

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie**

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie

Autoreferát dizertační práce



Charakterizace nových chirálních separačních systémů pro použití v HPLC

Jiří Vozka

Školitel: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Školitel-konzultant: RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha, 2014

Předkládaná dizertační práce shrnuje výsledky získané během mého doktorského studia ve Skupině elektroforetických a chromatografických separačních metod (ECHMET) na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Práce byla financována v rámci řešení následujících projektů: GA UK, č. p. 356411, KONTAKT LH11018, CEEPUS CIII-RO-0010-08-1314-M-69316 a výzkumného záměru MŠMT, projekt MSM0021620857.

Souhrn

Dizertační práce je zaměřena na fyzikálně-chemickou charakterizaci interakčních mechanismů chirálních stacionárních fází na bázi derivatizovaných cyklofuktanů (CF CSP). Správná interpretace retenčních a enantiodiskriminačních interakcí usnadní vývoj, validaci a optimalizaci enantioselektivních metod využívajících tyto fáze.

Nejdříve byly studovány interakční mechanismy tří komerčně dostupných CF CSP v podmínkách normálního separačního módu kapalinové chromatografie. Jednalo se o stacionární fáze na bázi dimethylfenyl karbamátu cyklofuktanu 7 (DMP-CF7 CSP), *R*-naftylethyl karbamátu cyklofuktanu 6 (RN-CF6 CSP) a izopropyl karbamátu cyklofuktanu 6 (IP-CF6 CSP). Jako výchozí přístup byl zvolen model lineárních vztahů volných energií (LFER). Na základě tohoto modelu byly jako hlavní interakce přispívající v různé míře k retenci ve všech separačních systémech s CF CSP určeny: schopnost poskytovat vodík pro tvorbu vodíkové interakce a dipolarita/polarizibilita, disperzní interakce pak retenci v různé míře snižují. Pro objasnění vlivu sacharidového skeletu na chirální separace byly následně CF CSP porovnány s cykloextrinovými analogy. CF CSP prokázaly v podmínkách normálního módu mimořádnou enantioselektivitu zejména pro deriváty binaftolu a různé aminy.

V následující části byl zkoumán separační potenciál CF CSP, konkrétně DMP-CF7 CSP, v podmínkách superkritické fluidní chromatografie. Pomocí modelu LFER byly odhaleny rozdílné distribuce retenčních interakcí v kapalinové a superkritické chromatografii a byl také demonstrován jejich vliv na chirální separace.

Přestože se CF CSP používají zejména v normálním či polárně-organickém módu kapalinové chromatografie, byl prokázán jejich značný enantioselektivní potenciál také v reverzním separačním módu. Navíc byl studován efekt přidavku barnatých iontů do mobilní fáze, který významně ovlivňuje enantioselektivitu separačního systému na bázi CF pro určité skupiny analytů.

Praktické využití poznatků základního výzkumu je konkrétně ukázáno na dvou příkladech vývoje enantioseparačních metod pro stanovení léčiv.

Obsah

Souhrn.....	4
Obsah	5
1 Úvod.....	6
2 Cíle práce	7
3 Chromatografické separační systémy.....	8
3.1 Základní srovnání HPLC a SFC	8
3.2 Charakterizace chromatografických systémů	9
4 CSP používané v HPLC a SFC	10
4.1 CSP založené na derivatizovaných cyklofruktanech	10
5 Výsledky a diskuze	12
5.1 Publikace II - Charakterizace chirálních stacionárních fází na bázi derivatizovaných cyklofruktanů pomocí modelu LFER	12
5.2 Publikace III - Srovnání enantiosektivního potenciálu cyklofruktanových a cykloextrinových chirálních stacionárních fází	13
5.3 Publikace IV - Charakterizace DMP-CF7 CSP v podmínkách SFC - základní porovnání s HPLC systémem	15
5.4 Publikace V - Využití komplexace cyklofruktanového chirálního selektoru s barnatými ionty pro chirální separace v HPLC a CE.....	17
5.5 Publikace VI - Chirální separace chlorthalidonu metodou SFC.....	18
5.6 Publikace VII - Chirální separace citalopramu a jeho prekurzoru citadiolu metodami HPLC a SFC.....	19
6 Závěr	20
Seznam literatury	21
Přílohy.....	23
A. Životopis.....	23
B. Seznam publikací.....	24
C. Seznam konferenčních příspěvků	26

1 Úvod

Chirální separace jsou neodmyslitelné v oblasti potravinářského, agrochemického a zejména farmaceutického průmyslu [1,2]. Jednotlivé formy chirálních látek, v závislosti na typu chiralitě označované jako enantiomery či atropizomery, se svými běžnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi neliší, ale jejich rozdílnost se projeví v chirálním prostředí. Takovým prostředím je například lidské tělo, ve kterém každá z enantiomerních forem může vyvolat odlišnou biologickou odpověď [3-5]. Kromě čichových a chuťových vjemů se rozdílnost může projevit mnohem závažněji, a to zejména u léčiv. Je známo velké množství léků s chirálními aktivními složkami. V některých případech podporují oba enantiomery v různé míře léčebný účinek, v jiných působí proti sobě nebo je jeden enantiomer neaktivní. Nejzávažnější jsou případy, kdy jedna forma účinné látky přímo poškozuje zdraví jedince [3-5].

Ke stanovení resp. separaci, jednotlivých enantiomerů se používají základní separační techniky, jako jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, popř. ultra účinná kapalinová chromatografie, UPLC), kapilární elektroforéza (CE), plynová chromatografie (GC) nebo superkritická fluidní chromatografie (SFC) nejčastěji uspořádané tak, aby přímo vzniklo enantioselektivní prostředí. Enantioseparační systém lze v chromatografických metodách vytvořit přidávkem chirálního selektoru (CS) do mobilní fáze nebo použitím CSP.

Vývoj, optimalizace a následná validace separačních metod jsou časově i finančně náročné procesy. Výběr nevhodnější CSP se v HPLC, v současnosti dominující techniky pro chirální separace, často opírá o experimentální zkušenosti analytického chemika a bývá zdlouhavý. Usnadnění resp. urychlení tohoto procesu přinášejí různé *screeningové* přístupy [6-8], které však nejsou obecné a jsou vyvinuty pouze pro vybrané CSP. Jinou možností poskytují rozsáhlé databáze obsahující již provedené analýzy [9]. Tyto však nemají velký význam např. pro nově syntetizované látky nebo nově připravené CSP. Dalšími významnými a hojně používanými nástroji, které mohou výběr CSP velmi usnadnit a přinést tak nezanedbatelnou časovou i finanční

úsporu, jsou fyzikálně-chemická charakterizace a interpretace základních retenčních a enantiodiskriminačních procesů probíhajících v separačním systému [10].

Předkládaná dizertační práce se zabývá základní charakteristikou CSP na bázi derivatizovaných cyklofruktanů. Enantioselektivní potenciál CF CSP byl studován jak v HPLC, tak v SFC systémech. Fyzikálně-chemická charakterizace interakcí v cyklofruktanových HPLC/SFC systémech, posouzení vlivu sacharidové kostry cyklofruktanového CS na separace a aplikace těchto CSP v jednotlivých separačních módech přispěje k vývoji separačních metod využívajících tyto CSP a významným způsobem zefektivní proces optimalizace.

2 Cíle práce

Cílem práce bylo charakterizovat interakce, které přispívají k retenčnímu a enantiodiskriminačnímu procesu na CF CSP.

Dílní cíle:

- Zjištění a vzájemné porovnání chromatografických interakcí poskytovaných CSP na bázi derivatizovaných CF za použití modelu LFER.
- Porovnání cyklofruktanových CSP s cykloextrinovými analogy. Posouzení vlivu oligosacharidové kostry na enantioselektivní potenciál.
- Charakterizace cyklofruktanových systémů v SFC a jejich základní porovnání s HPLC.
- Posouzení enantiodiskriminačních možností cyklofruktanových CSP v SFC.
- Posouzení enantiodiskriminačních možností cyklofruktanových CSP v reverzním módu HPLC.

3 Chromatografické separační systémy

V rámci předkládané dizertační práce byly CF CSP studovány ve dvou chromatografických systémech, HPLC a SFC. Podkapitola 3.1 obsahuje kromě základního popisu těchto separačních technik také jejich vzájemné srovnání s důrazem na jejich aplikační odlišnosti. Přístup využitý k charakterizaci jednotlivých interakčních mechanismů cyklofruktanových HPLC/SFC systémů je uveden v podkapitole 3.2.

3.1 Základní srovnání HPLC a SFC

V popředí mezi technikami pro separaci enantiomerů je HPLC. Zatímco achirální separační systémy HPLC byly vzhledem ke zvyšujícím se nárokům na analýzy velmi inovovány, vývoj CSP postupuje v tomto ohledu pomaleji. Výrazné urychlení chirálních separací však přináší SFC, která se v současnosti dostává stále více do popředí. Tato separační technika používá jako majoritní složku mobilní fáze superkritickou tekutinu. Superkritické médium obvykle tvoří oxid uhličitý, neboť je relativně levný, netoxický, nehořlavý a jeho kritických hodnot ($T_c = 304,12 \text{ K}$, $p_c = 73,74 \text{ bar}$) [11] lze snadno dosáhnout. Vlastnosti superkritické tekutiny leží mezi vlastnostmi kapalin a plynů. Svoji hustotou a rozpouštěcí kapacitou odpovídá superkritická tekutina kapalinám, zatímco viskozitou a difúzními vlastnostmi odpovídá spíše plynům [11]. Důsledkem těchto unikátních vlastností je nižší tlak v systému, a tedy možnost používat několikanásobně vyšší průtoky mobilní fáze v porovnání s běžnou HPLC bez ztráty separační účinnosti [12]. Aplikace vyšších průtoků, kromě zkrácení doby analýzy, také významným způsobem zkracuje dobu potřebnou pro ekvilibraci SFC systému.

Další výhodou je kompatibilita superkritického oxidu uhličitého se všemi běžně používanými organickými modifikátory a aditivy. Je však nutné poznamenat, že většina SFC separací probíhá vlivem přídatku organického modifikátoru do mobilní fáze v subkritické oblasti. Vlastnosti subkritické a superkritické tekutiny jsou však

v SFC systémech považovány za analogické, a proto nebývají v odborných publikacích tato dvě media odlišována [13].

Kromě do jisté míry nižší variability mobilních fází patří k nevýhodám SFC také náročnější instrumentace. Aby v separačním systému byla superkritická tekutina stabilní, je nutné v celém systému (včetně detektoru) udržovat hodnoty tlaku a teploty nad jejími kritickými hodnotami. Tato podmínka, zejména udržení odpovídajícího tlaku, činila v minulosti značné problémy. Nedostatečná tlaková regulace způsobovala nízké opakovatelnosti analýz. Nicméně technickým vývojem byly původní nedostatky eliminovány a v současné době se SFC jeví jako efektivnější, ekologicky přijatelnější a levnější varianta oproti HPLC [14,15].

3.2 Charakterizace chromatografických systémů

Charakterizace separačních systémů v HPLC/SFC je velmi obtížný úkol. Pro charakterizaci CF CSP byl použit LFER, který je postaven na předpokladu, že změna standardní Gibbsovy energie je lineárně závislá na charakteristikách prostředí [16-19]. Retenční proces - přenos analytu z mobilní fáze do fáze stacionární - je spojen se změnou standardní Gibbsovy energie, a proto na něj může být aplikován model LFER.

Nejpoužívanější rovnice LFER pro HPLC/SFC systémy má tvar

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1)$$

kde $\log k$ reprezentuje dekadický logaritmus retenčního faktoru, členy E, S, A, B, V jsou deskriptory příslušného analytu, člen c je hodnota úseku na ose y a e, s, a, b, v jsou regresní koeficienty [19].

Každý z příspěvků je v rovnici LFER vyjádřen součinem fyzikálně-chemického parametru analytu (deskriptor) a vlivu prostředí na danou interakci (regresní koeficient). Deskriptor E udává rozsah molární refrakce (interakce prostřednictvím n/π -elektronových párů), deskriptor S udává dipolaritu/polarizibilitu (interakce typu dipól-dipól, dipól – indukovaný dipól), deskriptory A a B udávají celkovou nebo

efektivní aciditu a bazicitu vodíkové vazby, deskriptor V udává McGowanův objem solutu (disperzní a kohezivní interakce) [17-19].

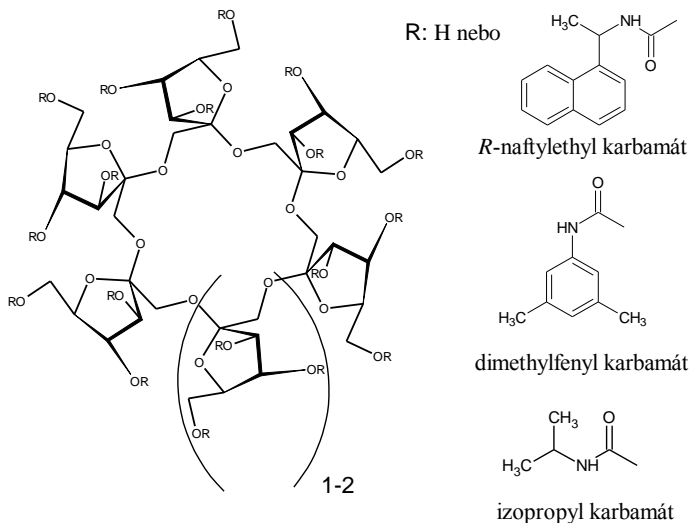
Regresní koeficienty (e , s , a , b , v) se získají multidimenzionální lineární regresí a vyjadřují rozdíl mezi stacionární a mobilní fází ve vztahu k dané interakci.

4 CSP používané v HPLC a SFC

CSP na bázi derivatizovaných CF je věnována podkapitola 4.1. Ostatní CSP a jejich aplikační využití jsou pro HPLC uvedeny v referencích [10,20-22]. Základní přehled CSP a jejich aplikací v SFC jsou shrnuty v referenci [23] a dále v **Publikaci I**, kde je kromě výčtu CSP používaných v SFC a jejich aplikací uveden i základní teoretický rámec SFC, včetně vlastností a interakčních mechanismů této separační techniky.

4.1 CSP založené na derivatizovaných cyklofruktanech

Armstrongova skupina představila v roce 2009 nový typ CS založených na derivatizovaných cyklofruktanech [24]. Cyklofruktany jsou, stejně jako velmi úspěšně používané cyklodextrinové CS, makrocyclické oligosacharidy obecně složené ze šesti či více D-fruktofuranosových jednotek spojených β -(2,1) vazbou. Současné komerčně dostupné CF CSP obsahují CS se šesti či sedmi fruktofuranosovými jednotkami. Obrázek 1 ukazuje základní strukturu cyklofruktanů, a dále jsou na něm zobrazeny tři derivatizační skupiny použité v komerčně dostupných CF CSP. Jak je z obrázku patrné, cyklické spojení fruktofuranosových jednotek vytváří základní *crown*-etherový skelet, který je však pro interakce u nativního cyklofruktanu částečně blokován intramolekulovými vodíkovými vazbami.



Obrázek 1: Struktury cyklofruktanových chirálních selektorů.

Na rozdíl od cyklodextrinů cyklofruktany netvoří hydrofobní kavitu [24]. Molekulové uspořádání významným způsobem ovlivňuje enantioselektivní vlastnosti cyklofruktanů. Zatímco nativní cyklofruktany vykazují omezenou selektivitu pro separaci enantiomerů, derivatizací hydroxylových skupin dojde k narušení intramolekulových vodíkových vazeb a následnému rozevření struktury selektoru, čímž se zpřístupní *crown-etherový* kruh a významně se zlepší enantioselektivní vlastnosti. Typ derivatizační skupiny zásadním způsobem ovlivňuje selektivitu CF CSP vůči konkrétním skupinám analytů. Alifatické derivatizační skupiny zvyšují enantioselektivitu pro separaci aminů [25]. Aromatické derivatizační skupiny přispívají k retenci dalšími typy interakcí, především π - π interakcemi, a významným způsobem zlepšují enantioselektivitu pro celou řadu látek [26].

Přestože jsou CF CSP multimodální, jejich uplatnění se v současnosti nachází především v normálním a polárně-organickém módu HPLC [27-30]. V reverzním módu HPLC jsou zatím CF CSP využívány minimálně [31,32]. Dále byly publikovány

aplikace cyklofruktanů jako CS pro GC [33], CE [34,35] nebo jako stacionární fáze pro HILIC systémy [36-38].

5 Výsledky a diskuze

5.1 Publikace II - Charakterizace chirálních stacionárních fází na bázi derivatizovaných cyklofruktanů pomocí modelu LFER

Derivatizace nativního cyklofruktanu zásadním způsobem změni jeho retenční a enantioselektivní vlastnosti. **Publikace II** se zabývá charakterizací a vzájemným porovnáním interakčních mechanismů tří komerčně dostupných CF CSP pomocí modelu LFER v podmínkách normálního módu HPLC. Porovnání DMP-CF7 CSP, RN-CF6 CSP a IP-CF6 CSP bylo provedeno ve dvou mobilních fázích tvořených hexanem (hex) a propan-2-olem (IPA), příp. kyselinou trifluorooctovou (TFA) o složení hex/IPA 80/20 (v/v) a hex/IPA/TFA 80/20/0,5 (v/v/v) za použití optimálních LFER modelů, které uvažují pouze statisticky významné interakce.

Na všech zkoumaných CSP byly jako statisticky významné určeny: regresní koeficient b (popisující rozdíl mezi stacionární a mobilní fází v působení jako donor vodíku pro tvorbu vodíkových vazeb), koeficient s (popisující rozdíl mezi stacionární a mobilní fází v dipolaritě/polarizibilitě) a koeficient v (popisující rozdíl v disperzních interakcích). První dva koeficienty dosahují ve všech zkoumaných systémech kladných hodnot, tedy odpovídající interakce jsou preferované se stacionární fází a přispívají ke zvýšení retence. Třetí koeficient dosahoval ve všech testovaných systémech záporných hodnot, což je typické pro podmínky normálního módu HPLC, ve kterém je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní.

Nejvyšší hodnota koeficientu b byla zjištěna pro DMP-CF7 CSP, což se jeví jako důsledek struktury základního makrocyklu této CSP, který obsahuje sedm fruktofuranosových jednotek a poskytuje tedy více interakčních míst oproti CSP, které obsahují šest fruktofuranosových jednotek. Hodnoty koeficientů b pro IP-CF6 CSP a RN-CF6 CSP jsou srovnatelné. Okyselením mobilní fáze hodnoty koeficientů b všech

zkoumaných CSP mírně poklesly, neboť přítomnost kyseliny v mobilní fázi zvýší možnost tvorby vodíkové interakce v této fázi.

Na základě hodnot koeficientů v , reflektujících disperzní interakce, se jeví nejméně polární DMP-CF7 CSP, následovaná IP-CF6 CSP a nejpolárnější RN-CF6 CSP. Stejný trend byl pozorován i v okyselené mobilní fázi. Možným vysvětlením mohou být sterické vlivy, které se uplatňují při derivatizaci jednotlivých CS.

Koeficient s reprezentující rozdíl mezi fázemi v dipolaritě/polarizibilitě nabývá kladných hodnot pro všechny zkoumané systémy. Okyselení mobilní fáze zapříčinilo nárůst hodnot koeficientů s pro IP-CF6 CSP a DMP-CF7 CSP, zatímco pro RN-CF6 CSP hodnota tohoto koeficientu klesla. Výsledky modelu LFER naznačují, že se TFA adsorbuje na jednotlivé CSP v různé míře. Stericky objemný naftylethylový substituent brání sorpci TFA na CSP oproti ostatním CSP s menšími substituenty, což reflektuje pokles koeficientu s .

5.2 Publikace III - Srovnání enantioselektivního potenciálu cyklofruktanových a cyklodextrinových chirálních stacionárních fází

Základní objasnění vlivu prostorového uspořádání CF CSP bylo provedeno v **Publikaci III** srovnáním se známějšími CSP na bázi derivatizovaných cyklodextrinů (CD CSP) v podmínkách normálního módu HPLC. Celkem byly vzájemně porovnávány čtyři komerčně dostupné CSP. DMP-CF7 CSP tvořená sedmi fruktofuranosovými jednotkami derivatizovanými dimethylfenyl karbamátovými skupinami byla srovnána s DMP-CD CSP, jejímž základem je cyklodextrin tvořený sedmi glukopyranosovými jednotkami se stejnou derivatizační skupinou. Druhým srovnávaným párem byly RN-CF6 CSP a RN-CD CSP, které mají stejnou derivatizační skupinu, *R*-naftylethyl karbamát, ale liší se počtem sacharidových jednotek. CF CSP je v tomto páru tvořena šesti fruktofuranosovými jednotkami, zatímco CD CSP tvoří sedm glukopyranosových jednotek. Sadu srovnávacích analytů tvořily binaftol a jeho deriváty, které vykazují axiální chiralitu, a dále tři páry strukturně odlišných sloučenin s centrální chiralitou. Na základě změny

retenčního/enantioseparačního chování látek v páru lze vyvodit roli dané funkční skupiny v retenčním/enantiodiskriminačním mechanismu.

Význam odlišného oligosacharidového makrocyklu lze jasně demonstrovat na separacích atropizomerů derivatizovaných binaftolů. Na DMP-CF7 CSP bylo dosaženo úplného (hodnota rozlišení $R_s > 1,5$) či částečného chirálního rozdělení pro pět z osmi binaftylových derivátů. Při použití DMP-CD CSP došlo k separaci dvou párů atropizomerů, z toho jednoho částečně a druhého na základní linii.

Retenční chování párů vybraných analytů potvrdily LFER výsledky, které objasnily příspěvky jednotlivých funkčních skupin analytů k retenci. Příkladem může být pár oxprenolol/alprenolol na DMP-CF7 CSP, i přes skutečnost, že nedošlo k enantioseparaci zmíněných analytů na této CSP. Oxprenolol vykazoval násobně vyšší retenci oproti alprenololu. Příčinou je přítomnost další etherové skupiny v molekule oxprenololu oproti alprenololu. Tato skupina působí jako akceptor vodíku při tvorbě vodíkových vazeb (statisticky významná interakce viz podkapitola 5.1), tedy významným způsobem zvyšuje retenci. Etherová skupina je však vzdálena chirálnímu centru, a proto odpovídající interakce nemá enantiodiskriminační charakter.

Srovnání RN-CF6 CSP a RN-CD CSP také prokázalo mimořádnou selektivitu CF CSP pro separace derivátů binaftolu. Přestože tyto analyty dosahovaly vyšších retencí na CD CSP, bylo na této fázi dosaženo pouze jedné částečné separace, zatímco na RN-CF6 CSP bylo separováno (částečně nebo na základní linii) pět z osmi atropizomerních párů. Stejně trendy pro dvojici analytů oxprenolol/alprenolol získané na DMP-CF7 CSP byly pozorovány i v separačním systému s RN-CF6 CSP. Pro enantiomery oxprenololu bylo dosaženo v použitých mobilních fázích částečné separace.

Souhrnem lze konstatovat, že CF CSP prokázaly obecně vyšší separační potenciál pro deriváty binaftolu než CD CSP. Separace na porovnávaných CSP na bázi cyklodextrinů a cyklofruktanů vykazovaly určitou komplementaritu.

5.3 Publikace IV - Charakterizace DMP-CF7 CSP v podmínkách SFC - základní porovnání s HPLC systémem

SFC je kvůli nižším nákladům a obvykle nižším časům analýz považovaná za vhodnou alternativu k HPLC. Z tohoto důvodu byla provedena základní charakteristika DMP-CF7 CSP pomocí modelu LFER v podmínkách SFC (**Publikace IV**). Získané zastoupení jednotlivých retenčních interakcí bylo srovnáno a následně diskutováno v souvislosti s analogickými systémy NP HPLC. V rámci srovnání obou separačních technik byly také diskutovány enantioselektivní separace sady chirálních látek odlišné struktury.

Srovnávané mobilní fáze byly CO_2/IPA 80/20 (v/v), $\text{CO}_2/\text{IPA}/\text{TFA}$ 80/20/0,5 (v/v/v) pro SFC a hex/IPA 80/20 (v/v), $\text{hex}/\text{IPA}/\text{TFA}$ 80/20/0,5 (v/v/v) pro HPLC. Dále byly charakterizovány dva další SFC systémy s methanolem (MeOH) jako organickým modifikátorem, CO_2/MeOH 95/5 (v/v) a $\text{CO}_2/\text{MeOH}/\text{TFA}$ 95/5/0,5 (v/v/v), neboť je známo, že v SFC systémech s mobilními fázemi s velmi malým přídatkem organického modifikátoru dochází ve zvýšené míře k adsorpci složek mobilní fáze na fázi stacionární, čímž jsou významně ovlivněny retenční/enantiodiskriminační mechanismy [13,40]. Pro posledně jmenované mobilní fáze nebyla prováděna analogická měření LFER v HPLC z důvodu neúměrně vysokých retencí testovacích analytů.

Základním rozdílem mezi porovnávanými HPLC a SFC systémy byl statisticky významný koeficient e pro všechny SFC systémy, zatímco pro analogické HPLC systémy byl nevýznamný. Tento koeficient vyjadřuje rozdíl mezi stacionární a mobilní fází v možnosti interakce prostřednictvím n - π - elektronových párů. Možným vysvětlením je reakce oxidu uhličitého s volnými hydroxylovými skupinami chirálního selektoru za tvorby karboxylové kyseliny. Jiné vysvětlení může být založeno na adsorpci alkoholového modifikátoru na CSP. Takové interakce jsou v HPLC limitovány, zatímco SFC nabízí širší škálu interakčních možností. Jiným významným rozdílem bylo ovlivnění dipolarity/polarizability (koeficient s) přídatkem

TFA. Pro HPLC se tento koeficient po acidifikaci mobilní fáze zvýšil, pro SFC byl efekt minimální.

Koeficient b (schopnost fáze poskytnout vodík pro tvorbu vodíkových interakcí) je významný pro všechny zkoumané systémy. Okyselení mobilní fáze zapříčinilo mírný pokles toho koeficientu v obou separačních systémech. Koeficient a (akceptor vodíku pro tvorbu vodíkových interakcí) je statisticky nevýznamný pro všechny zkoumané systémy. Koeficient v vykazoval ve všech systémech záporné hodnoty, což odpovídá charakterům mobilních a stacionárních fází. Vyšší absolutní hodnoty pro SFC systémy naznačují, že je v těchto systémech větší rozdíl mezi stacionární a mobilní fází ve schopnosti interagovat disperzními interakcemi oproti HPLC.

Modely LFER pro SFC systémy s mobilními fázemi s nízkým obsahem organického modifikátoru prokázaly, že všech pět typů interakcí se uplatňuje v retenčním mechanismu.

Jako výchozí mobilní fáze pro chirální separace derivátů binaftolu byla zvolena CO₂/IPA/TFA 80/20/0,5 (v/v/v). V porovnání s HPLC separacemi v analogickém systému poskytla DMP-CF7 CSP v SFC vyšší retenční faktory, nižší hodnoty enantioselektivit a obecně horší hodnoty rozlišení. Nejvýznamnější rozdíl byl zaznamenán pro binaftol. Atropizomery tohoto analytu byly v HPLC rozděleny až na základní linii, zatímco v podmínkách SFC nebyla pozorována ani částečná separace. Částečnou optimalizací separačních podmínek (změna typu a množství organického modifikátoru, změna množství TFA) bylo dosaženo celkem šesti separací (úplných/částečných) v podmínkách SFC, zatímco v HPLC bylo dosaženo pěti separací.

DMP-CF7 CSP v obou systémech silně zadržuje látky s volnou amino skupinou. Přídavek TFA do separačního systému významným způsobem zkrátí retenci těchto látek. Pozorované výsledky částečně potvrzené modely LFER ukazují, že se mechanismus působení TFA liší v závislosti na obsahu alkoholového modifikátoru. Zatímco v mobilních fázích s vyšším obsahem modifikátoru dochází přednostně k

ovlivnění amino skupiny analytu, při nižších koncentracích modifikátoru se TFA adsorbuje na povrch CSP, což způsobí mírné zvýšení retence analytů s volnou amino skupinou [13,40].

5.4 Publikace V - Využití komplexace cyklofruktanového chirálního selektoru s barnatými ionty pro chirální separace v HPLC a CE

Přestože jsou CF CSP multimodální, jsou aplikovány zejména v podmínkách normálního a polárně-organického módu HPLC. **Publikace V** demonstruje využití CF CSP, konkrétně IP-CF6 CSP, v reverzním módu HPLC. Pro chirální separace byla vybrána skupina pěti analytů, derivátů binaftolu s různými derivatizačními skupinami, vykazujících axiální chiralitu.

Zajímavou alternativou jak rozšířit/upravit enantioselektivní potenciál CF CSP je přidavek určitých iontů do mobilní fáze. Vzhledem ke své vysoké komplexační konstantě byl vybrán Ba^{2+} iont [39]. Na rozdíl od *crown*-etherů, u kterých probíhá komplexace iontu uprostřed roviny molekuly, v případě CF selektoru se barnatý kationt komplexuje nad rovinu cyklofruktanového *crown*-etherového skeletu [39]. V rámci **publikace V** byl studován efekt přidavku Ba^{2+} iontů do mobilní fáze na enantioselektivitu IP-CF6 CSP v reverzním módu HPLC. Mobilní fáze byly složeny z různých objemových poměrů MeOH a 20 mM octanového pufru (pH 4,5), bez a s přidavkem octanu barnatého (5 mM). Všech pět analytů bylo rozděleno na základní linii při použití mobilní fáze bez přidavku barnatého kationtu, což demonstruje aplikovatelnost IP-CF6 CSP v reverzním módu HPLC. Přidavek Ba^{2+} iontů do mobilní fáze způsobil vzrůst retencí pro analyty s fosfátovou skupinou, která pravděpodobně dobře interaguje s barnatým kationtem komplexovaným na CF CS.

Pro analyty bez fosfátové skupiny ve své struktuře došlo k mírnému snížení retence a odpovídajícím poklesům hodnot rozlišení. Lze tedy uzavřít, že interakce mezi Ba^{2+} iontem komplexovaným v derivatizovaném cyklofruktanovém CS zlepší enantioseparaci pouze těch analytů, které jsou schopny interagovat s barnatými ionty.

Analogický separační systém s IP-CF6 jako CS s a bez přídavku Ba²⁺ iontů byl zkoumán i v CE. V systému CE bylo dosaženo separace na základní linii pouze pro jeden analyt (označený BNP, struktura je uvedena v Publikaci V). I v tomto systému přídavek Ba²⁺ iontů do základního elektrolytu vedl ke zvýšení rozlišení atropizomerů. Výsledky jasně ukazují, že navázání CF selektoru na silikagelový nosič má fundamentální význam pro enantiosektivitu. Příčinou je pravděpodobně vyšší rigidita vázaného selektoru v CSP oproti volnému selektoru v kapiláře.

5.5 Publikace VI - Chirální separace chlorthalidonu metodou SFC

Vývoj metody pro separaci enantiomerů je prvotním krokem pro klinické testy, které se zaměřují na odlišné biologické vlastnosti jednotlivých enantiomerních forem v živých systémech. HPLC poskytuje velmi účinné chirální separace, nicméně je v současné době často nahrazována SFC. **Publikace VI** je zaměřena na enantiosektivní separaci chlorthalidonu, látky používané pro léčbu hypertenze a edémů. V rámci vývoje metody byly použity dvě CF CSP, DMP-CF7 CSP a IP-CF6 CSP, dále dvě CSP na bázi polysacharidů, Chiralpak AD s amylosou derivatizovanou tris(3,5-dimethylfenyl karbamátem) jako CS a Chiralcel OD-H, kde je chirální CS tvořen celulosou s tris(3,5-dimethylfenyl karbamátem).

Na základě podrobné literární rešerše a prvotního testování různých CSP byla pro další optimalizaci separace vybrána kolona Chiralpak AD.

Optimalizovaný separační systém byl tvořen kolonou Chiralpak AD a mobilní fází CO₂/MeOH 50/50 (v/v), průtok 4 ml/min, teplota 40 °C, tlaková restrikce 120 bar. Za těchto podmínek bylo dosaženo enantioseparace na základní linii s následujícími parametry: retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru $k_1 = 0,90$; faktor enantioselektivity $\alpha = 1,71$; rozlišení $R_s = 2,61$. Dále byly stanoveny základní validační parametry - limit detekce, limit kvantifikace, robustnost, lineární rozsah, opakovatelnost a reprodukovatelnost. Navržená metoda poskytuje jednoznačně nejrychlejší separaci enantiomerů chlorthalidonu (do 2,5 min) v porovnání s publikovanými HPLC a SFC metodami.

5.6 Publikace VII - Chirální separace citalopramu a jeho prekurzoru citadiolu metodami HPLC a SFC

Citalopram tvoří aktivní složku preparátů předepisovaných k léčbě deprese, panické úzkosti či kompulzivní obsesivní poruchy. Z jednotlivých enantiomerních forem citalopramu je pouze *S*-enantiomer aktivní, zatímco *R*-enantiomer nevykazuje odpovídající biologickou aktivitu a do jisté míry působí proti *S*-enantiomeru. V rámci **Publikace VII** je navržena metoda pro separaci enantiomerů citalopramu a jeho syntetického prekurzoru citadiolu.

Pro vývoj separační metody bylo testováno celkem šest CSP v HPLC. CSP na bázi makrocyclických antibiotik - vankomycinu (Chirobiotic V, Chirobiotic V2) a teikoplanin aglykonu (Chirobiotic TAG), které byly testovány v POM HPLC společně s CSP na bázi cyklofruktanu DMP-CF7 (Larihc DMP-CF7). Polysacharidové CSP na bázi celulosy byly testovány v NP (Chiralcel OD-H) a RP (Chiralcel OD-RH) HPLC. Dále byly testovány tři CSP v podmínkách SFC, a to CSP na bázi celulosy (Chiralcel OD-H), kolona Chiralpak AD na bázi amylosy a kolona Larihc DMP-CF7 na bázi cyklofruktanu.

Na základě prvotních HPLC experimentů byla vybrána pro optimalizaci a následnou validaci kolona Chiralcel OD-H v podmínkách NP HPLC. V rámci SFC experimentů bylo dosaženo separace na základní linii pouze pro enantiomery citadiolu.

Optimalizovaný separační systém byl tvořen kolonou Chiralcel OD-H a mobilní fází hex/IPA/TEA 96/4/0,1 (v/v/v), průtok 1 ml/min, teplota 25 °C. Za těchto podmínek bylo dosaženo enantioseparace obou analytů na základní linii během jedné analýzy. Chromatografické parametry pro enantiomery citalopramu byly: retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru $k_1 = 3,45$; faktor enantioselektivity $\alpha = 1,23$; rozlišení $R_s = 2,16$. Pro enantiomery citadiolu byly retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru $k_1 = 5,96$; faktor enantioselektivity $\alpha = 1,18$; rozlišení $R_s = 1,50$. Pro optimalizovanou metodu byly stanoveny základní validační parametry - limit detekce,

limit kvantifikace, robustnost, lineární rozsah, opakovatelnost a reprodukovatelnost. Dále byla ověřena aplikovatelnost metody pro stanovení enantiomerní čistoty léčiv.

6 Závěr

Předkládaná dizertační práce, tvořená komentovaným souborem sedmi publikací, se zabývá fyzikálně-chemickou charakterizací a aplikačním potenciálem CF CSP. Výsledky práce mohou být využity k výraznému usnadnění vývoje, optimalizace a validace enantioselektivních metod využívajících CF CSP.

Jako výchozí přístup pro vzájemné porovnání CF CSP byl použit LFER model. Tento model poskytl důležité počáteční informace o typech a distribuci chromatografických interakcí tří komerčně dostupných cyklofruktanových CSP v podmínkách normálního módu HPLC. Jako hlavní interakce přispívající v různé míře k retenci byly ve všech systémech na bázi cyklofruktanů určeny schopnost poskytovat vodík pro tvorbu vodíkové interakce a dipolarita/polarizibilita. Disperzní interakce retenci v různé míře snižují. Protože model LFER nezahrnuje sterické faktory, význam sacharidového skeletu v separačních systémech byl objasněn na základě porovnání CF CSP s CD analogy. CF CSP prokázaly v podmínkách normálního módu HPLC mimořádnou enantioselektivitu zejména pro deriváty binaftolu a aminy.

Následně byly zkoumány vlastnosti DMP CF7 CSP v podmínkách SFC. Využitím modelu LFER byla získána data pro porovnání vlivu složení mobilní fáze (hexan vs superkritický oxid uhličitý) na retenční mechanismy v HPLC a SFC. Bylo dokázáno, že dochází ke změně distribucí retenčních a tedy i enantiodiskriminačních interakcí v analogických HPLC a SFC systémech. Význam těchto změn pro chirální separace byl také demonstrován.

Dále bylo v rámci práce studováno využití CF CSP v podmínkách reverzního módu HPLC. Přestože CF CSP nejsou zatím v tomto módu běžně používány, prokázaly značný enantioseparační potenciál. Úprava enantiodiskriminačního

mechanizmu přidavkem barnatých iontů do mobilní fáze zvýšila enantioselektivitu IP-CF CSP pro určité typy analytů.

Kromě teoretického popisu retenčních a enantiodiskriminačních procesů jsou do práce zařazeny dva příklady zaměřené na praktický vývoj separačních metod pro stanovení enantiomerní čistoty léčiv.

Seznam literatury

- [1] Izake, E. L. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, 96, 1659-1676
- [2] Wendeborn, S.; Godienau, E.; Mondière, R.; Smejkal, T.; Smits, H. *Comprehensive Chirality* **2013**, 1, 120-166
- [3] Gal, J.; Cintas, P. *Biochirality: Origins, Evolution and Molecular Recognition* **2013**, 333, 1-40
- [4] Maier, N. M.; Franco, P.; Lindner, W. *Journal of Chromatography A* **2001**, 906, 3-33
- [5] Lu, H. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2007**, 3, 149-158
- [6] Zhang, T.; Nguyen, D.; Franco, P. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 1048-1055
- [7] Younes, A. A.; Mangelings, D.; Heyden, Y. V. *Journal of Chromatography A* **2012**, 1269, 154-167
- [8] De Klerck, K.; Tistaert, C.; Mangelings, D.; Heyden, Y. V. *The Journal of Supercritical Fluids* **2013**, 80, 50-59
- [9] ChirBase Project, ENSSPICAM, University of Aix-Marseille III, Marseille, France
- [10] Lämmerhofer, M. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 814-856
- [11] Guiochon, G.; Tarafder, A. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 1037-1114
- [12] De Klerck, K.; Mangelings, D.; Heyden, Y. V. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, 69, 77-92
- [13] Lesellier, E. *Journal of Separation Science* **2008**, 31, 1238-1251
- [14] Taylor, L. T. *The Journal of Supercritical Fluids* **2009**, 47, 566-573
- [15] Saito, M. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2013**, 115, 590-599
- [16] Poole, C. F.; Poole, S. K. *Journal of Chromatography A* **2002**, 965, 263-299
- [17] Kamlet, M. J.; Doherty, R. M.; Abboud, J. L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W., *Chemtech* **1986**, 16, 566-576
- [18] Vitha, M.; Carr, P. W. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1126, 143-194
- [19] Abraham, M. H.; Ibrahim, A.; Zissimos, A. M. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1037, 29-47
- [20] Scriba, G. K. E. *Chromatographia* **2012**, 75, 815-83
- [21] Cavazzini, A.; Pasti, L.; Massi, A.; Marchetti, N.; Dondi, F. *Analytica Chimica Acta* **2011**, 706, 205-222

- [22] Kalíková, K.; Riesová, M.; Tesařová, E. *Central European Journal of Chemistry* **2012**, 10, 450-471
- [23] West, C. *Current Analytical Chemistry* **2014**, 10, 99-120
- [24] Sun, P.; Wang, Ch.; Breitbach, Z. S.; Zhang, Y.; Armstrong, D. W. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 10215-10226
- [25] Sun, P.; Armstrong, D. W. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 4904-4918
- [26] Sun, P.; Wang, Ch.; Padivitage, N. L. T.; Nanayakkara, Y. S.; Perera, S.; Qiu, H.; Zhang, Y.; Armstrong, D. W. *Analyst* **2011**, 136, 787-800
- [27] Aranyi, A.; Illisz, I.; Pataj, Z.; Szatmári, I.; Fülöp, F.; Armstrong, D. W.; Antal, P. *Chirality* **2011**, 23, 549-556
- [28] Aranyi, A.; Bagi, Á.; Illisz, I.; Pataj, Z.; Fülöp, F.; Armstrong, D. W.; Antal, P. *Journal of Separation Science* **2012**, 35, 617-624
- [29] Gondová, T.; Petrovaj, J.; Kutschy, P.; Armstrong, D. W. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1272, 100-105
- [30] Weatherly, C. A.; Na, Y. C.; Nanayakkara, Y. S.; Woods, R. M.; Sharma, A.; Lacour, J.; Armstrong, D. W. *Journal of Chromatography B* **2014**, 1218, 955-956
- [31] Smuts, J. P.; Hao, X. Q.; Han, Z. B.; Parpia, C.; Krische, M. J.; Armstrong, D. W. *Analytical Chemistry* **2014**, 86, 1282-1290
- [32] Maier, V.; Kalíková, K.; Příbylka, A.; Vozka J.; Smuts, J.; Švidmoch, M.; Ševčík, J.; Armstrong, D. W.; Tesařová E. *Journal of Chromatography A* **2014**, 1338, 197-200
- [33] Zhang, Y.; Armstrong, D. W. *Analyst* **2011**, 136, 2931-2940
- [34] Jiang, C.; Tong, M. Y.; Breitbach, Z. S.; Armstrong, D. W. *Electrophoresis* **2009**, 30, 3897-3909
- [35] Zhang, Y. J.; Huang, M. X.; Zhang, Y. P.; Armstrong, D. W.; Breitbach, Z. S.; Ryoo, J. J. *Chirality* **2013**, 25, 735-742.
- [36] Kozlík, P.; Šímová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E. *Journal of Chromatography A* **2012**, 1257, 58-65
- [37] Qiu, H.; Loukotková, L.; Sun, P.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 270-279
- [38] Padivitage, N. L. T.; Dissanayake, M. K.; Armstrong, D. W. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405, 8837-8848.
- [39] Reijenga, J. C.; Verheggen, T.; Chiari, M. *Journal of Chromatography A* **1999**, 838, 111
- [40] Lesellier, E. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 1881-1890

Přílohy

A. Životopis

Jméno: **Jiří Vozka**

Narozen: 1.4.1986

Adresa: Na Luzích 91/10, Praha 6 Vokovice, 160 00

Vzdělání:

- | | | |
|--------------|---|------|
| 2005 – 2008 | <i>bakalářské studium: Chemie a biologie se zaměřením na vzdělávání</i> | Bc. |
| | Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Bakalářská práce: Význam ketoláték pro lidský organismus | |
| 2007 – 2011 | <i>bakalářské studium: Technická fyzikální a analytická chemie</i> | Bc. |
| | Fakulta chemického inženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Bakalářská práce: Chirální stacionární faze na bázi imobilizovaných antibiotik | |
| 2008 – 2010 | <i>magisterské studium: Učitelství chemie a biologie pro střední školy</i> | Mgr. |
| | Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Diplomová práce: Chemické experimenty ve středoškolské výuce | |
| 2010 - dosud | <i>doktorské studium: Fyzikální chemie</i> | |
| | Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Dizertační práce: Charakterizace nových chirálních separačních systémů pro použití v HPLC | |

Stáže:

- 2012 Erasmus Practical Placement, Paul Cézanne University Aix-Marseille III (Aix-Marseille University), Marseille, Francie
Studium enantioselektivního potenciálu cyklofruktanových chirálních stacionárních fází v podmínkách superkritické fluidní chromatografie.
6 měsíců
- 2014 CEEPUS program (Central European Exchange for University Studies)
Faculty of Science, University of Zagreb, Záhřeb, Chorvatsko
Charakterizace chirálních stacionárních fází na bázi imobilizovaných polysacharidů pomocí LFER modelu.
3 týdny

Projekty:

- hlavní řešitel projektu GAUK 356411, Grantové agentury Univerzity Karlovy
- spoluřešitel projektu KONTAKT LH11018

Výuka na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze:

- Cvičení z Obecné chemie MC260P54

Certifikáty:

- FCE (Cambridge ESOL Examination) – 5.2.2013

B. Seznam publikací

Publikace I: Kalíková, K.; Šlechtová, T.; **Vozka, J.**; Tesařová, E. Supercritical Fluid Chromatography as a Tool for Enantioselective Separation; A Review, *Analytica Chimica Acta* **2014**, 821, 1-33

Publikace II: Janečková, L.; Kalíková, K.; **Vozka, J.**; Armstrong, D. W.; Bosáková, Z.; Tesařová, E. Characterization of Cyclofructan-based Chiral Stationary Phases by Linear Free Energy Relationship, *Journal of Separation Science* **2011**, 34, 2639-2644

Publikace III: Vozka, J.; Kalíková, K.; Janečková, L.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E. Chiral HPLC Separation on Derivatized Cyclofructan *versus* Cyclodextrin Stationary Phases, *Analytical Letters* **2012**, 45, 2344–2358

Publikace IV: Vozka, J.; Kalíková K.; Roussel Ch.; Armstrong D. W; Tesařová E. An Insight into the Use of Dimethylphenyl Carbamate Cyclofructan 7 Chiral Stationary Phase in Supercritical Fluid Chromatography: The Basic Comparison with HPLC, *Journal of Separation Science* **2013**, 36, 1711–1719

Publikace V: Maier, V.; Kalíková, K.; Příbylka, A.; **Vozka, J.;** Smuts, J.; Švidrnoch, M.; Ševčík, J.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E. Isopropyl Derivative of Cyclofructan 6 as Chiral Selector in Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **2014**, 1338, 197–200

Publikace VI: Vozka, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E. Rapid Supercritical Fluid Chromatography Method for Separation of Chlorthalidone Enantiomers, *Analytical Letters* **2013**, 46, 2860–2869

Publikace VII: Geryk, R.; **Vozka, J.;** Kalíková, K.; Tesařová, E. HPLC Method for Chiral Separation and Quantification of Antidepressant Citalopram and Its Precursor Citadiol, *Chromatographia* **2013**, 76, 483-489

Publikace VIII-nezahrnuta do práce: Kučerová, G.; **Vozka, J.;** Kalíková, K.; Geryk, R.; Plecítá, D.; Pajpanova, T.; Tesařová, E. Enantioselective Separation of Unusual Amino Acids by High Performance Liquid Chromatography, *Separation and Purification Technology* **2013**, 119, 123-128

C. Seznam konferenčních příspěvků

Přednášky:

Cyclofructan-based Stationary Phases for Chiral and Achiral Separations in HPLC

E. Tesařová, K. Kalíková, **J. Vozka**, D. W. Armstrong

38th International Symposium on HPLC Separations & Related Techniques, Anaheim, California, USA, 2012

Cyclodextrin- and Cyclofructan-based Chiral Stationary Phases for Separations in Chromatography

K. Kalíková, **J. Vozka**, E. Tesařová

24th International Symposium on Chiral Discrimination, Fort Worth, Texas, USA, 2012

Chiral HPLC Separations of Unusual Amino Acids in Reversed Phase and Polar-Organic Modes

K. Kalíková, **J. Vozka**, G. Kučerová, T. Pajpanova, E. Tesařová

13th Symposium and Summer School on Bioanalysis, Debrecen, Maďarsko, 2013

Chiral Stationary Phases Based on Derivatized Cyclofructan

J. Vozka, K. Kalíková, E. Tesařová.

9th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry", Praha, Česká republika, 2013

An Insight into the Retention Mechanism on Cyclofructan-based Chiral Stationary Phases

J. Vozka, K. Kalíková, E. Tesařová

CECE 2013, Brno, Česká republika, 2013

Derivatized Cyclofructans as Chiral Selectors in HPLC and CE

K. Kalíková, A. Příbylka, M. Švidrnoch, **J. Vozka**, V. Maier, J. Ševčík, D. W. Armstrong, E. Tesařová

41st International Symposium on HPLC Separations and Related Technique,
New Orleans, USA, 2014

Plakátová sdělení:

Enantioseparation Potential of New HPLC Chiral Stationary Phases Based on
Derivatized Cyclofructans

J. Vozka, L. Janečková, K. Kalíková, D. W. Armstrong, E. Tesařová
Nordic Separation Science Society 6th Conference, Riga, Lotyšsko, 2011

Chiral Separation of Binaphthyl Catalysts Using Dimethylphenyl Carbamate
Cyclofructan 7 – Comparison of SFC and HPLC Conditions

J. Vozka, K. Kalíková, E. Tesařová, Ch. Roussel, D. W. Armstrong
29th International Symposium on Chromatography, Toruń, Polsko, 2012

Description and Comparison of Interactions Occuring on Dimethylphenyl Carbamate
Cyclofructan 7 Chiral Stationary Phase in HPLC vs SFC

J. Vozka, K. Kalíková, E. Tesařová, Ch. Roussel, D. W. Armstrong
12th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Cluj Napoka,
Rumunsko, 2012

Rapid SFC Method for Separation of Chlorthalidone Enantiomers

J. Vozka, K. Kalíková, E. Tesařová
39th International Symposium on HPLC Separations and Related Techniques,
Amsterdam, Nizozemsko, 2013

Chiral Separation of Binaphthyl Catalysts Using New HPLC Chiral Stationary Phases Based on Derivatized Cyclofructans

L. Janečková, K. Kalíková, **J. Vozka**, Z. Bosáková, D. W. Armstrong, E. Tesařová
36th International Symposium on HPLC Separations and Related Technique,
Budapešť, Maďarsko, 2011

HPLC Method for Chiral Separation of Enantiomers of Citalopram and its Precursor Citadiol

R. Geryk, **J. Vozka**, K. Kalíková, E. Tesařová
12th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Cluj Napoka,
Rumunsko, 2012

Optimization and Validation of HPLC Method for Chiral Separation of Citalopram and its Precursor Citadiol

R. Geryk, **J. Vozka**, K. Kalíková, E. Tesařová
29th international Symposium on Chromatography, Toruň, Polsko, 2012

Cyclofructan Derivatives for Enantioselective Separation in HPLC and CE

K. Kalíková, **J. Vozka**, A. Přibylka, P. Ginterová, V. Maier, J. Ševčík, J. Smuts, D. W. Armstrong, E. Tesařová

20th International Symposium on Electro and Liquid Phase Separation Techniques,
Puerto de la Cruz, Tenerife, Kanárské ostrovy, Španělsko, 2013

Comparison of Enantioselective Potential of Amylose-based Chiral Stationary Phases in Reversed-phase Mode

K. Kalíková, **J. Vozka**, R. Geryk, E. Tesařová
41st International Symposium on HPLC Separations and Related Technique,
New Orleans, USA, 2014