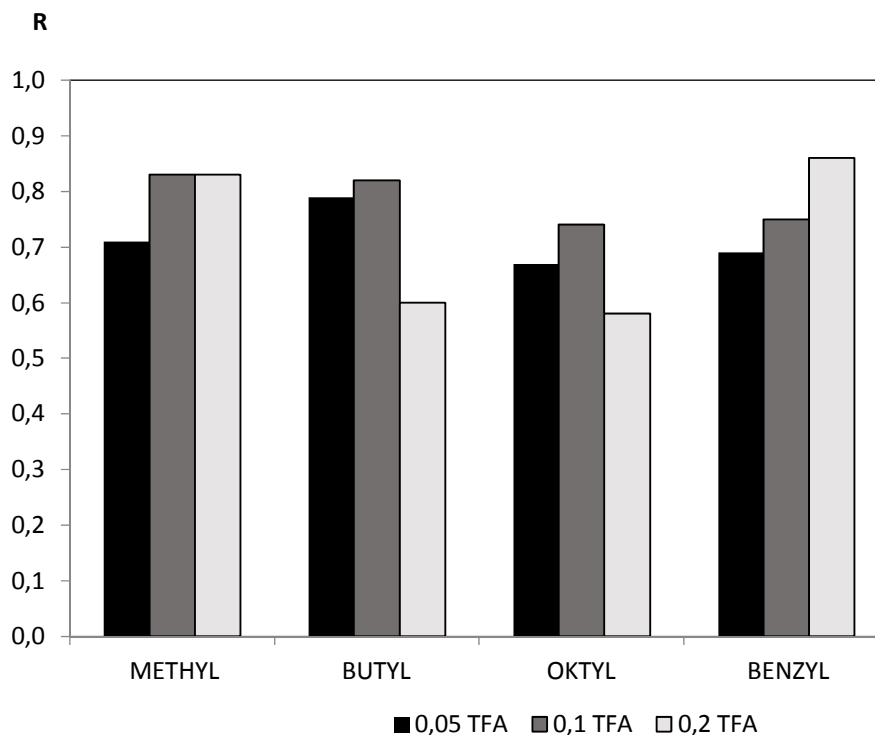
jako 5-hydroxy-DL-tryptofan. Kvalita separace DL-tryptofanolu se s přidavkem kyseliny téměř nezměnila. Je nutné konstatovat, že k rozdělení enantiomerů až na základní linii nedošlo ani u jednoho z analytů.

Tab. 5.2 Vliv zvyšování přidavku TFA na retenci a separaci

VZORKY	HEX/IPA/TFA								
	60/40/0,05			60/40/0,1			60/40/0,2		
	k ₁	α	R	k ₁	α	R	k ₁	α	R
DL-tryptofan	0,29	1,00	0,00	0,29	1,00	0,00	0,29	1,00	0,00
N-BOC-DL-tryptofan	0,58	1,00	0,00	0,61	1,00	0,00	0,59	1,00	0,00
DL-tryptofanol	9,91	1,22	1,24	11,13	1,21	1,32	11,17	1,14	1,30
5-hydroxy-DL-tryptofan	11,20	1,14	0,56	*			7,90	1,16	0,86
5-fluoro-DL-tryptofan	6,60	1,00	0,00	5,24	1,08	0,45	4,62	1,08	0,57
DL-tryptofan methyl ester	6,56	1,13	0,71	7,31	1,12	0,83	7,22	1,12	0,83
DL-tryptofan butyl ester	3,38	1,09	0,79	3,63	1,09	0,82	3,52	1,09	0,60
DL-tryptofan oktyl ester	2,72	1,08	0,67	2,84	1,08	0,74	2,77	1,08	0,58
DL-tryptofan benzyl ester	6,98	1,13	0,69	7,54	1,12	0,75	7,26	1,13	0,86

V tabulce 5.2 označuje k₁ retenční faktor dříve eluujícího píku, α selektivitu a R rozlišení

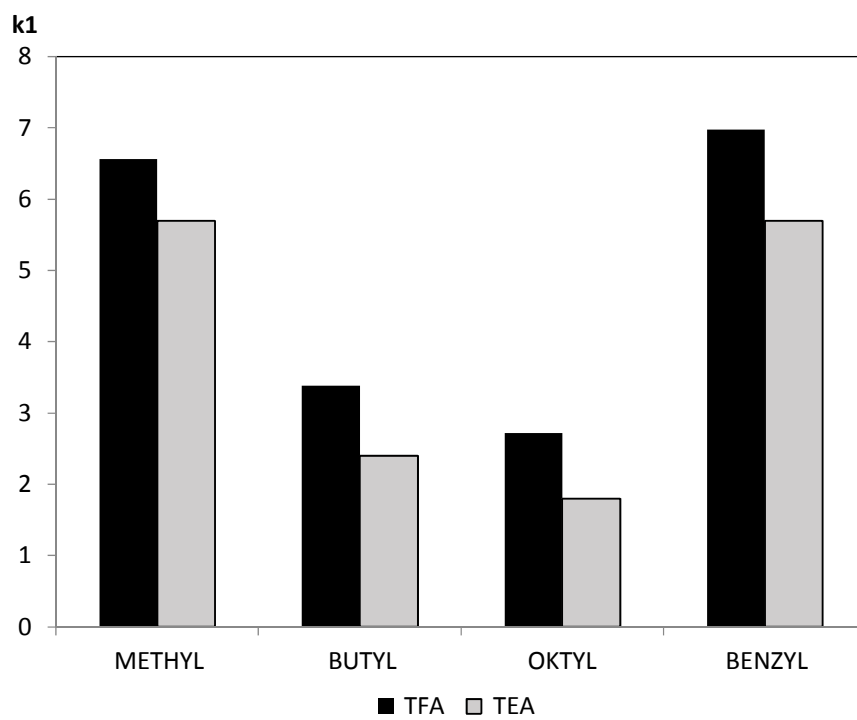
*Analyt neeluoval do 90 minut



Obr. 5.3 Závislost rozlišení jednotlivých esterů na přidavku TFA v MF o složení HEX/IPA/TFA v poměru 60/40/TFA (v/v/v).

5.1.3 Mobilní fáze s bazickým modifikátorem TEA

Přídavek bazického modifikátoru do mobilní fáze HEX/IPA/TEA v poměru 60/40/0,05 (v/v/v) nepřinesl žádné kladné výsledky. Enantiomery esterů nejevily žádné náznaky dělení. Pro ostatní vzorky byl čas separace delší než 90 minut a měření bylo přerušeno. V porovnání s TFA nemá přídavek TEA žádný pozitivní vliv na separaci. U esterů došlo ke snížení hodnot k_1 , ale bez náznaků dělení. Zajímavý trend ukazují hodnoty retenčních faktorů esterů tryptofanu na obr. 5.4. Retence poměrně výrazně klesá s rostoucí délkou alkylového řetězce. Přitom je vždy vyšší, je-li do MF přidána TFA. Tyto výsledky ukazují, že hydrofobicita nemá pozitivní vliv na retenci ani enantioseparaci, což je kompatibilní s interakcemi, které se uplatňují v normálním separačním módu. Na vyšší retenci benzyl esteru mají pravděpodobně vliv π - π interakce benzylu s derivatizační skupinou CF₆.



Obr. 5.4 Závislost retence na druhu přidaného modifikátoru pro estery tryptofanu.

6. ZÁVĚR

K enantioselektivní separaci derivátů tryptofanu byla použita stacionární fáze na bázi cyklofruktanu derivatizovaného R-naftylethylem. Byly studovány vlivy složení MF na retenci a enantioseparaci.

Zvyšování zastoupení nepolárního hexanu v MF sice nepatrně vylepšuje rozlišení, ale doba analýzy se nepříjemně prodlužuje.

Jako vhodný modifikátor MF se ukázal přídavek TFA, který podpořil separaci analytů, naopak bazický TEA neměl na dělení pozitivní vliv.

Jako nejvhodnější MF pro separaci této skupiny tryptofanových derivátů byla nalezena MF o poměru HEX/IPA/TFA o hodnotách 60/40/0,05 (v/v/v).

Nejlepšího rozdělení bylo dosaženo u vzorků DL-tryptofanolu a 5-hydroxy-DL-tryptofanu. Vzorky DL-tryptofanu a *N*-BOC-DL-tryptofanu se nepodařilo ani částečně oddělit v žádném testovaném složení MF.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. M.Doležalová, M.Tkaczyková ; Chem. Listy 94 (2000) 994
2. E. Tesařová; Pražské analytické centrum inovací, 2006-2007, 13
3. Z.Deáková, Z.Đuračková, J. Lehotay; Chem. Listy 108 (2014) 436
4. Z. Vodrážka; Biochemie 1, Academia Praha 1992
5. V.Pacáková, K. Štulík; Vysokoučinná kapalinová chromatografie, SPN Praha 1986
6. O.Červinka; Chem. Listy 93 (1999) 294
7. J.McMurry; Organická chemie, Vutium Brno 2007
8. E. Tesařová; Pražské analytické centrum inovací, 2006-2007, 31
9. A. Cavazzini, L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti, F. Dondi; Anal. Chim. Acta 706 (2011) 205
10. I.Ali, K. Kumerer, H. Y. Aboul-Enein; Chromatographia 63 (2006) 295
11. T.T. Ong, R.Q. Wang, I. W. Muderawan, S.Ch.Ng; J. Chromatogr.A, 1182 (2008) 136
12. J.Đungelová, J.Lehotay, T. Rojkovičová; Chem. Anal. (Warsaw) 49 (2004) 1
13. L.Janečková, K. Kalíková, J. Vozka, D.W.Armstrong, Z. Bosáková, E. Tesařová; J. Sep. Sci. 34 (2011) 2639
14. K.Kalíková, L. Janečková, D.W.Armstrong, E. Tesařová; J. Chromatogr., A, 1218 (2011), 1393
15. P. Sun, Ch. Wang, Z.S. Breitbach, Y. Zhang, D.W. Armstrong; Anal.Chem. 81 (2009) 10215
16. I.Illisz, R. Berkecz, A. Péter; J. Sep. Sci. 29 (2006) 1305
17. B.H.Kim, S.U.Lee, D.Ch.Moon; Chirality 24 (2012) 1037
18. A. Dzgoev, K. Haupt; Chirality 11 (1999) 465
19. T. Miyazawa, H. Minova, K. Imagawa, T. Yamada; Chromatographia 60 (2004) 45
20. R. Sardella, R. Lämmerhoffer, B. Natalini, W. Lindner; Chirality 20 (2008) 571
21. E.G. Sánchez, A.N. Díaz, A.G. Pareja; Chromatographia 42 (1996) 494
22. G. Wu; Amino acids 37 (2009) 1
23. T.Sun,Z.L. Li, H.Tian, S.Ch. Wang, J.Cai; Molecules 14 (2009) 5339
24. J. Haginaka, Ch. Kagawa; Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 1907
25. C. Pellegrini, Ch. Strässler, M. Weber, H. J. Borschberg; Tetrahedron: Asymmetry, 5 (1994) 1979
26. S. Caccamese, S. Bianca, G.T. Carter; Chirality 19 (2007) 647

27. R.M. Mohareb, N.A. Louca, G.A. Elmegeed, H.Y. Hana; J. Chil. Chem. Soc. 54(2009) 175

28. A.Arora-Sharawat, A. Chattopadhyay; Biophys. Chem. 129 (2007) 172