

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



# Využití HPLC v chirálních separacích V.

Diplomová práce

Jakub Burda

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové, 2020



Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V ..... dne .....

Podpis autora

## **Poděkování**

Tímto si přeji vyjádřit můj obrovský dík **doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D.** za jeho odborné vedení, svatou trpělivost a dobře míněné a cenné rady uplatněné při zpracování této práce. Dále bych také rád poděkoval celému kolektivu KFCHFA za vřelost a ochotu.

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu SVV 260 547.

# Abstrakt

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra:** Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

**Autor:** Jakub Burda

**Vedoucí diplomové práce:** doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Využití HPLC v chirálních separacích V.

Neustále se zvyšující požadavky regulačních autorit na kvalitu a bezpečnost léčiv kladou na výrobce velký tlak. Poslední dekády se nesou ve znamení chirálně čistých léčiv, jejichž vývoj jde ruku v ruce s vývojem chirálních syntéz a separací. Nejvyžívanější metodou jsou v oblasti separací přímé separace za využití chirálních stacionárních fází. Nejčastějším nosičem pro tyto stacionární fáze je silikagel, který může obsahovat na svém povrchu kovové nečistoty negativně ovlivňující separační proces. Zaměřením této diplomové práce bylo testování vlivu chromatografických podmínek na chirální a achirální interakce sedmi vybraných analytů se stacionární fází. K testování byla použita kolona s nativním  $\beta$ -cyklodextrinem jako chirálním selektorem.

# Abstract

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department:** Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

**Candidate:** Jakub Burda

**Supervisor:** doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

**Title of Thesis:** The employment of HPLC in the field of chiral separations V.

Continuously growing requirements of regulatory authorities for the quality and safety of medicines put a high pressure on manufacturers. Last decades are marked by optically pure drugs, whose development goes hand in hand with development of chiral syntheses and separations. The most used method in the field of separations are direct separations using chiral stationary phases. The most often used carrier for these stationary phases is silica, which may contain metal impurities on its surface, negatively impacting separation process. The focus of this thesis was testing of influence of chromatographic conditions on chiral and achiral interactions of seven selected analytes with stationary phase. Column with native  $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector was used for the testing.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Seznam použitých zkratek</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Úvod</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>11</b>
3.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie . . . . .	11
3.1.1	Úvod . . . . .	11
3.1.2	Instrumentace . . . . .	12
3.1.3	Kolony . . . . .	14
3.1.4	Trendy v HPLC . . . . .	15
3.2	Silikagel . . . . .	16
3.2.1	Příprava silikagelu . . . . .	16
3.2.2	Povrch silikagelu . . . . .	18
3.2.3	Kovy na povrchu silikagelu . . . . .	19
3.2.4	Reverzní fáze . . . . .	19
3.2.5	Charakterizace stacionárních fází . . . . .	21
3.3	Chirální separace . . . . .	23
3.3.1	Izomerie . . . . .	23
3.3.2	Úvod do chiraloty . . . . .	25
3.3.3	Mechanismus chirální separace . . . . .	26
3.3.4	Nepřímá metoda chirální separace . . . . .	28
3.3.5	Přímá metoda chirální separace . . . . .	29
3.3.6	Polysacharidové CSP . . . . .	30
3.3.7	Cyklodextrinové CSP . . . . .	32
3.3.8	Cyklofruktanové CSP . . . . .	34
3.3.9	CSP na bázi crown-etherů . . . . .	35
3.3.10	Donor-akceptorové (Pirklovy) CSP . . . . .	36
3.3.11	Ligand-výměnné a iontově výměnné CSP . . . . .	38
3.3.12	Makrocyclická antibiotika . . . . .	39
3.3.13	Proteinové CSP . . . . .	41
3.3.14	Ostatní CSP . . . . .	42
<b>4</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>44</b>

<b>5</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>45</b>
5.1	Přístroje, kolona, pomůcky a chemikálie . . . . .	45
5.2	Příprava vzorků a mobilních fází . . . . .	46
5.3	Chromatografické podmínky . . . . .	48
<b>6</b>	<b>Výsledky a diskuze</b>	<b>50</b>
6.1	Bazické analyty . . . . .	51
6.2	Kyselé analyty . . . . .	57
6.3	Neionizované látky . . . . .	63
6.4	Porovnání cyklodextrinových kolon . . . . .	70
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>77</b>
	<b>Citovaná literatura</b>	<b>78</b>



# 1 Seznam použitých zkratek

FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MF	Mobilní fáze
SF	Stacionární fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HILIC	Hydrofilně interakční chromatografie
D <sub>2</sub> O	Deuterovaná voda
HTO	Tritiová voda
IR	Infračervený
NMR	Nuklární magnetická rezonance
TEA	Triethylamin
CHN	Uhlík vodík dusík analýza — typ elementární analýzy
BET	Brunauer, Emmett, Teller — metoda určování specifického povrchu
CSP	Chirální stacionární fáze
CS	Chirální selektor
CDR	Chirální derivatizační činidlo
GITC	2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glukopyranosyl isothiokyanát
FLEC	1-(9-fluorfenyl)ethylchloroformiát
CMPA	Chirální aditivum mobilní fáze
RP	Reverzní fáze
CGTáza	Cyklodextrin-glykosyl transferáza
DNBPG	Dinitrobenzoylfenylglycin
MOF	Kovově organické rámce

MIP	Molekulárně vtištěné polymery
AcA	Kyselina octová
EDTA	Edetan disodný
ACN	Acetonitril
MeOH	Methanol

## 2 Úvod

Poznání možných rozdílů ve farmakologické aktivitě enantiomerů vedlo k příklonu v jejich podávání jako léku v podobě opticky čistých izomerů. FDA ve svém vyjádření k vývoji nových stereoizomerních léčiv z roku 1992 se přiklání k vývoji nových léčiv v podobě čistého enantiomeru, avšak pokud rozdíly v aktivitě a toxicitě jsou nepatrné, lze vyvinout lék jakožto racemickou směs. [1] Jakožto jedna z hlavních regulačních autorit, co se týče farmaceutik na světě, její doporučení je pro výrobce léčiv stěžejní. Není tedy s podivem, že se výrobci tímto doporučením začali řídit, a z 18 malých molekul schválených FDA v roce 2015 už pouze jedna byla registrovaná jako racemát, ostatních sedmnáct bylo registrována jako opticky čistá látka. [2]. Využití a rozvoj metod chirálních separací tedy kopíruje trendy posledních dekád, to znamená neustále rostoucí požadavky na čistotu a bezpečnost léčiv a technologický rozvoj jako takový.

Nejpoužívanější a nejrobustnější chirálně separační technikou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). [3] Mezi další chirální separační techniky patří mimo jiné v poslední době oblíbená superkritická fluidní chromatografie, kapilární elektroforéza či plynová chromatografie. [4] V HPLC je nejhojněji využíváno přímé separace s chirální stacionární fází, kdy je chirální selektor umožňující separaci jednotlivých enantiomerů kovalentně vázán na stacionární fázi, kterou je nejčastěji silikagel. [5] Povrch silikagelu obsahuje malé množství kovových kontaminant, které mohou ovlivňovat průběh separace. [6] Tato práce se zaměřuje na testování a porovnání vlivu chromatografických podmínek na separaci mezi kolonami s chirálními fázemi na bázi cyklodextrinu s rozdílným typem silikagelu.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

#### 3.1.1 Úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jedna z nejrozšířenějších separačních metod v současné vědě. Principem chromatografických metod je dělení analytů mezi dvě nemísitelné fáze, stacionární (SF) a mobilní (MF). Analyty jsou rozpuštěné v MF, která prostupuje skrz SF. Během procesu se neustále vytváří rovnováha analytů mezi oběma fázemi a analyty jsou separovány na základě afinity k jednotlivým fázím. [7, 8] Právě díky jednoduchosti tohoto principu je HPLC tak oblíbená. Pro analýzu stačí velmi malé množství vzorku a metodu je možné plně automatizovat. Z tohoto důvodu je HPLC často první volbou při analýze celé řady látek. [5, 9]

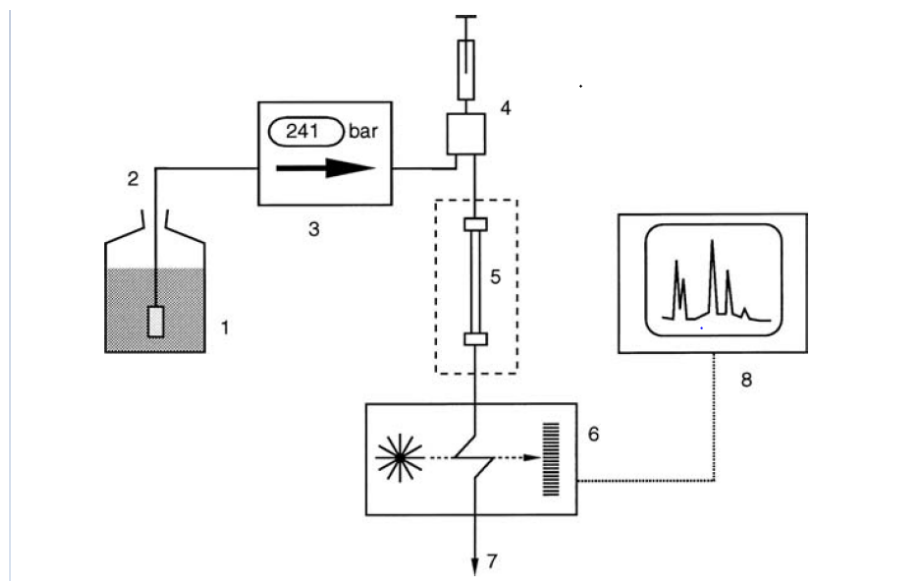
S pomocí této separační metody jsme schopni jak kvalitativního, tak kvantitativního hodnocení separované směsi. Jednotlivé složky ve vzorku jsou za daných podmínek charakterizovány signálem. Signál, tedy pík, je odezva detektoru na průchod analytu. Grafický záznam separace vzorku označujeme jako chromatogram. Každý pík v chromatogramu je charakterizován retenčním časem, což je doba od nástřiku vzorku na kolonu po dosažení maxima píku. Na základě shody retenčních časů neznámé látky a příslušného standardu lze neznámou látku identifikovat. Obecně je požadována shoda retenčních časů alespoň za dvou odlišných chromatografických podmínek.

Intenzita signálu (plocha píku) je závislá na množství analytu. Jedním ze způsobů, jak získat koncentraci analytu, je za pomoci kalibrační křivky, která představuje závislost plochy píku na koncentraci. Z tohoto grafu je možné po dosazení plochy píku odečíst jeho koncentraci. Dalšími způsoby jsou metoda vnitřního standardu a metoda vnějšího standardu. U metody vnějšího standardu se porovnávají plocha píku standardu o určité koncentraci a plocha píku analytu ve vzorku. U metody vnitřního standardu je ke všem vzorkům přidáno stejné množství strukturně blízké látky (vnitřní standard), která se dostatečně separuje od stanovované látky. Porovnáním poměrů ploch analytu a vnitřního standardu ve vzorku a ve standardu lze určit koncentraci stanovovaného analytu. Výhodou tohoto přístupu je, že koriguje možnou chybu např. při přípravě vzorků. [5, 9, 10]

Kapalinová chromatografie je používána ve dvou módech, a to reverzním a normálním. Normální mód značí, že použitá SF je z polárního materiálu s velkým povrchem, typickým příkladem je například silikagel, a používaná rozpouštědla v MF jsou nepolární, například hexan. V reverzním módu je použitá SF nepolární, a MF polární. Analýzu lze provést za konstantního složení MF v průběhu celé analýzy, tzv. isokratická eluce. Pokud je v průběhu analýzy složení MF měněno, jedná se o tzv. gradientovou eluci. Chromatografie může být buď analytická, tedy ke zjištění přítomnosti látky za účelem její kvalitativní a kvantitativní analýzy, nebo preparativní, sloužící k získání příslušné látky ze směsi pro její další využití. Protože se u preparativní chromatografie pracuje s větším množstvím vzorku, instrumentace je z tohoto důvodu rozměrnější, než u analytické chromatografie.[9, 11]

### 3.1.2 Instrumentace

Kapalinový chromatograf se typicky skládá z několika částí, viz obrázek 1.



**Obrázek 1:** Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu. 1 = zásobník rozpouštědla; 2 = přívodní hadička s fritou; 3 = pumpa s manometrem; 4 = autosampler; 5 = kolona s termostatem; 6 = detektor; 7 = odpad; 8 = PC ke sběru a vyhodnocení dat. Převzato a upraveno z [10]

Zásobníky rozpouštědel by měly být inertní, nejčastěji ze skla. Některá rozpouštědla totiž mohou z plastu uvolňovat jeho složky a tím znehodnocovat rozpouštědlo. Zásobníky by měly být uzavřené, aby se zabránilo odpařování a průniku pevných částic do rozpouštědla. Pro isokratickou eluci stačí jeden zásobník, pro gra-

dientovou eluci, kde jsou rozpouštědla mísená dohromady, je zásobníků potřeba více. V zásobníku nebo na vstupním místě přírodních hadiček je také umístěna frit, jež zachytává možné pevné částice a zároveň drží hadičku u dna zásobníku. Nejčastějším materiálem pro výrobu frit je keramika, nerezová ocel nebo jiné materiály inertní k mobilní fázi. [5]

Pro HPLC jsou používána rozpouštědla v příslušné čistotě (HPLC grade), která jsou čištěna od UV adsorbujících příměsí a pevných částic. Všechny složky mobilní fáze by měly být před použitím přefiltrovány, například vakuovou filtrací. [5, 11] Rozpouštědla by měla být před použitím zbavena rozpuštěných plynů. Vznikající bubliny plynu mohou způsobit kolísání tlaku, či dokonce znemožnit detekci analytů. Rozpouštědla se zbavují plynů buď degasserem, umístěným před vysokotlakým čerpadlem, což je soustava trubiček propustných pro plyn ve vakuu, kterými protéká mobilní fáze, probubláním heliem nebo v ultrazvukové lázni. [5, 8, 10, 12]

Vysokotlaké čerpadlo je potřebné pro přivádění mobilní fáze konstantní průtokovou rychlostí na kolonu. Kolísání tlaků má být co nejmenší, což je zajištěno například průchodem tlakovaného rozpouštědla zařízením na tlumení pulsů. Hadičky a šroubení musí být schopny odolat provoznímu tlaku. Je kladen velký důraz na přesnost množství přivedené mobilní fáze. Čerpací systémy mohou dodávat rozpouštědla z více zásobníků. K mísení rozpouštědel dochází buď před natlakováním, nebo v tlakované části. Nejpoužívanější jsou vysokotlaká čerpadla s duálním vratným pístem. [8, 11]

Autosampler zajišťuje přesné a správné dávkování vzorku do protékající mobilní fáze bez nutné přítomnosti operátora, manuální dávkování v dnešní době je nepřilíh časté. Na přesnost dávkovaného množství se kladou velké nároky, stejně jako na zabránění přenosu analytu mezi vzorky (carryover). Vzorky určené k analýze, které by pokud možno měly být rozpuštěny v mobilní fázi, jsou uloženy v zásobníku. Injekční systémy autosampleru poté naberou požadované množství vzorku, který je nastříknut pomocí šesticestného ventilu na kolonu. Samozřejmostí je propláchnutí cest mezi každým nástřikem vzorku, které se taktéž děje automaticky. [5, 8, 10, 11] Na chromatografických kolonách dochází k separaci analyzovaného vzorku. Kolonám je věnována samostatná kapitola níže.

Analyt unášený MF mění její fyzikálně-chemické vlastnosti a tato změna je detekována v detekční cele detektoru, umístěném co nejbližší koloně. Odezva detektoru v závislosti na čase je zpracována příslušným chromatografickým softwarem na chromatogram. V závislosti na typu detektoru jsou měřeny odlišné fyzikálně-chemické

vlastnosti. Ideální detektor by měl být vysoce citlivý, lineární, spolehlivý, jednoduchý na použití, nedestruktivní, univerzální a neovlivněný změnami chromatografických podmínek. [5, 10–12] Nejpoužívanější detektory jsou UV-Vis spektrofotometry. Jsou relativně jednoduché, levné a detekují širokou škálu látek. Nutností je vybrat správnou vlnovou délku, při které analyt poskytuje nejvyšší odezvu vůči mobilní fázi. Diode array detektor, poddruh UV detektoru, skenuje spektrum vlnových délek v trojrozměrném záznamu (čas, absorpce a vlnová délka). Tento způsob detekce dokáže rozlišit mezi dvěma látkami se stejnou retencí, pokud mají rozdílná absorpční spektra. UV detektory jsou vhodné pro gradientovou eluci díky malému rozdílu absorbancí mezi MeOH, acetonitrilem a H<sub>2</sub>O. [5, 10, 11]

Dalším velmi používaným spojením je kombinace LC-MS. V hmotnostním spektrometru iontový zdroj ionizuje analyty za pomoci různých ionizačních technik, jako například elektrosprejové ionizace (ESI) či chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). MS je nekompatibilní s netěkavými pufrými, jako například citrátový a fosfátový, dochází ke kontaminaci iontového zdroje těmito látkami. Vzniklé ionty jsou separovány v analyzátoru za pomoci magnetického nebo vysokofrekvenčního pole dle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), a detektor poskytne odezvu v podobě hmotnostního spektra, které lze využít jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu. Tato metoda je vysoce citlivá a selektivní, avšak ekonomicky náročná. Mezi další detektory patří fluorimetrické, refraktometrické a elektrochemické. [8, 10–12]

### 3.1.3 Kolony

Kolona je trubice z nerezové oceli nebo plastu, naplněná částicemi nebo monolitem stacionární fáze. Kolona je na obou koncích opatřena fritami, které brání úniku stacionární fáze z kolony. Dělí se na analytické a preparativní. Kolony mají omezenou životnost, která se zkracuje například znečištěnými vzorky či špatnou údržbou. Z tohoto důvodu se doporučuje použití předkolony se stejnou stacionární fází, jež dokáže analytickou kolonu ochránit, toto je zvláště důležité u analýz biologických vzorků. Správně instalovaná a zvolená předkolona prakticky nesnižuje účinnost separace. [10, 11] Během analýzy je nutné také udržovat konstantní teplotu, která je jednou z nastavovaných separačních podmínek. Teplota se udržuje za pomoci kolonového termostatu od 10 až po 160°C u novějších přístrojů. [13] Při překročení provozních teplot kolony degradují. [5, 8, 10–12]

Kromě silikagelu mohou být použity jako stacionární fáze použity i jiné materiály, např.  $ZrO_2$ ,  $AlO_3$ ,  $TiO_2$ , polystyren-divinyl benzen či grafitizovaný uhlíku, které mohou být dále modifikovány.

Částice stacionární fáze mohou být děleny dle velikosti, charakteru a velikosti pórů, plochy povrchu a konfigurace. [5] Nejčastější jsou plně porézní částice silikagelu, které jsou dostupné ve vícero variantách, s velikostí do 5  $\mu m$ , ale používají se i tzv. core-shell částice, s pevným jádrem a porézní vrstvou stacionární fáze na povrchu. Ty mají větší počet teoretických pater než plně porézní částice při stejném průměru a v důsledku k menší difuzi skrz částici, rychlejšímu přenosu hmoty, a tudíž lepším separačním vlastnostem při menším zpětném tlaku.[12, 14]

Dále se používají pelikulární částice, tvořené pevným jádrem a pokryté velmi tenkou vrstvou stacionární fáze. Díky tomu mají malý povrch a hodí se k separaci zejména biomolekul. [5]

Poslední typem částic jsou perfúzní, obsahující velké póry propojené sítí malých (30-100 nm) pórů, což umožňuje tok mobilní fáze skrze částici. Tyto částice jsou obvykle větší, což limituje jejich užití pouze pro nižší tlaky. Nejlépe se hodí pro separaci makromolekul na preparativní škále. [5]

#### 3.1.4 Trendy v HPLC

Vývoj v dnešní době ženou zejména požadavky na rychlejší, účinnější a k životnímu prostředí šetrnější separace. Dobu analýzy lze zkrátit zkrácením kolony, zmenšením jejího průměru a zvýšením průtoku mobilní fáze. Citlivost lze zvýšit zmenšením částic, díky čemuž získáme vyšší a užší píky. Současně je však generován vyšší zpětný tlak. To vedlo k vývoji UHPLC (ultravysokoúčinné kapalinové chromatografii), kdy celý systém je schopný pracovat za vyšších tlaků. Optimální průměr částic použitých v UHPLC je 1,7  $\mu m$ . [15]

Dále se používají monolitické kolony. Ty jsou tvořeny z jednoho kusu materiálu, a to buď z nemodifikovaného nebo modifikovaného silikagelu, [16], Pro přípravu monolitických kolon je možné využít také polymery. [17] Struktura monolitu je tvořena makropóry (o průměru několika  $\mu m$ ), mezopóry(2-50 nm) a mikropóry (<2 nm). [12] Výhodou těchto kolon je jednoduchost přípravy, vysoká pórovitost, díky které mohou separace fungovat při vyšším průtoku, lepší přenos hmoty a rychlejší separace při přijatelných tlacích. S výhodou se používají k separaci makromolekul,



ale v dnešní době se i tento druh kolon dá použít k separaci malých molekul včetně léčiv. [18, 19]

V neposlední řadě se s úspěchem využívají povrchově porézní (core-shell) částice s pevným jádrem o velikosti od 1,3 do 5  $\mu\text{m}$ , kdy se při analýze dosahuje podobné účinnosti separace jako u porézních částic používaných v UHPLC, ale s nižšími dosahovanými tlaky. Jádro je nejčastěji z polymeru, silikagelu nebo kovu. Core-shell částice se využívají v reverzní HPLC, hydrofilně – interakční chromatografii (HILIC), ale i například v chirálních separacích. [14, 20]

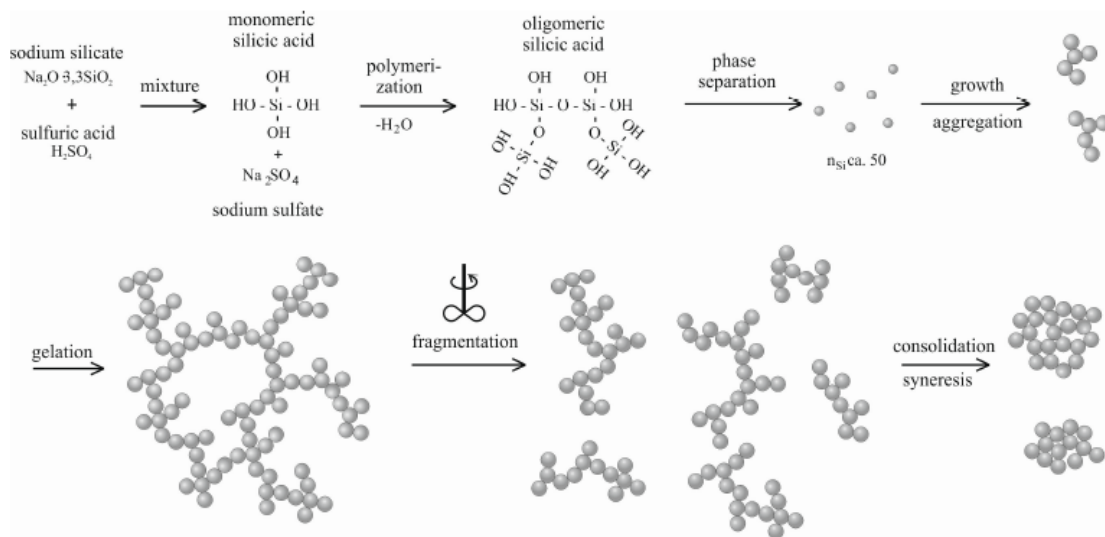
## 3.2 Silikagel

### 3.2.1 Příprava silikagelu

Silikagel je amorfni porézní materiál skládající se z atomů křemíku zesíťovaný atomy kyslíku, kde na povrchu jsou hydroxylové Si–OH skupiny, (silanoly), které mají polární charakter a jsou slabě kyselé ( $\text{pK}_A$   $6,8 \pm 0,5$ ). [21] Tendence odštěpovat proton je silně ovlivněna prostředím, například vodíkové můstky usnadňují reakci s hydroxidovými ionty. [22] Hlavními výhodami silikagelu jsou zejména chemická a mechanická stabilita, rychlý přenos hmoty a nosnost. [5] Nevýhodou silikagelu jako takového je jeho rozpustnost v prostředí, kdy je  $\text{pH} > 8$ . [22]

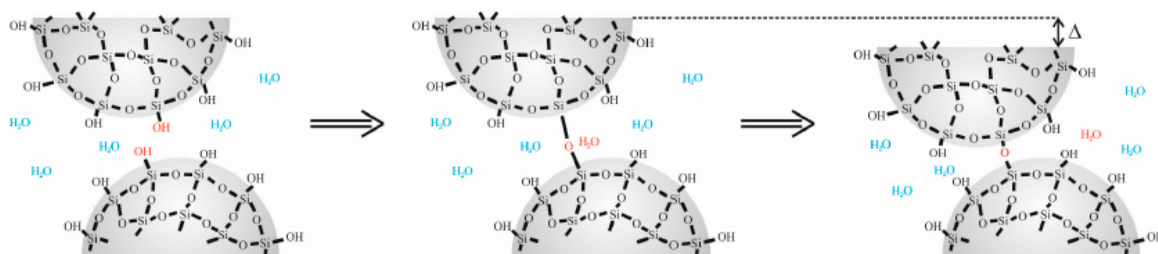
K přípravě silikagelu je potřeba získat roztok kyseliny křemičité. Je několik způsobů přípravy této látky, například tepelná hydrolyza chloridu křemičitého, reakce křemičitanu sodného v kyselém prostředí či kyselá hydrolyza methoxy- nebo ethoxy-silanů. [23, 24] Kyselina křemičitá ( $\text{pK}_A$  9,9) [24] následně podléhá kondenzačním reakcím a tvoří polykřemičité kyseliny. Ty tvoří jádra pro další vazbu nekondenzovaných monomerů, přítomných v roztoku. Vznikající koloidní částice jsou kulaté, neporézní a amorfni. Částice mezi sebou za působení mechanické energie či času kolidují. Jejich povrchové silanolové skupiny spolu reagují a dochází k agregaci nejdříve menších jednotek, které se poté spojují a dochází k gelaci. Celý proces je ilustrován na obrázku 2. Rychlost gelace je opět ovlivněna  $\text{pH}$  roztoku, množstvím částic, koncentrací přidaných solí a teplotou. Platí, že v bazickém prostředí dochází k vysokému větvení agregátů, zatímco v kyselém se agregáty spíše řetězí za sebou. [22, 24, 25]

Jak spolu kondenzuje stále větší množství silanolových skupin, mechanickým pnutím dochází k vytlačování vody (viz obrázek 3), synerezi gelu a vzniku pórů.



**Obrázek 2:** Příprava silikagelu z křemičitanu sodného, převzato a upraveno z [25]

Za synerézí stojí kondenzační reakce. Po propláchnutí hydrogelu se voda odstraní výparem v peci. Aby došlo k vzniku sférických částic, je nutné nahradit vodu organickým rozpouštědlem, například MeOH. Dehydratace a synerese je spojena se vznikem nových mezičásticových vazeb. Parametry pórů se dají ovlivnit dobou zrání, změnou pH při formaci gelu, tepelným ošetřením nebo změnou kapalného média.[10, 22, 24, 25]



**Obrázek 3:** Schématické znázornění synerese u dvou silikagelových částic, tekutina v pórech, pro zjednodušení znázorněna jako H<sub>2</sub>O modře, vznik nové siloxanové vazby červeně. Převzato a upraveno z [25]

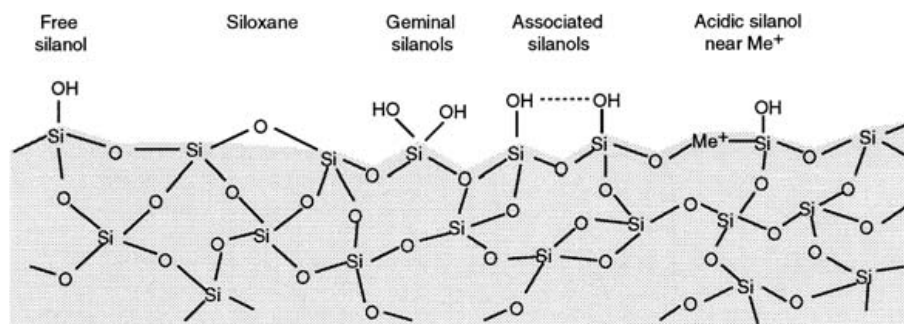
Jeden z velmi důležitých parametrů je také obsah kovů v použitých materiálech, protože kovové nečistoty, jako například draslík, sodík, vápník, železo či hliník okyselují povrch silikagelu, což vede k rozšíření píků zejména bazických látek a jejich chvostování. Některé jsou také silnými adsorpčními místy pro komplexotvorné látky, a přítomnost kovů může také ovlivnit vazbu molekul stacionární fáze na silanoly. [26] To je nevýhoda přípravy silikagelu z křemičitanu sodného (starší metoda), jelikož ten je

kovy znečištěnější. Tyto silikagely byly používány v kolonách před rokem 1990, a v literatuře je nazýván jako typ A. Novější postupy přípravy silikagelu jsou čistší, méně znečištěné kovy a nazývané typ B, a nejsou tak náchylné na výše zmíněné problémy. [5, 26]

### 3.2.2 Povrch silikagelu

Chromatografický proces probíhá na povrchu silikagelu, kde, jak již bylo zmíněno, se vyskytují Si-OH skupiny, tzv. silanoly, s kyselým polárním charakterem. [21]

Silanoly můžeme dělit do tří skupin: Izolované, geminální a vicinální, struktura jednotlivých druhů silanolů je vidět na obrázku 4. Jednotlivé silanoly přispívají různým způsobem k retenci, zejména izolované interagují velmi silně s bazickými látkami. Dále jsou přítomny siloxanové vazby, které prakticky vůbec k retenci polárních látek nepřispívají, díky vlastnostem Si-O-Si vazby a její neschopnosti tvořit vodíkové můstky. [22] Je ale možné pozorovat retenci nepolárních látek při velkých koncentracích vody v mobilní fázi. [23]. U starších metod přípravy se také častěji vyskytuje vazba Si-M<sup>+</sup>-Si, tedy vazba s kovem. Nawrocki shrnuje mechanismy, jakým tato kyselá místa vznikají, vychází přitom z literatury o katalyzátorech. [6, 27] Geminální a vicinální silanoly nejsou tak kyselé. Jsou ale schopné tvořit vodíkové můstky s dalšími molekulami, které se tak mohou na těchto skupinách zadržovat. [10, 28]



**Obrázek 4:** Chemická struktura silikagelu [10]

Koncentrace silanolů na povrchu je nejspolehlivěji určována za použití deuterované vody D<sub>2</sub>O nebo tritiové vody, HTO. Tato hodnota se pohybuje okolo 8±1,0 μmol/m<sup>2</sup>. [6, 28] NMR a IR metodami je možné zjistit typ a koncentraci jednotlivých silanolů. K určení koncentrace silanolů je také možno použít titraci NaOH v přítomnosti soli (methyllithia, dimethylzinku a dalších). [6, 22] Silanoly mohou být použity k navázání stacionární fáze (například C<sub>18</sub>, C<sub>30</sub>, fenylu a dalších), čímž je možné změnit retenční

vlastnosti silikagelu. Ze sterických důvodů ovšem není možné zajistit modifikaci každého silanolů, zvláště v případě delších řetězců, a tak je maximální koncentrace těchto organosilylických vazeb okolo  $4,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ . [21] Je tedy možno bezpečně říci, že na povrchu modifikovaných stacionárních fází stále zůstávají aktivní silanoly.

### 3.2.3 Kovy na povrchu silikagelu

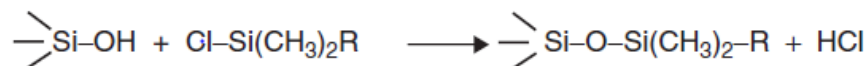
Promytí silikagelu rozpouštědlem s kyselým pH ho sice dokáže zbavit většiny kovových nečistot, ale ne všech. [6] V silikagelu může být přítomno až 20 prvků v koncentračním rozmezí  $\mu\text{g}/\text{g}$  a dalších 15 v koncentračním rozmezí  $\text{ng}/\text{g}$ . [29] Proč jsou kovové nečistoty problémem, bylo zmíněno výše v kapitole 3.2.1. Vliv těchto nečistot je nejlépe vidět na eluci chelatuujících složek. Byly tedy vyvinuty testy na obsah kovů v silikagelu, například s 2,4-pentandionem [30], dihydroxyantrachinonem [31] nebo aromatickými dihydroxyly. [32]

Engelhardt vyvinul jednoduchý test pro charakterizaci obsahu kovových nečistot stacionárních reverzních fází na základě rozdílných chelatačních vlastností 2,2'-bipyridylu a 4,4'-bipyridylu, kdy zaznamenal téměř lineární závislost asymetrie píku 2,2'-bipyridylu na obsahu železa. Píky 2,2'-bipyridylu se také zmenšovaly, což bylo dáno ireverzibilní adsorpcí. Aby se rozlišilo mezi metalofilními a silanofilními interakcemi u těchto látek, byl použit nechelatuující 4,4'-bipyridyl, který interaguje pouze se silanolem. Zavedl takzvaný „metal factor“, což je poměr asymetrie píků těchto dvou látek vynásobený stem. Čím je toto číslo blíže stu, tím menší je kovové znečištění. Dokázal také, že kovové znečištění se zvyšuje s používáním kolony, to je vysvětleno hromaděním kovů buďto z instrumentace nebo mobilní fáze. [26]

### 3.2.4 Reverzní fáze

Nejčastěji používanými reverzními fázemi jsou modifikované silikagely. Používají se reakce s ligandy, alkylchlorosilany, nejčastěji dimethyloktadecylchlorosilanem. Tyto ligandy reagují s volnými silanoly na povrchu, což dává vznik stacionárním fázím, známým jako reverzní. Obecná rovnice reakce je zobrazena na obrázku 5.

Analogickými modifikacemi je ale možné získat prakticky jakoukoli SF, mezi další ligandy často používané k modifikaci silikagelu patří například  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{30}$  nebo fenyl. Výhodou tohoto přístupu jsou dobře reprodukovatelné výsledky. K snížení počtu volných silanolů se používá tzv. endcapping, což je reakce s trimethylsilylchloridem,



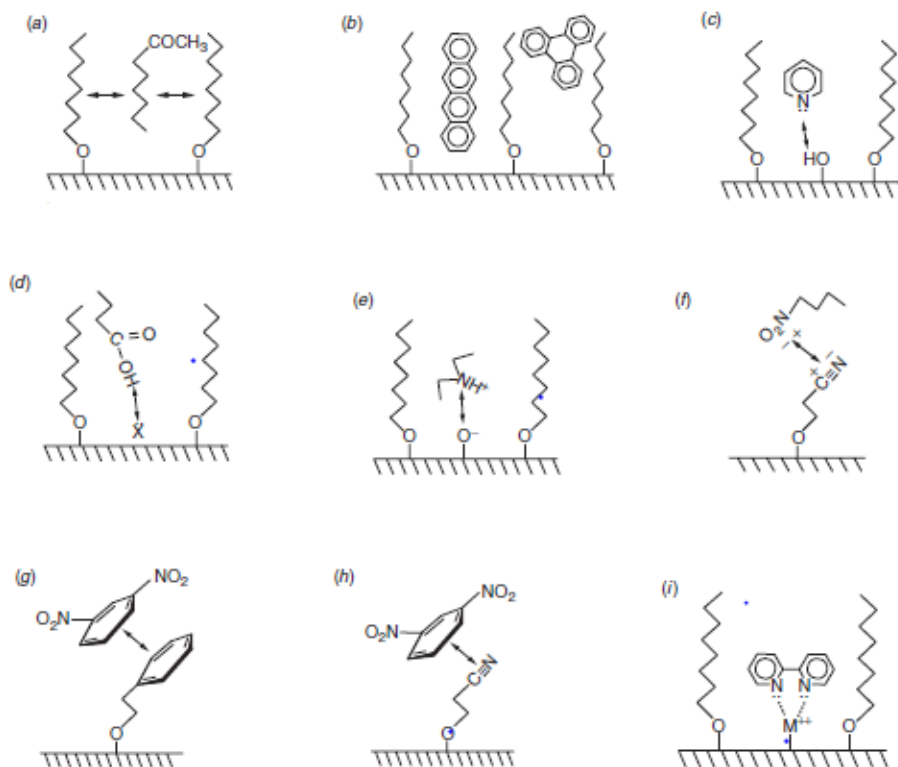
**Obrázek 5:** Syntéza vázané fáze reakcí chloralkylsilanu se silanolem na povrchu silikagelu. Převzato a upraveno z [7].

který jako stericky malý substituent dokáže pokrýt dalších 20-30% nezreagovaných silanolů, které jak bylo zmíněno výše, mohou negativně ovlivňovat analýzu. [5, 11] Nevýhodou daného postupu je, že tato malá skupina je více náchylná k hydrolyze v kyselém prostředí, což může negativně ovlivnit separační vlastnosti kolony. [5]

Dále existují reverzní fáze s objemnějšími postranními substituenty na modifikujícím ligandu, například isopropylem či isobutylem. Ty stericky zabraňují hydrolyze stacionární fáze při nízkých hodnotách pH. Dále se používají také polymerní fáze, které mají stabilitu ve vyšších rozmezích pH, jejich nevýhodou je ovšem nižší reprodukovatelnost procesu výroby. [5, 10, 11]

Retence solutu je ovlivněna různými interakcemi mezi solutem, mobilní fází a stacionární fází. Na obrázku 6 je přehled nejdůležitějších z nich, z toho interakce f, g a h nejsou pro stacionární fáze na bázi alkylsilanů důležité.

- (a) Hydrofobní interakce: ovlivňují retenci hydrofobních molekul. Celková hydrofobicita kolony narůstá s prodlužujícími se použitými řetězci, endcappingem, vyšší koncentrací vazeb ligandu a menším průměrem pórů.
- (b) Sterické interakce: Pokud je koncentrace navázaných ligandů vysoká, rovné, planární molekuly se mezi ligandy vmezeří daleko jednodušeji a jsou tedy více zadržovány, naopak objemnější molekuly jsou zadržovány méně. Tato vlastnost dále vzrůstá s delšími ligandy a menšími póry.
- (c) Vodíkové vazby s bazickými analyty: Jak již bylo zmíněno, bazické analyty mají schopnost interagovat s volnými silanoly a být tak zadržovány. Kyselost kolony je vyšší u silikagelů typu A, avšak snižuje se s endcappingem. Vliv této interakce se dá částečně odstranit přidávkem TEA do mobilní fáze.
- (d) Vodíkové vazby s kyselými analyty: Pro různé kolony se X liší, ve starších kolonách to mohou být kovové částice. Vede k vyšší zadrži karboxylových kyselin.



**Obrázek 6:** Interakce solutu s kolonou, určující selektivitu kolony. (a) hydrofobní interakce, (b) sterické interakce, (c) vodíková vazba s bazickými analyty, (d) vodíková vazba s kyselými analyty, (e) elektrostatické interakce, (f) interakce dipól – dipól, (g)  $\pi - \pi$  interakce na fenylové SP, (h)  $\pi - \pi$  interakce na kyano SP, (i) komplexace chelatujících solutů. Není zde zobrazena spojující silanová skupina  $[-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-]$ . Převzato a upraveno z [5]

(e) Elektrostatické interakce: interakce se silanoly a jejich ionizace vzrůstá se zvýšením pH, snadněji dostupné jsou u neendcappovaných kolon a u silikagelů typu A. To vede k nižší retenci ionizovaných kyselin kvůli repulzním silám, a k vyšší retenci ionizovaných bazí.

(f) Komplexace chelatujících látek: jak již bylo zmíněno výše, objevuje se zejména u silikagelu typu A, znečištěný kovy. [5]

### 3.2.5 Charakterizace stacionárních fází

Z principu metody výroby reverzních fází, kdy se firmy snaží optimalizovat proces vazby ligandu na silikagel, používají jinak reaktivní silany a různé procesy výroby silikagelu, nemůže být překvapením, že stejně označené kolony, například  $\text{C}_{18}$  se od různých výrobců mohou značně lišit svými separačními vlastnostmi. [33] Popisy výrobců, přikládání ke kolonám, jsou často omezené a nedostačující pro odhad chování

konkrétního analytu na dané stacionární fázi. [21, 34] Na trhu je dostupno mnoho různých kolon, je tedy obtížné vybrat tu správnou pro určitou separaci. Evropský lékopis dělí kolony na 7 typů, [35] ale v člancích v není specifikovaná použitá kolona. [34]

Retenční vlastnosti kolon závisí na fyzikálně chemických vlastnostech silikagelu, jako jsou povrch, hustota plnění, množství a typ silanolů, obsah kovové nečistoty, proces vazby ligandu, koncentrace vazeb ligandu a endcapping. [33, 34] K charakterizaci jednotlivých kolon se používají různé metody a testy, například od Engelhardta [33], či Tanaky[36], vyvinuto jich však bylo mnohem více. [34]

(A) Charakterizace fyzikálně chemických vlastností silikagelu:

- (a) Existuje lineární závislost mezi procentuální hmotností uhlíku a retenčním faktorem. [21] Obsah uhlíku je zjišťován CHN analýzou, kdy se vzorek spálí ve spalovací komoře s čistým kyslíkem, rozdělí v plynovém chromatografu a množství jednotlivých látek je určeno vodivostním detektorem.
- (b) Velikost částic je definována jako střední hodnota velikosti částic. Nejčastěji se určuje mikroskopicky, sedimentací nebo laserovou difrakcí. Čím menší částice, tím větší je účinnost separace. Bohužel, se zmenšujícími se částicemi klesá permeabilita a vzrůstá zpětný tlak. [5, 21]]
- (c) Specifická plocha povrchu porózní částice je rovná součtu vnitřních a vnějších ploch, a běžně se měří BET metodou, spočívající v adsorpci molekul dusíku na povrch částice.. Z množství adsorbovaného dusíku je možné spočítat plochu povrchu. Větší plocha znamená více místa, kde může probíhat separační proces. [5, 21]
- (d) Porozita – pór je dutina, díra nebo kanálek spojený s povrchem částice. Dutina, nemající spojení s povrchem je tzv. zavřený pór a nepřispívá k celkové porozitě. Póry se dělí dle velikosti na makropóry (o průměru několika  $\mu\text{m}$ ), mezopóry(2-50 nm) a mikropóry (<2 nm) Porozita je měřena buďto rtuťovou porozimetrií, kdy se využívá nesmáčivosti rtuti, nebo pomocí sorpčních studií. Platí, že čím menší průměr pórů, tím větší je plocha povrchu.[21] Nicméně pro analýzu je nutné, aby se analyt mohl dostat bez potíží do póru. Uvádí se vhodná prostřední hodnota průměru pórů okolo 9 nm pro analýzu látek s molekulovou hmotností pod 500 Da. [5]

## (B) Charakterizace chemického povrchu silikagelu

- (a) Určení koncentrace volných silanolů a kovových nečistot je zmiňováno v 3.2.3, respektive 3.2.2.
- (b) Jelikož retence solutu je ovlivněná jak hydrofilními, tak hydrofobními vlastnostmi stacionární fáze, tak by látky zvolené do testované směsi měly být z různých skupin organických látek. Měly by nejen odhalit hydrofobní vlastnosti, ale také vnést vzhled pro použitelnost kolon k separaci polárních a zvláště bazických látek. [34] Byla provedena studie, která testovala 36 různých parametrů vybraných z literatury na různých kolonách a po statistickém vyhodnocení dat vybrala 4 nejvhodnější a postačující. Těmi jsou poměr relativní retenční faktor fenolu a benzylaminu pro aktivitu silanolů, retenční faktor amylobenzenu pro hydrofobicitu, relativní retenční faktor trifenyly/*o*-terfenyly pro sterické interakce a hydrofobicitu a již zmiňovaný bipyridylový test pro aktivitu silanolů a obsah kovových nečistot. [34]

## 3.3 Chirální separace

### 3.3.1 Izomerie

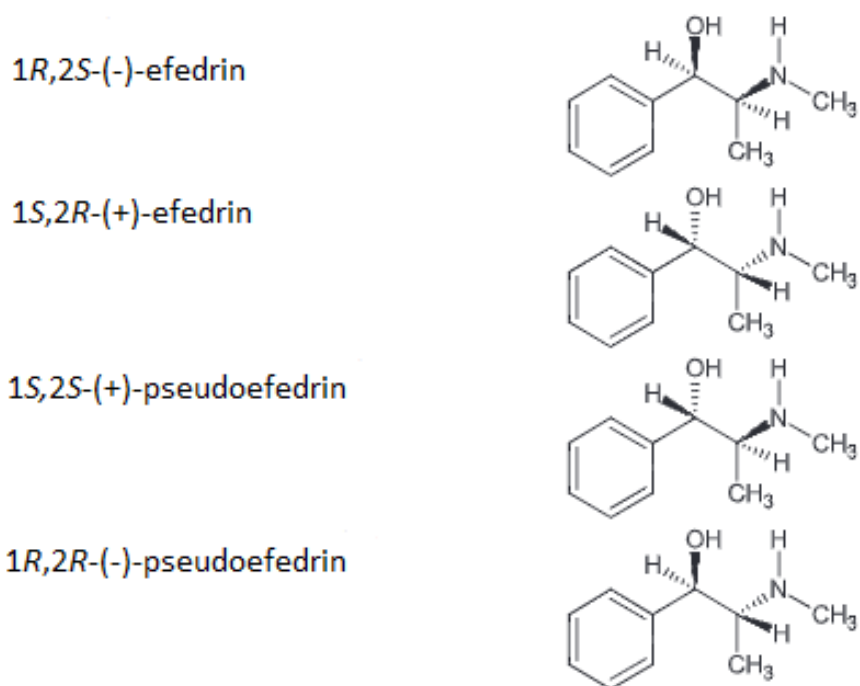
Izomery jsou molekuly mající stejný sumární vzorec, které ale nejsou strukturně totožné. Izomery jsou děleny na konstituční izomery a stereoizomery. Konstituční izomery se navzájem liší například umístěním dvojných vazeb, funkční skupiny a nebo uspořádáním uhlíkového řetězce. Stereoizomery naopak mají shodné uspořádání vazeb mezi sebou, ale liší se uspořádáním jednotlivých vazeb v trojrozměrném prostoru. Molekula je chirální, pokud jí nelze ztotožnit s jejím zrcadlovým obrazem. Pojem chiralita pochází z řeckého *chiros* (ruka). Nejznámější příčinou chiralit v organických molekulách je asymetrické centrum, kdy jsou na atom uhlíku navázány čtyři rozdílné substituenty. Pokud v molekule existují asymetrická centra, počet možných stereoizomerů je  $2^n$ , kde  $n$  značí množství chirálních center. Stereoizomery je možné dále dělit na enantiomery a diastereoizomery. [5, 37]

Enantiomery jsou neztotožnitelné zrcadlové obrazy, mající stejnou vnitřní energii, díky stejným vazebným úhlům, meziatomovým vzdálenostem a meziatomovým interakcím. Směs enantiomerů v poměru 1:1 se nazývá racemická směs. Směsi



enantiomerů s jinými poměry se popisují buďto poměrem enantiomerů (např. 97:3), nebo enantiomerickou čistotou (97%). Ve vztahu k léčivům, enantiomer vyznačující se vyšší aktivitou se nazývá eutomer, zatímco ten s nižší distomer. [5, 11, 37]

Diastereoizomery nejsou zrcadlovými obrazy, mají jiné fyzikálně - chemické vlastnosti a mohou tedy být separovány achirální chromatografií. K rozlišení jednotlivých konfigurací na chirálních centrech se používají stereochemické deskriptory (*R* a *S*, *L* a *D* nebo + a -). *R* a *S*, pro chirální molekuly nejpoužívanější, z latinského *rectus*, pravý či *sinister*, levý a označují konfiguraci, ve které jsou substituenty na chirálním centru seřazeny podle Cahn - Ingold - Prelogova pravidla. Toto pravidlo přiřazuje jednotlivým substituentům prioritu dle jejich protonového čísla za podmínky, že substituent s nejnižším protonovým číslem směřuje od pozorovatele. *R* je vyhrazeno pro uspořádání substituentů po směru hodinových ručiček, zatímco u *S* je tomu naopak. *L* a *D* se vztahují k Fisherově projekci používanou k označení cukrů a aminokyselin, a nakonec (+) a (-) označuje vlastnost enantiomerů stáčet rovinu polarizovaného světla na levou (-) nebo pravou (+) stranu. [5, 10, 11, 37]



**Obrázek 7:** Strukturní uspořádání efedrinu a pseudoefedrinu [38]

Na obrázku 7 je vidět, že jak (1*R*,2*R*)-(-)-pseudoefedrin, tak (1*S*,2*S*)-(+)-pseudoefedrin jsou zrcadlové obrazy, enantiomery jeden druhého. To samé platí o (1*S*,2*R*)-(+)-efedrinu a (1*R*,2*S*)-(-)-efedrinu. Avšak pseudoefedrin s efedrinem zrcadlovým obrazem nejsou, vždy se liší konfigurací na jednom chirálním centru a tudíž jsou diastereoizo-

mery. [5, 11, 37]

Ve speciálních případech, kdy se dva diastereoizomery liší pouze v konfiguraci na jednom chirálním centru, můžeme říci, že tyto látky jsou epimery. Pokud jsou látky achirální, ale přesto obsahují centra chiralit, nazýváme je meso sloučeninami. [5, 11, 37]

### 3.3.2 Úvod do chiralit

Chiralita byla objevena Pasteurem díky jeho zjištění o preferenčním metabolismu (-)-tartrátu amonného plísní *Penicillium glaucum*. [39] Chirální povaha žijících systémů má zřejmé důsledky na biologicky aktivní látky s nimi interagujícími. Na molekulární úrovni chiralita představuje elementární vlastnost „stavebních kamenů života“, jako jsou například aminokyseliny a cukry, kterážto se přenáší i na molekuly složitější, jako například peptidy a polysacharidy. Z toho důvodu jsou metabolické a regulační procesy probíhající v organismech na stereochemii citlivé a často je možné pozorovat různé odpovědi na odlišné enantiomery. Stereoselektivita je charakteristický rys enzymatických reakcí, interakcí receptoru s ligandem a metabolických procesů. Může se lišit druh od druhu a dokonce i mezi jednotlivými jedinci. Proto je důležité při studiu xenobiotik se stereochemií počítat. [40]. Možné rozdílné farmakokinetické a farmakodynamické efekty enantiomerů jsou následující:

- (a) rozdílná vazebná afinita k biologickému cíli a z toho vyplývající snížená aktivita jednoho z enantiomerů (*R/S*)-karvedilol, (*S*)-(+)-ibuprofen
- (b) antagonistické účinky jednotlivých enantiomerů na biologickém cíli: (-)-dobutamin vs (+)-dobutamin
- (c) nesynergistické farmakologické účinky
- (d) rozdílné biologické cíle a z nich vyplývající odlišný účinek - chinin, chinidin
- (e) vazba jednoho z enantiomerů na odlišné cíle a z toho vyplývající nežádoucí účinky až toxicita - (-)-tramadol vs. (+)-tramadol, *S,S'*-ethambutol vs *R,R'*-ethambutol
- (f) antagonizace nežádoucích účinků neaktivním enantiomerem - v tomto případě je racemická směs použita s výhodou
- (g) výhodnější biodostupnost díky sníženému first-pass metabolismu (verapamil)

(h) nižší clearance jednoho z enantiomerů [41]

Zjištění, že se enantiomery takto mohou svou aktivitou lišit, vedlo regulační autority na začátku 90. let ke zvýšení nároků na testování aktivity jednotlivých enantiomerů a preferenci vývoje enantiomerů. [1] To vedlo farmaceutické firmy k procesu nazývaný chiral-switching. Tento pojem byl definován v roce 1999 a znamená vývoj léku jakožto izolovaného enantiomeru, i když byl předtím vyvinut a schválen jako racemát nebo směs diastereoizomerů. [2] Potenciálními výhodami chiral-switchingu jsou:

- (a) zlepšený terapeutický index díky lepší selektivitě a vyšší účinnosti
- (b) zlepšené a zjednodušené farmakokinetické parametry
- (c) snížený sklon k lékovým interakcím
- (d) vystavení pacienta nižší dávce léku

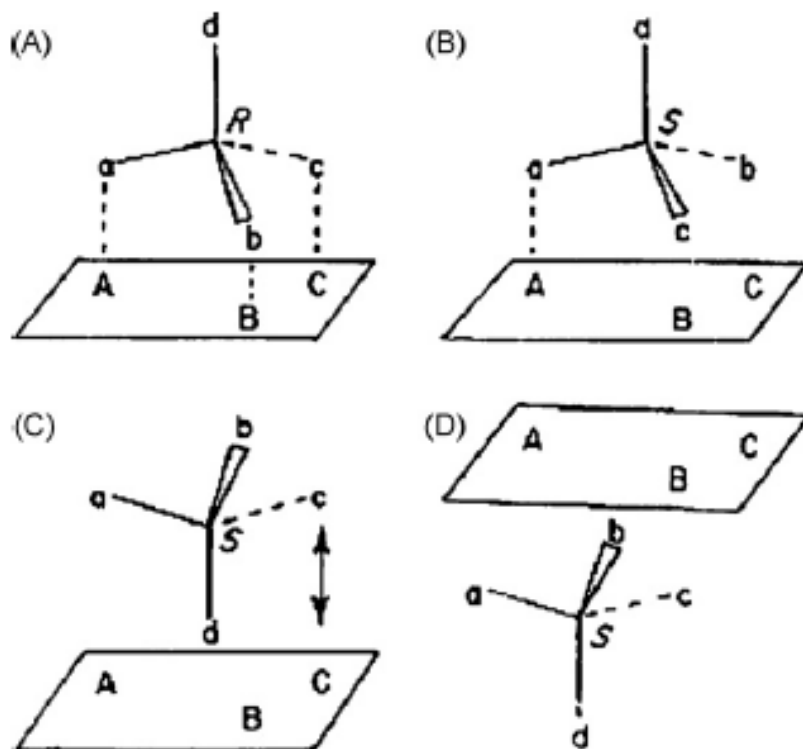
[2, 41]

Objevy nových chirálních stacionárních fází a výzkum v oblasti chirální rekognice jednotlivých chirálních selektorů v posledních dekadách byly hnány zejména potřebou farmaceutických firem těmto nárokům vyhovět. Zároveň se vývoj chirálně čistých látek stával jednodušším s rozvojem analytických, separačních a syntetických metod. [40, 42, 43]

### 3.3.3 Mechanismus chirální separace

První pokusy popsat chirální rozlišení na molekulární úrovni vedly k návrhu takzvaného *three-point attachment modelu*. V původní podobě tohoto modelu, navrhnutého Eassonem a Stedmanem (viz obrázek 8, je potřeba ke vzniku chirální separace nejméně tří stereospecifických přitažlivých kontaktních interakcí mezi chirálním selektorem a chirálním substrátem, Nicméně v minulosti byla často upozadována ještě jedna podmínka a to přístupnost k receptoru, který je přístupný často z jedné strany. Historicky byl tento model podrobován kritice, ale přesto je pro svou jednoduchost a ilustrativnost stále používán i ve výuce. [5, 44]

V dnešní době je konsensem, že ne všechny tři interakce musí být nutně přitažlivé. Jak přitažlivé, tak i odpudivé síly mohou stejnou měrou ovlivnit selektivitu, obě totiž mohou stabilizovat interakci chirálního selektoru s analytem. Dále je nutné mít na



**Obrázek 8:** Easson/Stedmanův model, jak byl původně navrhnut. Pro účely přiřazení *RS* deskriptorů, je předpokládáno, že prioritita je  $a > b > c > d$ . Vazná místa pro *a*, *b*, *c* jsou *A*, *B* a *C*. V modelu (A), *R*-enantiomer se může vázat ke všem třem místům a byl by považován za nejaktivnější. Nicméně, vazba *S*-enantiomeru je limitována na jediné kontaktní místo (*B*). Možnost (C) interakce není možná kvůli sterickému bránění skupinou *d*, vzdálenosti *a*-*A*, *b*-*B* a *c*-*C* jsou příliš velké. Dále, přístup *S*-enantiomeru z vnitřní strany, jako je ukázáno v obrázku D, není možné. [44]

paměti, že velké množství interakcí, jako  $\pi - \pi$  nebo dipólové, jsou ve své podstatě vícebodové. Také molekuly, obsahující chirální centra v rigidních strukturách jako například cyklu, splňují geometrické požadavky jednodušeji nežli konformačně labilní struktury. V neposlední řadě, prostředí (povrch adsorbentu a molekuly rozpouštědla) může přispívat ke vzniku chirální interakce, například solvatací aktivních míst. Přídavek solí, či úprava pH může zprostředkovat konformační změny analytu či změnit sílu elektrostatických interakcí.[5, 44, 45]

Interakce mezi chirální molekulou a chirálním selektorem zahrnují:

- (a) Iontové interakce mezi pozitivně a negativně nabitými skupinami
- (b) Vodíkové můstky mezi H-donorovými skupinami, nejčastěji vodík s vazbou na elektronegativní prvek a H-akceptorovou skupinou, což bývá volný elektronový pár

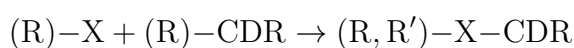
- (c) Ion - dipól a dipól - dipólové síly, nazývané jako orientované síly, se vyskytují mezi iontem a permanentním dipólem nebo permanentními dipóly. Dipól je přitahován k iontu nebo dva permanentní dipóly k sobě.
- (d) Indukční síly - jedna molekula je polarizována permanentním dipólem, na polarizované molekule vzniká indukovaný dipól.
- (e) Disperzní síly - kdy momentální náboj vznikne náhodně díky kmitání molekul
- (f)  $\pi - \pi$  interakce
- (g) Kation —  $\pi$  interakce, kdy jsou  $\pi$  elektrony aromatického jádra přitahovány ke kladnému náboji kationtu
- (h) Tvarová a velikostní způsobilost - analyt se musí stericky vejít do selektoru
- (i) Funkční způsobilost - je nutná taková orientace analytu se selektorem, aby k interakcím mohlo dojít
- (j) Dynamická způsobilost - maximalizace vzniku interakcí vhodnou adaptací konformace molekuly [5, 37, 44–46]

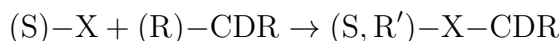
V reálných chromatografických systémech mimo stereoselektivní interakce mezi selektorem a analytem také dochází k nesteroselektivní adsorpci solutů na holý silikagel nebo na nestereospecifická místa na selektorech. To ovlivňuje retenční chování analytů. Metody určení podílu stereoselektivních a nesteroselektivních interakcí byly vyvinuty pro některé CSP. [45, 47]

Z kapitoly 3.3.1 vyplývá, že diastereoizomery se vyznačují odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, je tedy možné je od sebe separovat v achirálních podmínkách. Složitější je to s enantiomery, které se svými vlastnostmi shodují. Nutností je tedy jejich konverze buďto na diastereoizomery (nepřímá metoda), nebo diastereoizomerické komplexy (přímá metoda).

### 3.3.4 Nepřímá metoda chirální separace

Princip nepřímé metody spočívá v reakci enantiomerů s chirálním derivatizačním činidlem (CDR), dle obecné reakce





Vznikající diastereoizomery je možné dělit na běžných HPLC kolonách. V poměru s přímou metodou je ekonomicky méně náročná, není potřeba vybírat mezi rozdílnými CSP. Je ovšem nutno splnit několik podmínek. [5, 10, 11]

1. Enantiomer musí mít ve své struktuře derivatizovatelnou skupinu, aby mohlo dojít k derivatizaci.
2. Činidlo musí být enantiomerně co nejčistší, aby nedošlo ke vzniku druhých dvou stereoizomerů
3. Nesmí docházet k racemizaci činidla, produktů nebo analytů.
4. Reakce s činidlem musí proběhnout kompletně. Rychlostní konstanty derivatizační reakce se mohou lišit pro jednotlivé enantiomery. Pokud není derivatizace dokončena, výsledný enantiomerní poměr nemusí být 1:1, jak je očekáváno. Této chybě lze zamezit pomocí zvýšení reakční teploty, nadbytku CDR a dostatečnému času pro průběh reakce.

Je výhodné, aby funkční skupina byla derivatizována blízko chirálnímu centru molekuly, aby separace enantiomerů proběhla co nejlépe, s preferencí vzniku amidů nebo karbamátů, které mají rigidnější strukturu. Existuje množství činidel pro reakci s analyty, výběr závisí na typu derivatizované skupiny a způsobu detekce. Mezi používaná činidla patří 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glukopyranosyl isothiokyanát (GITC), 1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alaninamid (Marfeyho činidlo) či 1-(9-fluorfenyl)ethylchloroformiát (FLEC). K detekci se používá buďto UV nebo fluorescenční detektor, avšak je nutné dodat, že enantiomerní poměr nemusí přímo odpovídat poměru plochy píků, jelikož se vzniklé diastereoizomery mohou lišit v odpovědi detektoru. Nepřímá metoda se s výhodou používá u biologických vzorků, protože lze využít vysoce senzitivních CDR a tedy citlivějších detektorů. [5, 10, 11, 39, 48]

### 3.3.5 Přímá metoda chirální separace

Přímá metoda spočívá v reverzibilní tvorbě přechodných diastereoizomerních komplexů mezi dvěma enantiomery a chirálním selektorem (CS). Síla interakce jednotlivých enantiomerů s CS se liší a diastereomerní komplexy tak mají rozdílnou stabilitu. Díky tomu mohou být separovány. Existují dvě provedení přímé chirální

separace. Jedna využívá chirálních aditiv mobilní fáze, kdy se diastereoizomerické komplexy tvoří přímo v mobilní fázi. Nazývá se CMPA mód, z anglického *chiral mobile phase additive*, a probíhá na standardně používaných stacionárních fázích. Při druhém způsobu je CS kovalentně navázán, případně pevně adsorbován na nosič a společně vytváří chirální stacionární fázi (CSP). [4, 5, 10, 11, 39]

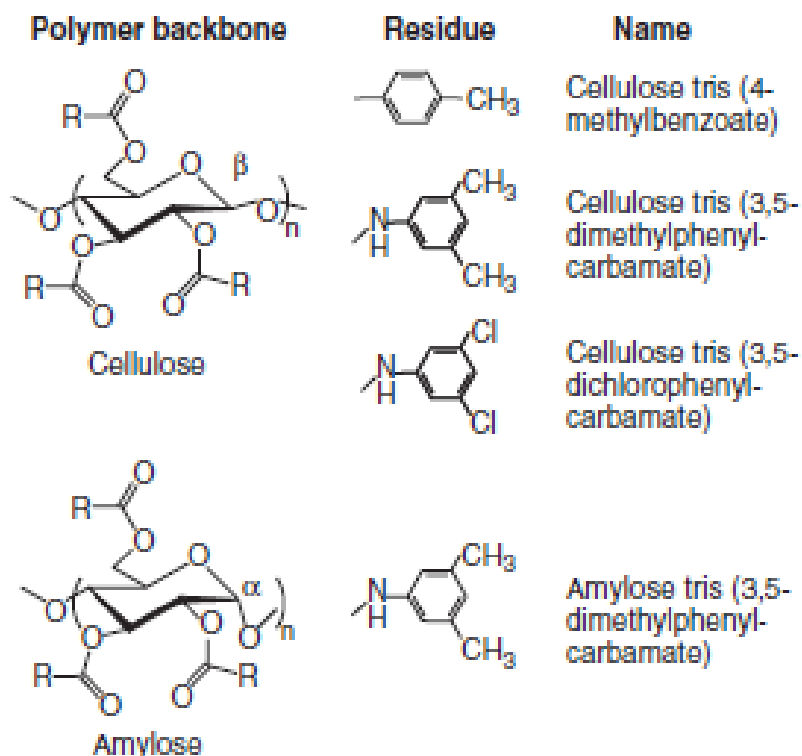
Přídavek CS do mobilní fáze se hojně využívá v kapilární elektroforéze, použití v HPLC je limitované. CMPA může být nekompatibilní s detektory či poskytnout odlišnou odpověď pro jednotlivé enantiomery, a mohou se objevit systémové píky. Navíc se CS často špatně oddělují od analytů, což rapidně snižuje vhodnost metody pro preparativní chromatografii. Nedají se z tohoto důvodu znovu použít a to metodu prodražuje. Mezi využívané CS patří modifikované i nemodifikované cyklodextriny, chinin a chinidin, makrocyclická antibiotika a jiné. [4, 5, 10, 11, 39]

Separace s CSP je metodou volby pro jak analytickou, tak preparativní separaci. Chirální selektor je kovalentně navázán nejčastěji na silikagel, ale může jím být potažen i polymer. Mobilní fáze je achirální. Selektor není přítomen v eluátu, takže neruší detekci a píky enantiomerů mají stejnou odezvu, což umožňuje určit množství jednotlivých enantiomerů. Nevýhodou je vyšší cena kolon a horší separační účinnost než u běžných RP kolon. Nejpoužívanějším selektorům jsou věnovány následující kapitoly. [4, 5, 10, 39]

### 3.3.6 Polysacharidové CSP

První separace enantiomerů na celulóze jako chirálním selektoru byla pozorována v roce 1951, ale nebylo to dříve než v roce 1973, kdy Hesse a Hagel použili triacetát celulózy k separaci enantiomerů. V následujících letech bylo syntetizováno rozličné množství derivátů polysacharidů Okamoto. [49] Nejčastěji využívanými polysacharidy se staly kvůli dostupnosti, jednoduchosti derivatizace a schopností chirální rekognice celulóza a amyulóza. [50] Celulóza je lineární polysacharid, tvořený jednotkami glukózy, navzájem spojenými 1,4- $\beta$ -glykosidickou vazbou. Amyulóza je polysacharid s helikální strukturou, tvořený jednotkami glukózy navzájem spojenými 1,4- $\alpha$ -glykosidickou vazbou. S největším úspěchem v chirální separaci jsou používané aromatické karbamáty, zejména tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) a tris(3,5-dichlorofenylkarbamát) celulózy a amyulózy. [44, 45, 50] Tyto CSP jsou ukotveny na silikagelových částicích, nicméně je možné využít i částice jiných polymerů či

oxidu zirkonia. [50] Ukotvení bylo zvoleno kvůli lepším mechanickým vlastnostem materiálu, než u samotného triacetátu celulózy. [5, 51]



**Obrázek 9:** Polysacharidové CSP odvozené od celulózy a amylózy, upraveno [5].

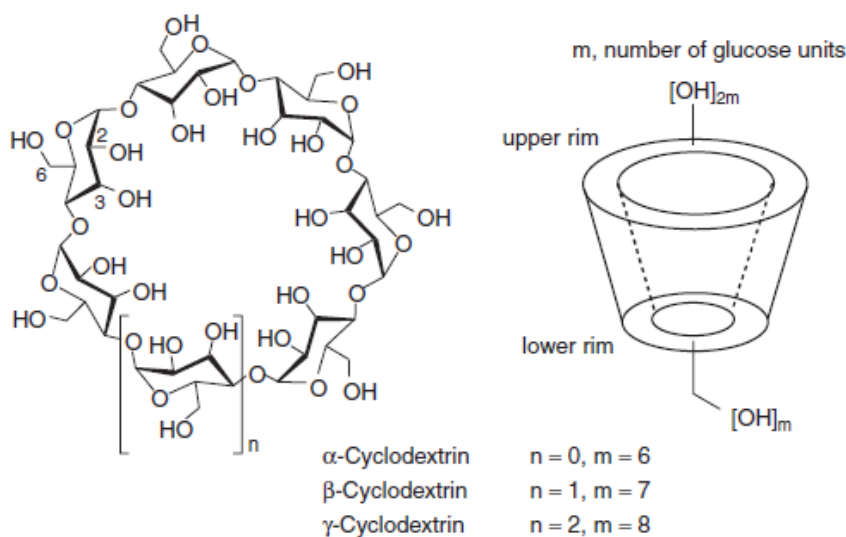
Mezi mechanismy chirální diskriminace u tohoto typu CSP se uplatňují zejména vodíkové můstky,  $\pi - \pi$  interakce, orientační a disperzní síly. Helikální struktura zmíněných derivátů polysacharidů chirální separaci napomáhá, dochází k tvorbě chirálních dutin jak v helixu, tak mezi jednotlivými polysacharidovými řetězci. Karbamátová vazba na polysacharid napomáhá stabilizaci těchto helikálních struktur a různé derivatizace dále ovlivňují chirální vlastnosti CSP. Tyto mechanismy ale stále nejsou přesně pochopeny. [4, 50, 52] Polysacharidové CSP mohou být použité jak v reverzním, normálním, tak polárně organickém módu. Při polárně organickém módu se využívá nevodné polární mobilní fáze, například metanol nebo acetonitril, společně s malým množstvím organické báze, jako triethylamin, amoniak a kyseliny, jako mravenčí nebo octovou. Důležitou výhodou oproti normálnímu módu je možnost použití v MS detekci s elektrosprejovou ionizací. Starší polysacharidové kolony trpěly inkompatibilitami s některými rozpouštědly, jako například aceton, toluen, dichlormetan či chloroform kvůli bobtnání polymeru, ale nověji vyvinuté potažené CSP už tento problém překonaly. V dnešní době jsou polysacharidové CSP,



kterých je na trhu více než 100, jedny z nejpoužívanějších fází, právě díky možnosti strukturní variability, možnosti použití ve vícero módech a širokým schopnostem chirální separace. Jsou materiálem volby i pro preparativní chromatografii. Novinkou jsou polysacharidem potažené částice silikagelu se stříbrem a polymerní monolitické kolony. [4, 5, 44, 45, 50–53]

### 3.3.7 Cyklodextrinové CSP

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy toroidního tvaru, složené z D-glukopyranózových jednotek navzájem spojené 1,4- $\alpha$ -glykosidickou vazbou. Jsou tvořeny hydrolýzou škrobu za užití cyklodextrin-glykosyltransferázy (CGTázy). Rozlišují se tři typy cyklodextrinu, v závislosti na počtu spojených jednotek glukózy;  $\alpha$ -,  $\beta$ -, a  $\gamma$ -cyklodextriny jsou složeny ze šesti, respektive sedmi a osmi jednotek.  $\beta$ -cyklodextrin je méně rozpustný ve vodě, lépe izolovatelný a levnější než  $\alpha$ - a  $\gamma$ -cyklodextriny [54]. Rozdílný počet jednotek dává vnitřní dutině rozdílné průměry. Obecně vzato,  $\alpha$ -cyklodextrinová dutina je schopna včlenit molekulu o velikosti šestičlenného aromatického kruhu,  $\beta$ -cyklodextrinová dutina pojme naftalenové jádro a nakonec velikost  $\gamma$ -cyklodextrinové dutiny umožňuje alespoň částečné včlenění tříjadrových molekul. Cyklodextrinový torus je lemován primárními hydroxylovými skupinami v poloze 6 a sekundárními hydroxylovými skupinami v polohách 2 a 3, a tato orientace hydroxylů dává vznik hydrofilním okrajům, zatímco éterické kyslíky a uhlovodíková kostra propůjčuje hydrofobní vlastnosti dutině (kavitě), což je vidět na obrázku 10. Hydroxyly mohou být dále modifikovány. [5, 54–56]

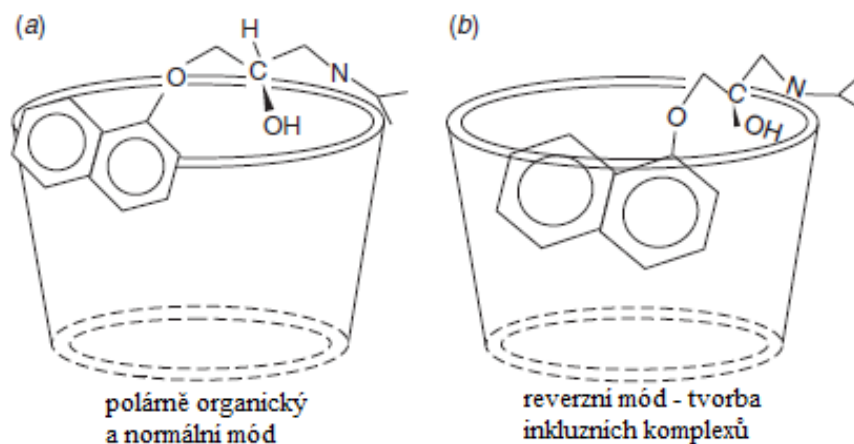


**Obrázek 10:** Struktura cyklodextrinu. [5]

První stacionární fáze na bázi cyklodextrinu byly spojené etylendiaminovým můstkem, tato vazba ale byla náchylná k hydrolyze a ovlivňovala retenci. Kvůli těmto nevhodným vlastnostem nebyly uvedeny na trh. První komerčně dostupné cyklodextrinové CSP, vyvinuté Armstrongem, byly spojeny epoxidovou vazbou, která je stabilní, ale je možná i karbamátová vazba. V dnešní době jsou na trhu dostupné různé druhy cyklodextrinových CSP, které mohou být děleny do tří typů: nativní, derivatizované a aromaticky derivatizované cyklodextrinové CSP. Nativní cyklodextriny jsou efektivně používané v polárně-organickém módu, nejčastější využití nachází  $\beta$ -cyklodextrin. Derivatizované cyklodextriny obsahují nearomatický substituent, kterým může být acetyl, ale také methyl či 2-hydroxypropyl. Substituce hydroxypropylem zabudovává do molekuly cyklodextrinu další chirální centrum. Aromaticky derivatizované cyklodextriny jako jediné z cyklodextrinů mohou být využity v normálním módu. Typickým substituentem je dimethylfenyl. [5, 45, 55, 56] Koncentrace navázaných cyklodextrinů na povrchu se liší v závislosti na substituci cyklodextrinu a použité metodě, lze ale říci, že se pohybuje od 0,3 do 0,6  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ . [57–59]

Typ chirálních interakcí u cyklodextrinu závisí na použitém módu. V reverzním módu dochází ke tvorbě takzvaných inkluzních komplexů, na jejichž bázi dochází k separaci. Inkluzní komplexy můžeme popsat jako soubor dvou nebo více molekul, ve kterých jedna z molekul, „hostitel“, v tomto případě cyklodextrin, obsahuje druhou molekulu — analyt („hosta“). K vytvoření inkluzního komplexu je také důležité, aby rozměry kavity odpovídaly rozměrům analytu. Vznik komplexu zahrnuje vstup lipofilní části molekuly do lipofilní kavity cyklodextrinu, přitom dojde k vytěsnění molekul rozpouštědla z vnitřku dutiny. Současně hydrofilní část molekuly interaguje s volnými hydroxyly a substituenty na okrajích cyklodextrinu. Komplex stabilizují zejména Van der Waalovy síly a hydrofobní interakce, ale roli také hrají sterické efekty a vodíkové můstky. U substituovaných cyklodextrinů se uplatní dipólové momenty a  $\pi - \pi$  interakce. Možné je ale zanoření pouze některých skupin molekuly a pokud je interakce dostatečně silná, komplex je dostatečně stabilní, ke vzniku inkluzního komplexu může dojít také. [44, 45, 55, 56]

V polárně organickém módu dochází ke sterickým repulzím, vodíkovým můstkům a dipólovým interakcím. U normálního módu je chirální diskriminace dosažena skrze  $\pi - \pi$  komplexaci, sterickým efektům, dipólovým interakcím a vodíkovým můstkům. Ke tvorbě inkluzních komplexů u normálního a polárně organického módu nedochází,



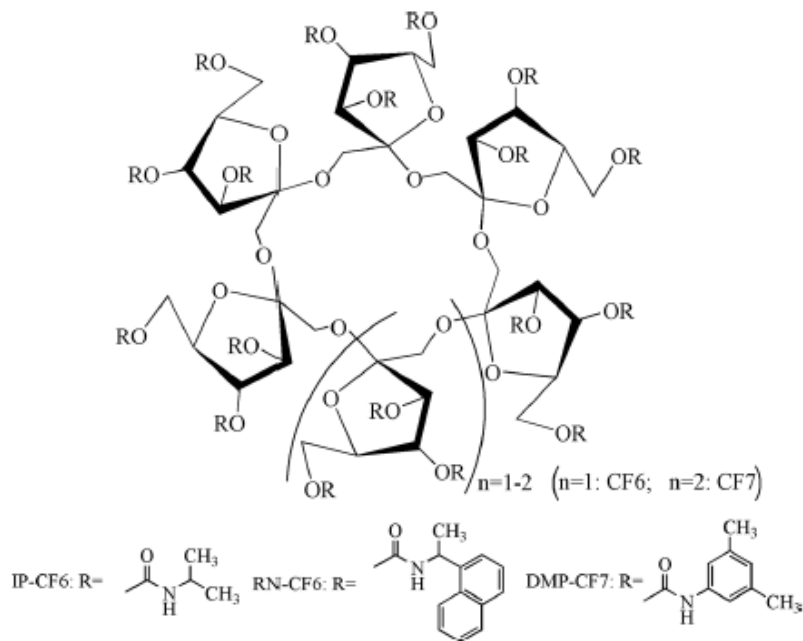
**Obrázek 11:** Mechanismy molekulární rekognice pro cyklodextriny v polárně-organickém nebo normálním módu (a) a reverzním módu (b). Převzato a upraveno z [5]

protože kavita je zabraná molekulami mobilní fáze a jejich nahrazení analytem by bylo termodynamicky nevýhodné. [44, 45, 55, 56]

Nové studie o cyklodextrinových CSP zahrnují zejména nové deriváty a různé metody imobilizace na silikagel, zvláště click chemií, jejíž výhody jsou zejména mírné reakční podmínky a zvýšená tolerance chromatografických podmínek CSP vázanými touto metodou. Využívá se také hybridních nosičů, jako hydridu silikagelu, kde je místo Si–OH vazeb využito vazby Si–H. Ten je odolnější vůči vodě a má sníženou polaritu. [60] Jako nosič byl také použit oxid grafenu. [61] U monolitických kolon se výzkum zaměřuje na vylepšování metod přípravy. Enantiosektivita je sice široká, ale velmi málo studií se zaměřilo na reálné aplikace. [53]

### 3.3.8 Cyklofruktanové CSP

Cyklofruktany jsou cyklické oligosacharidy složené z D-fruktofuranózových jednotek spojené 2,1- $\beta$ -glykosidickou vazbou. Poprvé byly objeveny v roce 1989, a první využití jako chirálních selektorů bylo popsáno v roce 2009. Těchto jednotek je nejčastěji šest, využívá se ale i kruhů ze sedmi či osmi jednotek, značené jako CF6, CF7 a CF8. Každá jednotka má 4 stereogenní centra a 3 volné hydroxylové skupiny. Ačkoli stejně jako cyklodextriny jsou cyklickými oligosacharidy, jejich vnitřní kruh je hydrofilnější a strukturou se podobá spíše crown-etherům. Molekuly cyklofruktanu mají hydroxylové skupiny orientované na jednu stranu plochy, která je tedy hydrofilnější a elektronegativnější. Nativní cyklofruktany mají omezené schopnosti chirální separace, které se zlepšují a mění s derivatizací. [45, 60, 62]



**Obrázek 12:** Struktury cyklofruktanových CSP spolu se substituenty. [62]

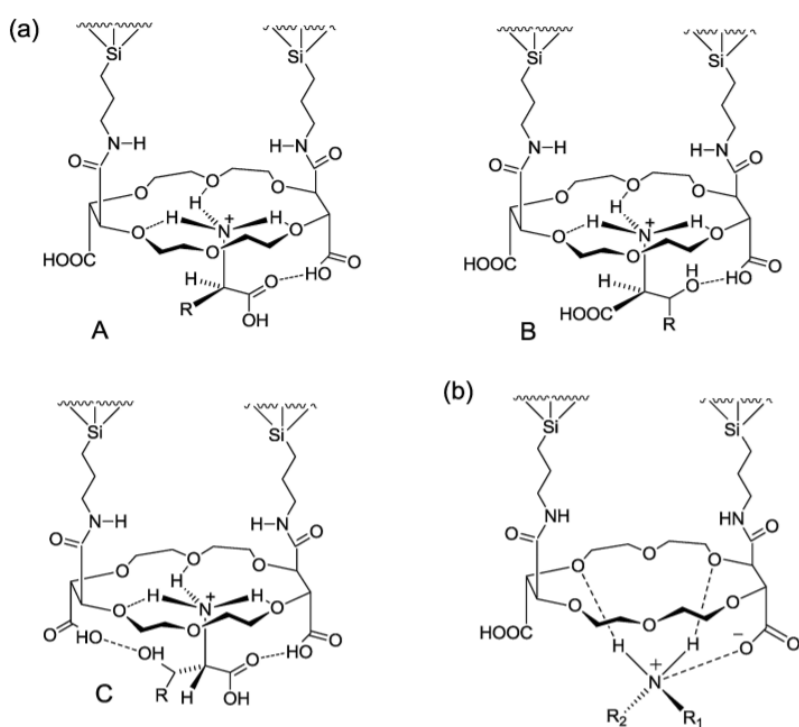
Substituce methylem či isopropylem dává cyklofruktanům výborné vlastnosti při separaci primárních aminů. Substituce jednotek cyklofruktanu objemnějšími planárními molekulami, jako například 3,5-dimetylfenylkarbamátem či (*R*)-1-(1-naftyl)ethylkarbamátem tyto CSP sice ztrácí schopnosti separace primárních aminů, ale rozšiřuje možnosti využití i například pro sekundární a terciární aminy, alkoholy, kyseliny a jiné. [45, 62] Mechanismy chirální diskriminace, které se u cyklofruktanů uplatňují, závisí na typu substituce, patří mezi ně zejména dipólové interakce, vodíkové můstky a  $\pi - \pi$  interakce. Velikost a typ substituentu jsou tedy schopné výrazně ovlivnit enantioselektivní schopnosti těchto CSP. [45, 60, 62]

Nativní cyklofruktany našly své uplatnění v HILIC a normálním módu, ale po derivatizaci se dají s úspěchem použít i pro reverzní a polárně organický mód. Dá se předpokládat, že výzkum v oblasti cyklofruktanů bude nadále pokračovat díky jejich dobrým mechanickým vlastnostem. [4, 45, 51, 62]

### 3.3.9 CSP na bázi crown-etherů

Crown-ethery jsou syntetické makrocyclické polyethery, tvořeny ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ) jednotkami. Počet těchto jednotek určuje velikost dutiny. Etherické atomy kyslíku slouží jako elektrondonorové ligandy. Samy o sobě ale crown-ethery chirální nejsou, tuto vlastnost jim poskytují zavedené chirální skupiny, jako například kyselina vinná, nebo 1,1'-binaftyl, které se komerčně používají. Crown-ethery mohou být na silikagel

vázány buďto kovalentně, nebo na něj mohou být potaženy. V případě potažení jsou tyto stacionární fáze nekompatibilní s větším množstvím metanolu v mobilní fázi. Crown-ethery jsou známé svou schopností separovat enantiomery látek obsahující primární aminoskupinu, kdy v kyselém prostředí mobilní fáze (pH 1-3,5) dochází ke tvorbě vodíkových můstků mezi protonizovaným primárním aminem s volnými elektronovými páry etherových kyslíků a tvorbě diastereoizomerního komplexu. Jak je vidět na obrázku 13, chirální diskriminace je zajištěna sterickými vlivy substituentů. Byly ale popsány separace i sekundárních aminů či amidů. Kyselé prostředí je také důležité pro potlačení silanolových interakcí, ovšem z vlastností silikagelu vyplývá, že může docházet k hydrolyze vazeb navázaného ligandu.[5, 44, 45, 63]

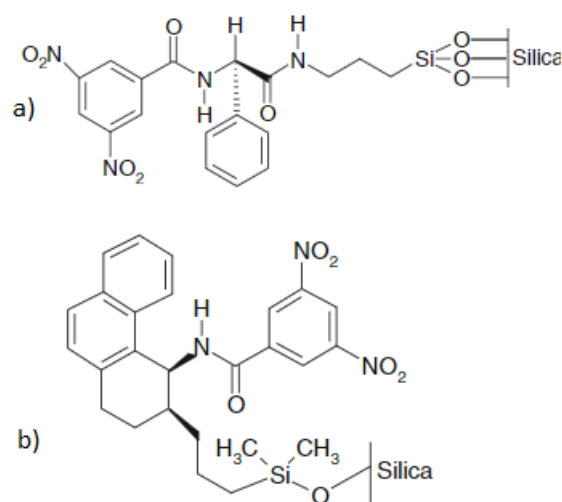


**Obrázek 13:** (a) Předpokládaná chirální diskriminace znázorňující (A) stabilnější komplex utvořený mezi  $\alpha$ -aminokyselinou a CSP, (B,C) stabilnější komplexy utvořené mezi serinem ( $R=H$ ) nebo threoninem ( $R=CH_3$ ) a CSP. (b) Předpokládaná chirální diskriminace znázorňující iontovou interakci mezi kationickým místem protonovaného sekundárního aminu a anionickou karboxylovou skupinou CSP. [63]

### 3.3.10 Donor-akceptorové (Pirklovy) CSP

Na konci 70. let byla Pirklem představena CSP s čistě synteticky vyrobeným selektorem na bázi (3,5-dinitrobenzoyl)-fenyglycinu. Tyto CSP, známé také jako brush-type či Pirklovy fáze, takto pojmenované právě díky jeho příspěvku, využívají

nízkomolekulárních syntetických chirálních selektorů. Ty umožňují tvorbu neiontových sil, jako například vodíkových můstků,  $\pi - \pi$  interakcí či dipólových sil. Tvorba komplexů a enantiosektivita je podpořena sterickými interakcemi. Vývoj pokračoval kupředu díky využívání reciprocity chirální diskriminace, totiž že role analytu a selektoru jsou zaměnitelné. Pokud je tedy analyt rozdělen na určitém chirálním selektoru, po imobilizaci analytu tento bude schopen rozdělit racemát chirálního selektoru. [5, 44, 45, 64] Novější Pirklovy CSP využívají  $\pi$  elektrondeficientní a  $\pi$  elektronově bohaté aromatické molekuly, často navzájem kolmo orientované a tvořící tak štěrbinu, ve které se mohou interakce uplatnit. Také je snahou upravit vazbu na silikagel a eliminovat substituenty, nepřispívající k chirální diskriminaci. [64] Tyto fáze jsou využívány v normálním módu, protože polární rozpouštědla významně oslabují výše zmíněné interakce. Novější fáze je ale možné použít i v reverzním a polárně organickém módu. [60] Výhodou je možnost nástřiku vyššího množství vzorku a použití kolony s opačným geometrickým uspořádáním chirálního selektoru, což vede k opačnému elučnímu pořadí analytů. [5, 44, 64]



**Obrázek 14:** Struktury Pirklových fází, (a) Jedna z prvních zkomercializovaných fází, DNBPG Chirex, kde je využito selektoru 3-[N-(3,5-dinitrobenzoyl) fenylglycin-amido]propyl, stále na trhu dostupná, (b) Dnes asi nejdříveji používaná fáze, Whelk-O1, selektorem je 1-(3,5-dinitrobenzamido)-1,2,3,4-tetrahydrofenantren-2-yl. Převzato a upraveno z [64]

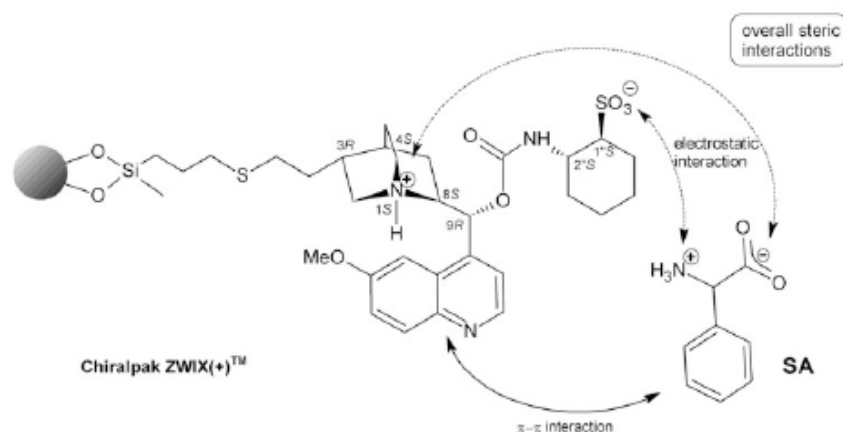
### 3.3.11 Ligand-výměnné a iontově výměnné CSP

Enantioseparace u ligand-výměnných CSP jsou založené na reverzibilní komplexaci ligandu a centrálního iontu, kterým je typicky atom kovu, nejčastěji  $\text{Cu}^{2+}$ , ale i  $\text{Zn}^{2+}$  či  $\text{Ni}^{2+}$ . [44] Atom kovu je imobilizován komplexací s chelatujícím chirálním selektorem, kterým je nejčastěji cyklická aminokyselina, jako prolin, hydroxyprolin či fenylalaninamid. Tyto selektory mohou být buďto dynamicky vázané na reverzní fázi či kovalentně vázané na nosič, kterým je silikagel nebo polymer. Spojení se silikagelem je zajištěno využitím tzv. spaceru, což je alkylový řetězec, oddalující samotný chirální selektor od silikagelu. Délka a derivatizace spaceru ovlivňuje retenční vlastnosti těchto CSP. [39] Dynamicky vázané fáze jsou nestabilní s mobilní fází obsahující větší množství organického podílu, může totiž docházet ke „krvácení“ stacionární fáze. Podstatou chirální diskriminace je vznik ternárního komplexu, skládajícího se z chirálního selektoru, atomu kovu a enantiomeru. Komplexy jsou charakterizovány konstantami stability, závislé na sterických faktorech a vlastnostech funkčních skupin, a na základě rozdílů mezi těmito konstantami dochází k separaci enantiomerů. Popsány byly separace amino a hydroxy kyselin, diolů, diaminu, aminoalkoholů a krátkých oligopeptidů. [4, 39, 44]

Použití iontově výměnných CSP bylo poprvé popsáno v roce 1985 za použití chininových alkaloidů. Typ těchto fází může být rozdělen do tří podskupin: anionické, kationické, či zwitterionické. Anion-výměnné selektory jsou vhodné k enantioseparaci látek kyselé povahy. Používají se již zmiňované chininové alkaloidy, chinin a chinidin, každý s pěti chirálními centry. Na nosič jsou nejčastěji vázané karbamátovou nebo sulfidickou vazbou. Je důležité zmínit, že chinin a chinidin se liší v konfiguracích pouze ve dvou centrech a z toho vyplývající tzv. pseudoenantiomerní chování. To se projevuje obráceným elučním pořadím jednotlivých enantiomerů při výměně chinidinové CSP za chininovou CSP. [44, 60] Kationické selektory separují bazické enantiomery. Jejich struktura je založena na amino-sulfonových nebo amino-karboxylových kyselinách. Zwitterionické selektory byly vynalezeny zkombinováním klíčových skupin v jediném selektoru. Mohou být použity k separaci jak kyselých, tak zásaditých látek, což je jejich hlavní výhoda nad anion- nebo kation-výměnnými selektory. [44, 45, 60, 65]

Mechanismy chirální diskriminace na chinolinových alkaloidech a jejich derivátech byly důkladně prozkoumány, schéma je zobrazeno na obrázku 15. Ukazuje se, že se významně zapojují iontové interakce spolu s vodíkovými můstky a van der Waalsovými

silami, důležitý je také příspěvek  $\pi - \pi$  interakcí chinolinového jádra nebo jiné zavedené aromatické skupiny. Enantiosektivita je také ovlivněna pH, koncentrací a poměrem kyseliny nebo baze (nebo obojího u zwitterionických fází) přidané do MF. Nejčastější použití je v polárně organickém a reverzním módu. [4, 44, 60] V RP módu je pozorováno nižší rozlišení kvůli většímu množství vody. Paradoxně v některých případech malé množství vody (1-2%) může mít pozitivní vliv na tvar píků a vést ke kratším analýzám. [4]. Vývoj jde kupředu zejména u zwitterionických selektorů a směřuje k využití core-shell částic, sub-2  $\mu\text{m}$  částic, které dále zvýší aplikační spektrum těchto CSP. Dále byly zkoumány například brucin, strychnin a kodein jako imobilizované selektory, či monolitické kolony s vázanými deriváty chininových alkaloidů. [4, 39, 53, 60, 65]



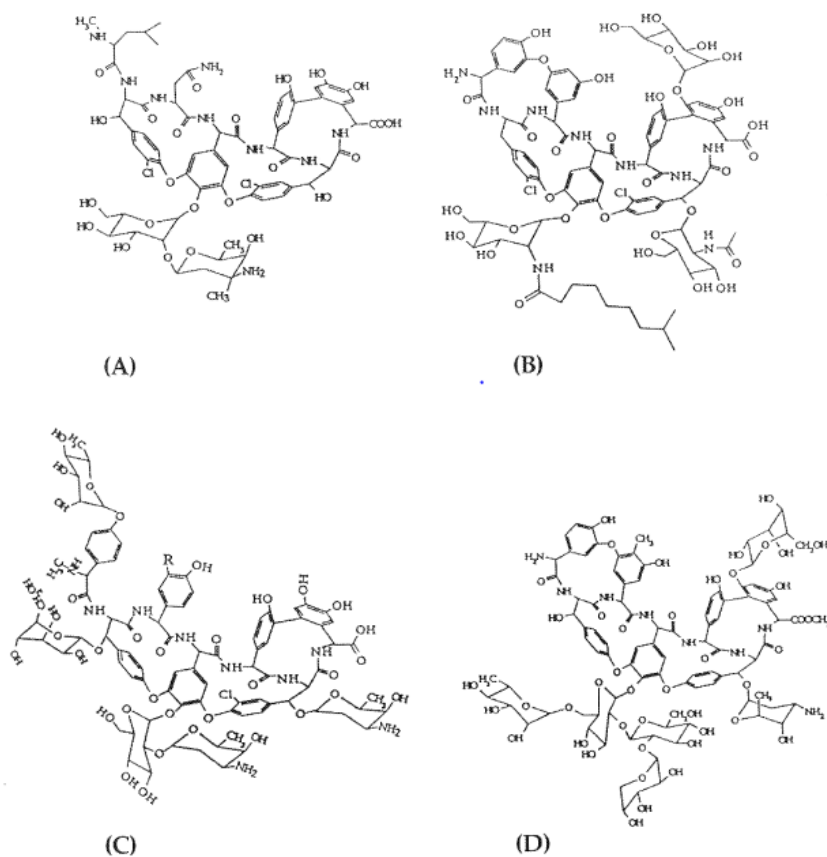
**Obrázek 15:** Schéma možných interakcí zwitterionických CSP na bázi chinolinových alkaloidů s amfolytickými analyty. [4]

### 3.3.12 Makrocyclická antibiotika

Použití makrocyclických antibiotik jako CSP bylo poprvé popsáno Armstrongem v roce 1994, kdy byly zkoumány další přírodní makrocykly po úspěchu chirálních separací na cyklodextrinových CSP. Makrocyclická antibiotika jsou dělena do 4 skupin a to glykopeptidy, ansamyciny, aminoglykosidy a polypeptidy. Zejména glykopeptidová antibiotika mají dobré mechanické vlastnosti, jsou relativně levná a efektivní jako CS, čímž předčí proteinové CSP. [5] Glykopeptidová antibiotika vankomycin, ristocetin A, teikoplanin a avoparcin jsou nejčastěji používané CSP z této skupiny a jejich struktury jsou vyobrazeny na orbázku č. 16. Glykopeptidy sdílejí heptapeptidickou strukturu s aromatickými zbytky, které tvoří miskovitý tvar. 5 aminokyselin ve



struktury je společných. Součástí molekul je také cukerný zbytek, který je relativně flexibilní a může se při chirální diskriminaci uplatnit jak pozitivně, tak negativně. [4, 44, 66] Díky těmto strukturním vlastnostem se v molekulách glykopeptidů vyskytuje velké množství chirálních center a CSP na této bázi jsou schopny rozlišit velké množství rozličných analytů. Uplatňují se všechny mechanismy chirální diskriminace popsané v kapitole 3.3.3, nicméně přesný příspěvek jednotlivých interakcí je právě kvůli složitosti molekul stále neznámý. [5, 44, 60, 66] Tento druh CSP je možné použít ve všech módech, nejčastěji jsou však používána v polárně organickém a reverzním módu. Glykopeptidová antibiotika se vyznačují komplementaritou. Jelikož jsou si tyto selektory strukturně velmi podobné, je možné je zařadit za sebe či zaměnit a za stejného složení mobilní fáze separovat enantiomery například na teikoplaninu, které by se na vankomycinu oddělily částečně nebo vůbec. [5, 39, 44, 66]



**Obrázek 16:** Chemické struktury makrocyclických glykopeptidových antibiotik. (A) vankomycin, (B) teikoplanin, (C) avoparcin, (D) ristocetin A [66]

Ostatní skupiny antibiotik našly využití jako chirální selektory zejména v kapilární elektroforéze. Antibiotika ze skupiny ansamycinů obsahují ve své struktuře aromatické jádro, například naftochinon, přemostěný substituovaným alifatickým

kruhem. Příkladem jsou rifamycin B a SV. První zmíněný je enantioselektivní ke kationickým látkám, zatímco SV lze použít k separaci neutrálních a anionických látek. Ansamyciny mají nižší selektivitu než glykopeptidy. Aminoglykosidy postrádají aromatickou skupinu ve struktuře, využívají se zejména kanamycin a streptomycin. Jediné používané polypeptidické antibiotikum, thiostrepton, má strukturu složitější, s menším počtem aromatických kruhů. [60, 66] V dnešní době se zkoumají monolitické kolony s těmito selektory, hybridní monolity a jak je již trendem, kolony se sub-2  $\mu\text{m}$  částicemi silikagelu, ať už plně či povrchově porézními. [60, 65]

### 3.3.13 Proteinové CSP

Proteinům vlastní schopnost chirální rekognice byla poprvé využita v roce 1973. Vyznačují se komplexní strukturou s velkým povrchem, množstvím stereogenních center a různých vazebných míst, které umožňují množství mezimolekulových interakcí s malými molekulami. Přesný mechanismus chirální diskriminace nebyl dlouho znám, ale s vývojem metod strukturální molekulární biologie byly pospásány módy vazby pro některé komplexy ligand-selektor, například u lidského sérového albuminu. Ten byl zkoumán, protože je důležitým transportním proteinem xenobiotik v krvi. Bylo vyvinuté množství proteinových CSP, z nichž se nejširším spektrem separací vyznačují  $\alpha_1$ -kyselý glykoprotein a surový ovomukoid, které separují jak bazické, tak kyselé analyty. Lidský sérový albumin je určený k separaci kyselých enantiomerů, ale komercializovaná je i kolona s cellobiohydrolázou I k separaci bazických enantiomerů. [5, 44]

Tyto CSP se používají v reverzním módu, dlouhou dobu bylo výhodou možnost kombinace těchto CSP s MS detekcí. Je ovšem nutno mít na paměti, že vysoký podíl organické složky mobilní fáze může změnit konformaci vázaného proteinu a tím ovlivnit separační schopnosti, či dokonce protein denaturovat a kolonu tak nenávratně zničit. Může také dojít k denaturaci teplotou, pH či přídatkem iontů. K nevýhodám patří také možnost nástřiku pouze malého množství vzorku vzhledem k nízké kapacitě těchto CSP, což omezuje jejich využití v preparativním měřítku. Kolony s těmito CSP jsou také drahé. Z těchto důvodů se role proteinových CSP snižuje, což je vidět i na počtu publikovaných studií, které se zaměřují spíše na optimalizaci podmínek než samotný vývoj. K překonání nízké separační účinnosti se proteinovými selektory funkcionalizuje povrch silikagelových či polymerních monolitických kolon. Proteinové

CSP se stále využívají ve vývoji nových léčiv a ke studiím vazebných afinit, pro kontrolu kvality se ale používají CSP s výhodnějšími vlastnostmi, jako makrocyklická antibiotika či polysacharidy. [5, 44, 59, 60]

### 3.3.14 Ostatní CSP

CSP s takzvanými *Metal-organic frameworks* (MOF) patří mezi mikroporézní krystalické materiály. Jsou tvořeny kationty kovů s organickou molekulou, nazývanou linker. Obvykle jimi bývají di-, tri-, nebo tetradentátní ligandy, tedy mají dva, respektive tři nebo čtyři donorové atomy pro vznik koordinačního komplexu. [67] Jejich vysoce porózní strukturu je možné modifikovat použitím rozdílného linkeru. Ten navíc přináší možnost post-syntetické modifikace. Syntetizované částice jsou mechanicky odolné, ale nevýhodou je, že mohou být polydisperzní a nepravidelného tvaru, tudíž syntéza musí být optimalizována přidáním různých aditiv. [68] První achirální separace na MOFs v HPLC byla popsána v roce 2007. [69] Enantioselektivitu lze do molekuly zavést buďto přímou syntézou s chirálně čistými linkery, postsyntetickou modifikací, spontánně z achirálních materiálů v chirálním prostředí či pomocí chirální indukce. Spontánní organizace je nepředvídatelná výsledkem, ale achirální ligandy jsou lehce dostupné. Postsyntetická modifikace vyžaduje přítomnost volných derivovatelných skupin na linkeru. V budoucnosti je možností racionální přístup k výběru funkčních skupin v závislosti na vybraném chirálním selektoru a velikosti póru. Chirální indukce je další použitelná metoda. Při použití tohoto postupu se k achirálním prekurzorům přidává takzvaný chirální induktor, například cinchonidin. Přídavek induktoru katalyzuje růst enantiomericky čistých krystalů MOF. Výběr vhodného templátu pro zavedení chiralit je ale komplikovaný a vyžaduje další výzkum. [69–71]

Syntetické polymery, užívané jako CSP, jako například polyakrylamidy, polymetakryláty a další, jsou získány polymerizací chirálních monomerů. Vznikají polymery s definovanou helikální konformací. Nicméně tyto polymery lze připravit i za použití chirálního katalyzátoru. Příkladem je achirální trifenylmetakrylát, kdy za přítomnosti sparteinu anionickou polymerizací vznikne helikálně chirální polymer. Dalším postupem je *helicity induction and memory* přístup, ve kterém polymer v komplexu spolu s chirální látkou získá helikální konformaci, která zůstává i po odstranění chirální molekuly. Syntetické polymerní CSP se často připravují *grafting-to* přístupem, kdy

se polymer tvoří v roztoku a zároveň kotví na silikagel, modifikovaný vinylovými skupinami k kopolymerizaci. Tento postup ale může vést k nehomogenní distribuci polymeru na povrchu silikagelu. Byl tedy navrhnutý alternativní postup, *grafting-from*, při kterém se iniciátor radikálové polymerace naváže na silikagel. Po přidání monomeru a zahřátí roztoku polymer začne růst pravidelněji než ve výše zmíněném postupu. V chirální diskriminaci se uplatňují zejména vodíkové můstky,  $\pi - \pi$  interakce a sterické faktory. [5, 45]

Molekulárně vtištěné polymery (MIP) jsou chirální selektory, specifické pro určitý analyt. Získají se polymerizací monomerů s crosslinkery za přítomnosti chirálně čisté látky, která je použita jako templát. Ten se po polymerizaci odstraní a zbyde tak kavita s tvarem analytu. Kolona s tímto typem CSP je tedy specifická pro čistý enantiomer a blízké příbuzné chirální látky, například  $\beta$ -blokátory nebo  $\beta$ -agonisty. Kavity ale nejsou identické kvůli amorfní struktuře polymeru, a tak se analyt zdržuje v každém vazebném místě jinak dlouho. To vede k širokým chvostujícím píkům a nízkému rozlišení. Další problém MIP je zejména bobtnání polymeru s některými rozpouštědly, což může ovlivnit velikost kavity a snížit retenci analytu. Nejnovější výzkumy se zaměřují zvláště na využití těchto selektorů na monolitických kolonách, nanočásticích a polymerech. [5, 39, 45, 60, 72]

## 4 Cíl práce

Cílem této práce bylo zkoumání vlivu chromatografických podmínek na chirální a achirální interakce vybraných bazických, kyselých a neionizovatelných analytů. Pozornost byla věnována interakci s kovovými nečistotami na silikagelu.

Pro tento účel byla vybrána chirální stacionární fáze na bázi nativního  $\beta$ -cyklodextrinu. Dosažené výsledky, které byly získány za stejných chromatografických podmínek, budou porovnány s výsledky získanými na koloně s bromovaným cyklo-dextrinem jako chirálním selektorem [73].

## 5 Experimentální část

### 5.1 Přístroje, kolona, pomůcky a chemikálie

#### Přístroje:

kapalinový chromatograf LC 20 A Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko):

- odplyňovač, typ DGU 20 A3
- dvě vysokotlaká čerpadla, typ LC 20 AD
- autosampler, typ SIL-20 AC
- řídicí jednotka, typ CBM-20 AC
- detektor, typ SPD-M20A
- kolonový prostor, typ CTO-20AC
- software LC Solution Version 1.22 SP1

acidimetr (Acidimetr 333, Druopta, Praha, Česká republika)

analytické váhy (Kern, Unipro-Alpha, Praha, Česká republika)

ultrazvuková lázeň (Ecoson, Praha, Česká republika)

spektrofotometr (UV-2401, Shimadzu, Japonsko]

#### Chromatografická kolona:

LiChroCART 250-4 ChiraDex, velikost částic 5  $\mu\text{m}$  (Merck, Praha, ČR)

#### Pomůcky:

laboratorní sklo – kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, pipety, mikropipety,

Pasteur pipety, špičky, vialky

#### Chemikálie:

edetan disodný (EDTA), hydroxid sodný (NaOH) – Penta (Chrudim, Česká republika)

acetonitril (ACN). hexobarbital, ibuprofen, ketoprofen, kyselina octová (AcA), metadon, methanol (MeOH), oxazepam, propranolol, triethylamin (TEA) – Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

čištěná voda – Merck Millipore (Merck-Darmstadt, Německo)

## 5.2 Příprava vzorků a mobilních fází

### Příprava vzorků

Vzorky byly připraveny rozpuštěním 0,5mg vzorku v 0,5 ml MeOH a poté zředěny 0,5 ml vodou. K usnadnění rozpuštění bylo využito ultrazvukové lázně a vzorky byly uchovávány v lednici. Přehled vzorků s jejich strukturním vzorcem, systematickým názvem, UV spektrem a  $pK_A$  je uveden v tabulkách č. 1 a 2.

### Příprava mobilní fáze

Byly připraveny čtyři typy MF:

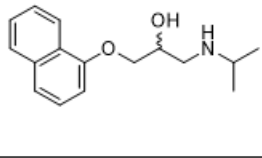
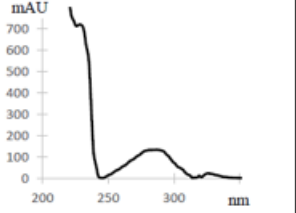
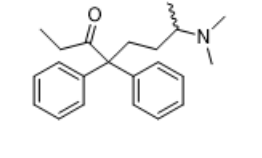
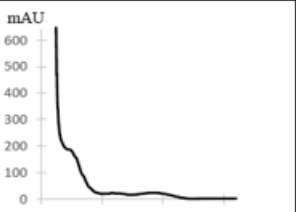
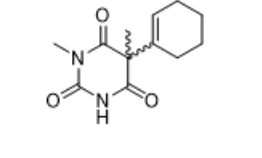
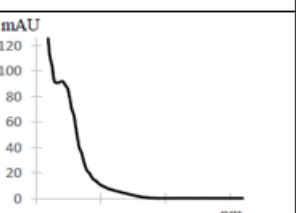
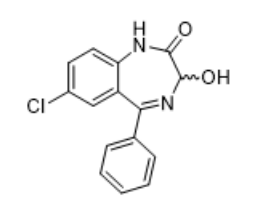
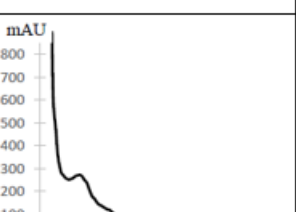
1. organické rozpouštědlo (MeOH nebo ACN) + 0,1M AcA upravená TEA na pH 5,6
2. organické rozpouštědlo + H<sub>2</sub>O
3. organické rozpouštědlo + EDTA
4. organické rozpouštědlo + 0,1M AcA upravena NaOH na pH 3,2

1. MF s obsahem 0,1M AcA s pH 5,6 byla připravena rozpuštěním 1,50g AcA. Hodnota pH byla poté upravena přidáním TEA. MF byla poté vakuově přefiltrována a odplyněna v ultrazvukové lázni. Vodná část MF byla mísená s organickým rozpouštědlem přístrojem podle zadaného poměru.

2. MF, složená z vody a organického rozpouštědla, byla mísená přístrojem v poměru podle zadaného poměru.

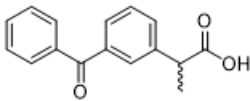
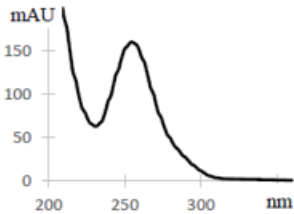
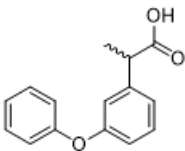
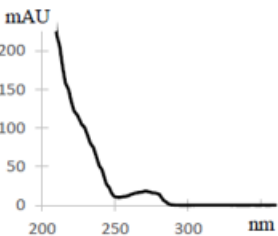
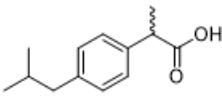
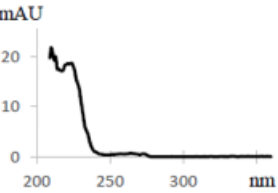
3. Pro třetí MF byl nejprve připraven zásobní roztok EDTA o koncentraci 200 mM, který byl přefiltrován. Poté bylo podle požadované koncentrace odpipetováno příslušné množství zásobního roztoku EDTA, odpipetováno množství H<sub>2</sub>O a dle požadovaného poměru doplněno organickým rozpouštědlem. MF byla před použitím odplyněna pomocí ultrazvukové lázně.

4. MF s obsahem 0,1 AcA s pH 3,2 byla připravena rozpuštěním 1,50g AcA. Hodnota pH byla následně upravena přidáním 1M NaOH. Vodná část MF byla poté vakuově přefiltrována a odplyněna pomocí ultrazvukové lázně. Vodná část byla poté mísená s organickým rozpouštědlem přístrojem podle zadaného poměru.

Název	Strukturní vzorec	UV – spektrum	pK <sub>A</sub>
	Systematický název		
Propranolol			9,12
	1-(isopropylamino)-3-(naftalen-1-yloxy)propan-2-ol		
Metadon			9,96
	6-(dimethylamino)-4,4'-difenylheptan-3-on		
Hexobarbital			8,21
	5-cyklohex-1-enyl-1,5-dimethyl-pyrimidin-2,4,6-trion		
Oxazepam			11,65
	7-chloro-3-hydroxy-5-fenyl-1,3-dihydro-2H-benzo[e][1,4]diazepin-2-on		

**Tabulka 1:** Strukturní vzorce a systematické názvy bazických a neionizovaných analytů, jejich spektra a pK<sub>A</sub>. Hodnota pK<sub>A</sub> vypočtena programem ChemDraw 19.1. [74]



Název	Strukturní vzorec	UV – spektrum	pK <sub>A</sub>
	Systematický název		
Ketoprofen			4,14
	2-(3-benzoylphenyl)propanová kyselina		
Fenoprofen			4,25
	2-(3-fenoxyfenyl)propanová kyselina		
Ibuprofen			4,38
	2-(4-isobutylfenyl)propanová kyselina		

**Tabulka 2:** Strukturní vzorce a systematické názvy kyselých analytů, jejich spektra a pK<sub>A</sub>. Hodnota pK<sub>A</sub> vypočtena programem ChemDraw 19.1. [74]

### 5.3 Chromatografické podmínky

Použité chromatografické podmínky jsou uvedeny v tabulce č.3.

Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
Nastříknutý objem vzorků	1 μl
Teplota termostatu	25°C
Typ eluce	isokratická
Detekce	220 nm, 254 nm
Separáčn1 mód	reverzn1

**Tabulka 3:** Popis nastavených chromatografických podmínek.

Sedm vybraných analytů bylo rozděleno do tří skupin (viz tabulka 1 a 2 v kapitole section 5.2) podle svých acidobazických vlastností. V každé skupině byl vybrán hlavní

analyt (baze: propranolol, kyseliny: ketoprofen, neionizované látky: hexobarbital).

Další látky sloužily pro porovnání a potvrzení výsledků.

Procentuální ionizace analytů byla vypočítána podle rovnice č. 1.

$$pK_A = pH + \log \frac{C_{prot}}{C_{deprot}} \quad (1)$$

**Rovnice 1:** Henderson-Hasselbachova rovnice

Rozlišení bylo počítáno dle rovnice č. 2.

$$R = 2 \times \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_1 + w_2} \quad (2)$$

**Rovnice 2:** Výpočet rozlišení dle USP; ;  $t_{r1}$  - retenční čas druhého píku;  $t_{r2}$  - retenční čas prvního píku;  $w_1$  - šířka prvního píku na základní linii,  $w_2$  - šířka druhého píku na základní linii

Retenční faktor byl počítán dle rovnice č. 3.

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (3)$$

**Rovnice 3:** Vzorec pro výpočet retenčního faktoru.  $k$  - retenční faktor;  $t_r$  - retenční čas;  $t_m$  - mrtvý čas

## 6 Výsledky a diskuze

Cílem mé práce bylo ověření vlivu achirálních interakcí na chirální separaci u dvou kolon s rozdílnými vlastnostmi. Zaměřili jsme se na achirální interakce elektrostatického charakteru mezi povrchem silikagelu a nabitým analytem. Tyto interakce jsou silnější než hydrofobní interakce s kavitou cyklodextrinu a mohou být ovlivněny změnou iontového stavu molekuly analytu nebo maskováním povrchu silikagelu, například chelatací kovů edetanem disodným (EDTA). V experimentu byly použity čtyři typy mobilních fází. Mobilní fáze byly vybrány podle předchozí práce, [73] a složení bylo následující:

1. organické rozpouštědlo (MeOH nebo ACN) + 0,1M AcA upravená TEA na pH 5,6 (**MF 1**)
2. organické rozpouštědlo + H<sub>2</sub>O (**MF 2**)
3. organické rozpouštědlo + EDTA (**MF 3**)
4. organické rozpouštědlo + 0,1M AcA upravena NaOH na pH 3,2 (**MF 4**)

MF 1, obsahující triethylaminoacetát, může tvořit iontový pár s kyselinou a zásadou. Předpokládáme, že vytvořením iontového páru dochází k potlačení achirálních interakcí a analyty interagují převážně s chirálním selektorem. Pro potvrzení tohoto předpokladu jsme použili MF 2, která neobsahuje iontově-párové činidlo. Předpokládala se repulzní interakce mezi kladnými náboji kovových nečistot na povrchu silikagelu a bazickými analyty. Naopak u kyselin se předpokládá vysoká retence v důsledku elektrostatické interakce s povrchem silikagelu. Do MF 3 byla přidána EDTA, která je známá tvorbou komplexů s kovovými kationty. Chelatace kovových nečistot na povrchu silikagelu zamezí achirálním interakcím a jak kyselé, tak bazické analyty by měly interagovat převážně s chirálním selektorem. V MF 4 je kyselina octová při pH 3,2 z větší části nedisociovaná, netvoří tedy iontový pár s bazickými analyty. Avšak bazické látky jsou při tomto pH zcela disociované a předpokládá se repulzní interakce, stejně jako u MF 2. Kyseliny by měly být neionizované a při tomto pH by měly interagovat s chirálním selektorem a jednotlivé enantiomery by se měly separovat.

Pro potvrzení naší teze byly použity látky, které jsou za daných experimentálních podmínek v neionizovaném stavu, hexobarbital a oxazepam. Tyto látky by si ve výše zmíněných podmínkách měly zachovat neutrální náboj. Očekáváme tedy, že ve všech čtyřech mobilních fázích bude docházet k interakci s chirálním selektorem.

## 6.1 Bazické analyty

Zkoušenými látkami z této skupiny byly propranolol jako hlavní a metadon jako referenční látka. MF 1, připravená dle kapitoly 5.2, obsahovala ACN nebo MeOH v definovaném poměru vzhledem k vodné části (viz tabulka č. 4), která obsahovala kyselinu octovou upravenou TEA na pH 5,6. TEA s kyselinou octovou spolu tvoří triethylaminoacetát, který funguje jako iontově-párové činidlo. Acetát vytváří iontový pár s ionizovanou bází. Iontový pár je elektroneutrální a látky tak mohou interagovat s chirálním selektorem. Chirální separace byla pozorována u obou látek pouze u nižších koncentrací MeOH, v ACN byl separován pouze metadon a to pouze s rozlišením 0,39. Se zvyšující se koncentrací organického rozpouštědla v MF klesala jak retence, tak rozlišení. Při použití acetonitrilu jako mobilní fáze byla retence nižší než v MeOH. Naměřené výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 4.

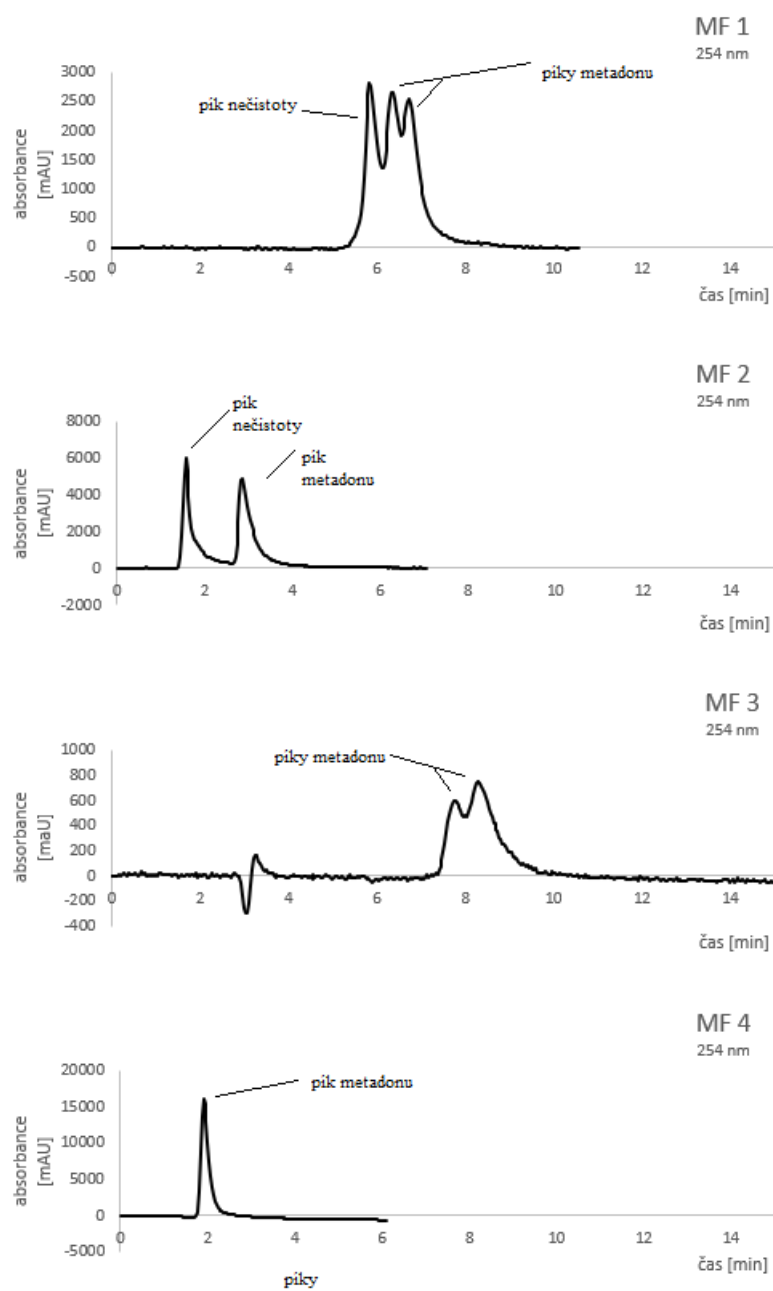
V MF 2 anorganickou složku tvořila voda. Zde nedocházelo ke tvorbě iontového páru a analyty byly kladně nabitě. Separace nebyla pozorována ani u jednoho analytu a látky byly eluovány před mrtvým časem za použití jak acetonitrilu, tak methanolu. Tato repulzní interakce mezi kladně nabitým analytem a kladným nábojem na povrchu silikagelu je silnější než tvorba inkluzního komplexu, a proto analyt neinteraguje se stacionární fází, na rozdíl od neutrálně nabitého iontového páru v MF 1, viz obr. 17. Je tak potvrzen předpoklad, že změnou chromatografických podmínek dochází k ovlivnění achirálních a chirálních interakcí. Druhý eluovaný pík (obr. 17) patří nečistotě, což bylo zkontrolováno pomocí UV-spektra. Dosažené výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 4.

MF 3 byla s přídavkem 1,25 mM EDTA, která je schopna chelatovat kovy. Vliv repulzních interakcí by se tak měl snížit. Bylo možné pozorovat separaci u metadonu při nižších koncentracích MeOH a v acetonitrilu se oba enantiomery separovaly pouze při použití 5% koncentrace ACN v mobilní fázi (viz tabulka 5). Propranolol se na rozdíl od MF 1, kde byl přídavek TEA, v metanolu neseparoval vůbec. Se zvyšující se koncentrací MeOH a ACN docházelo ke snížení retence obou látek. V případech, kde se jednotlivé enantiomery separovaly, se také snižovalo rozlišení píků. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Je tedy možné pozorovat pozitivní vliv EDTA na maskování kovových nečistot. Na základě naměřených dat byl ke zkoumání vlivu EDTA na achirální interakce použit 5% acetonitril se zvyšující se koncentrací EDTA (1,25 mM, 5 mM, 10 mM, 20

**Tabulka 4:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci bazických látek za použití MF 1 a MF 2.

Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení
<b>MF 1 : ACN-AcA (0,1M, pH 5,6), (10:90, v/v)</b>					<b>MeOH-AcA (0,1M, pH 5,6), (10:90, v/v)</b>				
propranolol	ne	1,60	-	-	propranolol	ano	3,24	3,42	0,24
metadon	ano	0,94	1,04	0,36	metadon	ano	1,80	2,41	0,74
20% ACN					20% MeOH				
propranolol	ne	0,55	-	-	propranolol	ano	2,04	2,16	0,19
metadon	ne	0,18	-	-	metadon	ano	0,99	1,11	0,39
35% ACN					35% MeOH				
propranolol	ne	0,03	-	-	propranolol	-	-	-	-
metadon	ne	-0,08	-	-	metadon	-	-	-	-
<b>MF 2 : ACN-H<sub>2</sub>O, (10:90 v/v)</b>					<b>MeOH-H<sub>2</sub>O, (10:90 v/v)</b>				
propranolol	-	-	-	-	propranolol	ne	-0,54	-	-
metadon	-	-	-	-	metadon	ne	-0,54	-	-
20% ACN					20% MeOH				
propranolol	ne	-0,38	-	-	propranolol	ne	-0,54	-	-
metadon	ne	-0,43	-	-	metadon	ne	-0,54	-	-
35% ACN					35% MeOH				
propranolol	ne	-0,49	-	-	propranolol	ne	-0,38	-	-
metadon	ne	-0,51	-	-	metadon	ne	-0,52	-	-

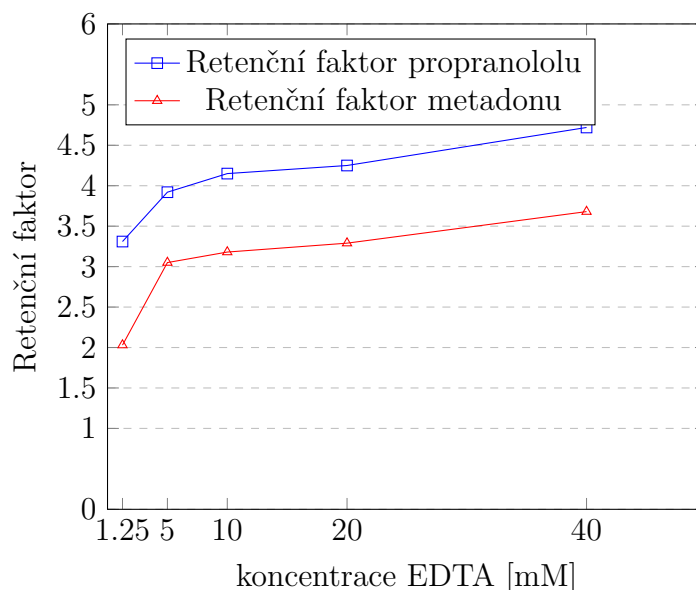


**Obrázek 17:** Chromatogramy metadonu v jednotlivých mobilních fázích při koncentraci 20% MeOH. Jeden z píků v chromatogramu patří nečistotě, což bylo zkontrolováno pomocí UV-spektra.

**Tabulka 5:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci bazických látek za použití MF 3 a MF 4.

Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení
<b>MF 3 : ACN-EDTA (1,25mM), (10:90, v/v)</b>					<b>MeOH-EDTA (1,25mM), (10:90, v/v)</b>				
propranolol	ne	2,21	-	-	propranolol	ne	4,87	-	-
metadon	ne	1,31	-	-	metadon	ano	2,90	3,21	0,40
<b>20% ACN</b>					<b>20% MeOH</b>				
propranolol	ne	0,78	-	-	propranolol	ne	3,58	-	-
metadon	ne	0,28	-	-	metadon	ano	1,73	1,92	0,39
<b>35% ACN</b>					<b>35% MeOH</b>				
propranolol	ne	0,60	-	-	propranolol	ne	1,80	-	-
metadon	ne	0,060	-	-	metadon	ne	0,56	-	-
<b>MF 4 : ACN-AcA (0,1M, pH 3,2), (10:90, v/v)</b>					<b>MeOH-AcA (0,1M, pH 3,2), (10:90, v/v)</b>				
propranolol	ne	-0,38	-	-	propranolol	ne	-0,30	-	-
metadon	ne	-0,42	-	-	metadon	ne	-0,43	-	-
<b>20% ACN</b>					<b>20% MeOH</b>				
propranolol	ne	-0,41	-	-	propranolol	ne	-0,35	-	-
metadon	ne	-0,39	-	-	metadon	ne	-0,41	-	-

**Graf 1:** Závislost retenčních faktorů prvních píků bazických látek na koncentraci EDTA.



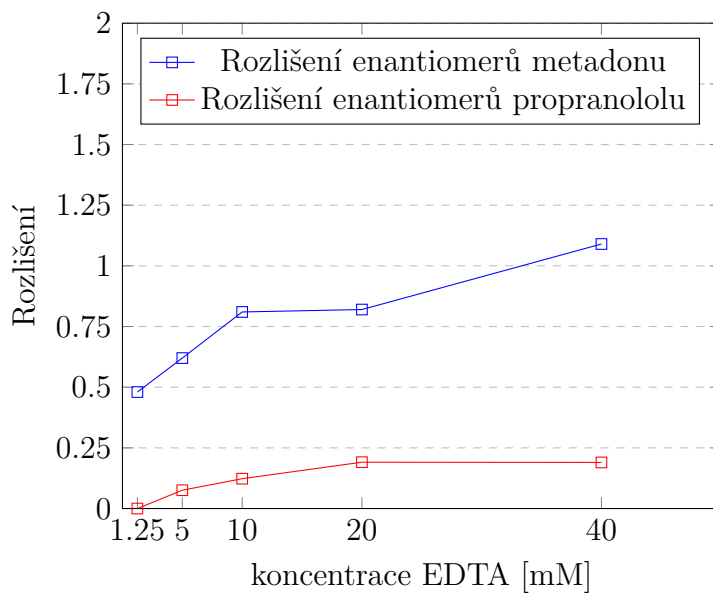
mM a 40 mM). Kvůli riziku precipitace EDTA nebyly připraveny vyšší koncentrace. Se zvyšováním koncentrace EDTA retenční faktory propranololu rostly, ale docházelo také ke zlepšení separace, která byla pozorována od 5 mM EDTA. Největší změna retence byla pozorována se zvýšením koncentrace z 1,25 na 5 mM, zde se retenční faktor zvýšil z 3,31 na 3,92, poté nárůst probíhal mírněji, viz graf 1.

Bylo pozorováno i zlepšení rozlišení, které se zvyšovalo s rostoucí koncentrací EDTA, viz graf 2. Šířku píků enantiomerů propranololu nebylo možné odečíst z důvodu nízkého rozlišení. Z tohoto důvodu jsme sledovali vliv koncentrace EDTA na šířku píků u metadonu. Ten byl zároveň použit pro potvrzení vlivu zvyšující se koncentrace EDTA na retenci a zlepšení rozlišení. Šířka píků metadonu byla výrazněji snížena až při koncentraci EDTA 40 mM. Retenční chování metadonu v závislosti na koncentraci EDTA lze pozorovat v grafech 1, 2 a 3.

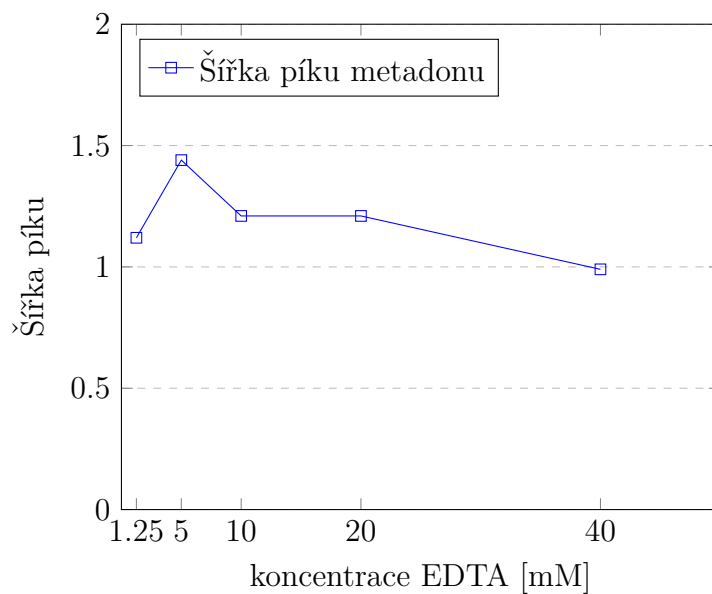
Z naměřených dat viditelných v tabulce č. 6 tedy vyplývá, že se zvyšující se koncentrací EDTA v mobilní fázi dochází k vysycování kovových iontů na povrchu silikagelu a zlepšení parametrů separace. U koncentrace 40 mM již nebylo pozorováno zlepšení rozlišení propranololu.



**Graf 2:** Závislost rozlišení enantiomerů bazických látek na koncentraci EDTA.



**Graf 3:** Závislost šířky prvního píku metadonu na koncentraci EDTA.



Koncentrace (mM)	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení	w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>
Propranolol					
1,25	3,31	-	-	-	-
5	3,92	4,07	0,08	-	-
10	4,15	4,34	0,12	-	-
20	4,25	4,46	0,19	-	-
40	4,72	4,94	0,19	-	-
Metadon					
1,25	2,03	2,26	0,48	1,12	1,24
5	3,05	3,38	0,62	1,43	1,56
10	3,18	3,53	0,81	1,21	1,34
20	3,29	3,66	0,82	1,21	1,37
40	3,68	4,08	1,09	0,99	1,15

**Tabulka 6:** Vliv koncentrace EDTA na chromatografické chování propranololu a metadonu v ACN-EDTA, (5:95, *v/v*). k<sub>1,2</sub> - retenční faktory jednotlivých enantiomerů, w<sub>1,2</sub> - šířky píků.

Testováno bylo i chování látek bazického charakteru při použití MF 4, kdy byla použita kombinace organického rozpouštědla a AcA (0,1M, pH 3,2) Při tomto pH je kyselina octová v nedisociované formě z 97,32 %. Netvoří tedy iontový pár s analyty a dochází tedy k repulzním interakcím mezi povrchem silikagelu a kladně nabitými analyty. Předpokládáme také, že povrch silikagelu není maskován jako u EDTA, a proto ani u jedné látky nedošlo k chirální separaci. Analyty také byly eluovány před mrtvým časem kolony. Naměřené hodnoty pro MF 4 jsou uvedeny v tabulce č. 5 a chromatogramy metadonu pro jednotlivé MF jsou uvedeny na obrázku č. 17.

## 6.2 Kyselé analyty

Použitými látkami z této skupiny byly ketoprofen, fenoprofen a ibuprofen. Ketoprofen byl vybrán jako hlavní analyt, fenoprofen s ibuprofenem byly použity pro potvrzení výsledků.

První mobilní fáze, jako v předchozím případě, byla vybrána podle [73]. Tato mobilní fáze obsahovala H<sub>2</sub>O s kyselinou octovou upravenou triethylaminem na pH 5,6 a organické rozpouštědlo (MeOH nebo acetonitril). Vytvořený triethylaminoacetát

funguje jako iontově-párové činidlo. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 7. Nicméně při těchto podmínkách k chirální separaci nedošlo. Retence ketoprofenu a fenoprofenu při použití 70% acetonitrilu byla významně nižší než při výměně za MeOH, který má nižší eluční sílu. 80% acetonitril nebyl použit, protože zvýšením eluční síly by došlo k dalšímu snížení retenčního faktoru ( $k_{\text{ketoprofen}} = 0,83$ ) a zároveň by se minimalizovala možnost interakce s CS. Ibuprofen nebyl eluován ani při nejsilnějších použitých elučních podmínkách.

Ketoprofen je při pH 5,6 ionizovaný z 95,91% a tvoří tak s triethylamoniovým kationtem iontový pár, stejně jako další zkoumané karboxylové kyseliny. Iontový pár je elektroneutrální a vliv elektrostatické interakce s povrchem silikagelu by měl být minimální. K oddělení enantiomerů ale nedošlo ani v 80% metanolu. Selektivita chirálního selektoru ovšem nemusí být postačující k separaci jednotlivých enantiomerů, separace tohoto druhu analytů výrobce nedeklaruje.

Druhou použitou mobilní fází byla kombinace vody s organickým rozpouštědlem (MF 2). Z výsledků v tabulce 7 lze vidět, že retence ketoprofenu byla velmi vysoká i v 80% acetonitrilu, kdy  $t_r = 85,23$  minut, přepočteno na retenční faktor  $k=22,87$ . Záměnou acetonitrilu za MeOH se retence dále zvýšila a pík ketoprofenu byl zaznamenán až po 110 minutě, viz tabulka č. 7.

Ketoprofen je v těchto podmínkách téměř kompletně ionizovaný. Předpokládáme, že interaguje s kovy na povrchu silikagelu. S ohledem na naměřené výsledky s MF 1 lze tedy vyvodit, že ke tvorbě iontového páru analytů s triethylamoniem dochází, což je patrné ze značných rozdílů retenčních faktorů a skutečnosti, že MF 2 žádný přírůstek iontově-párového činidla neobsahuje.

MF 3 s přírůstkem EDTA byla použita pro ověření předpokladu, že maskováním kovových nečistot na povrchu silikagelu pomocí EDTA dojde ke změně retence sledovaných látek. Při použití acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze bylo retenční chování analytů velmi blízké tomu při použití MF 1. Spolu s rostoucí koncentrací organické složky klesal retenční faktor, v 70% ACN došlo i k eluci ibuprofenu s  $k = 2,48$ . Větší rozdíly mezi MF 1 a 3 byly pozorovány při záměně acetonitrilu za MeOH. U MF 1 i při použití 70% MeOH zůstávaly retenční faktory relativně velké ( $k = 3,45$  pro ketoprofen a  $k = 7,78$  pro fenoprofen). Naproti tomu v MF 3 při stejné koncentraci methanolu se retenční faktory snížily přibližně pětikrát. Možným vysvětlením je, že EDTA efektivně blokuje povrch silikagelu a významně snižuje příspěvek achirální složky k celkové retenci. Výsledky jsou uvedeny v tabulce

**Tabulka 7:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci kyselých látek za použití MF 1 a MF 2.

Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení
<b>MF 1 : ACN-AcA (0,1M, pH 5,6), (70:30, v/v)</b>									
ketoprofen	ne	0,83	-	-	ketoprofen	ne	3,45	-	-
fenoprofen	ne	1,47	-	-	fenoprofen	ne	7,78	-	-
ibuprofen	neeluováno po 35 minutách	-	-	-	ibuprofen	-	-	-	-
80% ACN									
ketoprofen	-	-	-	-	ketoprofen	ne	3,00	-	-
fenoprofen	-	-	-	-	fenoprofen	ne	5,50	-	-
ibuprofen	-	-	-	-	ibuprofen	-	-	-	-
<b>MF 2: ACN-H<sub>2</sub>O, (80:20, v/v)</b>									
MeOH-H <sub>2</sub> O, (80:20, v/v)									
ketoprofen	ne	22,87	-	-	ketoprofen	eluce po 110 minutách	-	-	-
fenoprofen	eluce po 139 minutách	-	-	-	fenoprofen	-	-	-	-
ibuprofen	-	-	-	-	ibuprofen	-	-	-	-

č. 8.

I zde jsme testovali vliv koncentrace EDTA na retenční chování ketoprofenu. Naměřené výsledky jsou zobrazeny v tabulce č. 9.

Koncentrace (mM)	$k_1$	$k_2$	Rozlišení	$w_1$	$w_2$
<b>1,25</b>	16,99	x	x	3,08	x
<b>5</b>	11,49	x	x	2,71	x
<b>10</b>	9,33	x	x	2,35	x
<b>20</b>	7,08	x	x	1,84	x
<b>40</b>	5,49	x	x	1,48	x

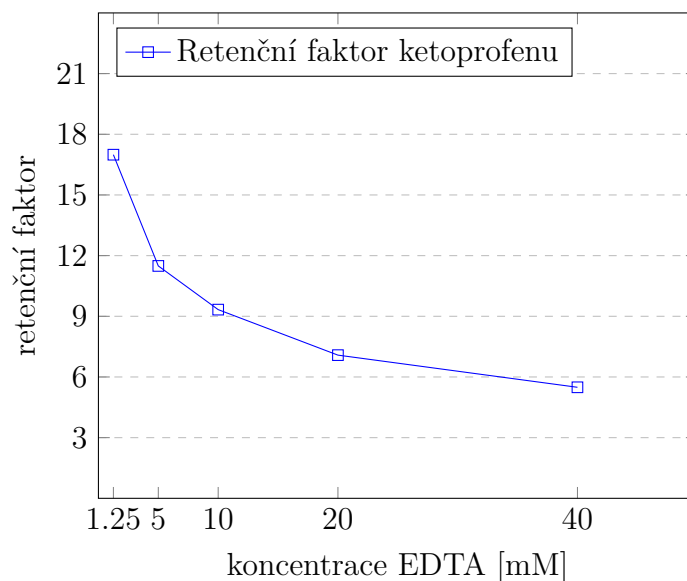
**Tabulka 9:** Vliv koncentrace EDTA na retenční chování ketoprofenu v ACN-EDTA, (20:80, *v/v*)  $k_{1,2}$  - retenční faktory jednotlivých enantiomerů ketoprofenu,  $w_{1,2}$  - šířky píků.

Dle předchozích experimentů byla vybrána mobilní fáze s ACN-EDTA (20:80 *v/v*). Koncentrace EDTA byla 1.25, 5, 10, 20 a 40 mM. Vyšší koncentrace EDTA nebyly použity kvůli riziku precipitace. Stejně jako u analytů bazické povahy ze získaných výsledků vyplývá, že lze pozorovat významný trend v ovlivnění retenčních faktorů s rostoucí koncentrací EDTA. To ukazuje na významný příspěvek achirálních interakcí k celkové retenci i u kyselých látek. S rostoucí koncentrací EDTA docházelo k poklesu retenčních faktorů, což souvisí s postupnou eliminací dostupných kationických míst na povrchu silikagelu. Největší změna retenčního faktoru byla pozorována mezi 1,25 mM a 5 mM, viz graf č. 4.

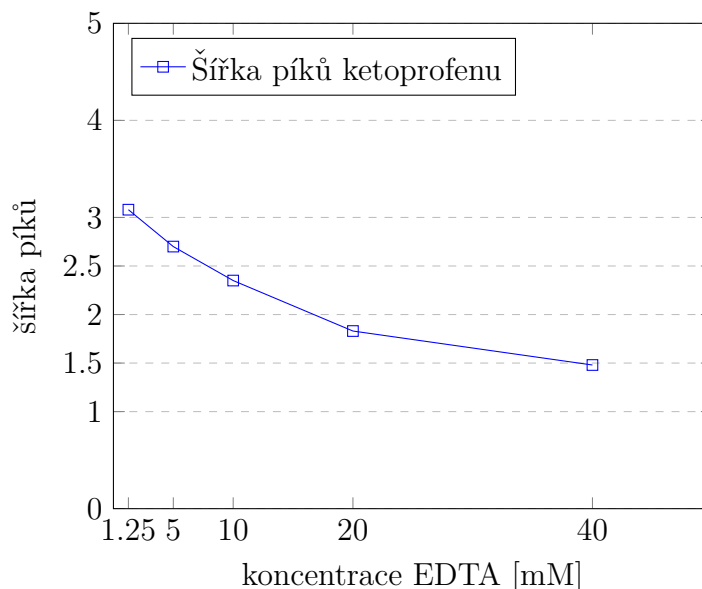
**Tabulka 8:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci kyselých látek za použití MF 3 a MF 4.

MF 3 : ACN-EDTA (1,25mM), (50:50, v/v)		MeOH-EDTA (1,25mM), (50:50, v/v)	
ketoprofen	ne	1,28	- - ketoprofen ne 3,18 - -
fenoprofen	ne	2,56	- - fenoprofen ne 10,25 - -
ibuprofen	neeluováno po 22 minutách	- -	- - - -
70% ACN			
ketoprofen	ne	0,18	- - ketoprofen ne 0,72 - -
fenoprofen	ne	1,53	- - fenoprofen ne 1,77 - -
ibuprofen	ne	2,48	- - ibuprofen ne 6,80 - -
MF 4 : ACN-AcA (0,1M, pH 3,2), (50:50, v/v)		MeOH-AcA (0,1M, pH 3,2), (50:50, v/v)	
ketoprofen	ne	2,96	- - ketoprofen - -
fenoprofen	ne	4,50	- - fenoprofen - -
ibuprofen	ne	- -	- - ibuprofen - -
70% ACN			
ketoprofen	ne	1,09	- - ketoprofen ne 9,94 - -
fenoprofen	ne	1,33	- - fenoprofen - -
ibuprofen	ne	4,49	- - ibuprofen - -
80% ACN			
ketoprofen	ne	1,56	- - ketoprofen ne 9,02 - -
fenoprofen	ne	1,65	- - fenoprofen ne 12,12 - -
ibuprofen	ne	4,86	- - ibuprofen neeluováno po 50 min - -

**Graf 4:** Závislost retenčního faktoru ketoprofenu na koncentraci EDTA.



**Graf 5:** Závislost šířky píků ketoprofenu na koncentraci EDTA.

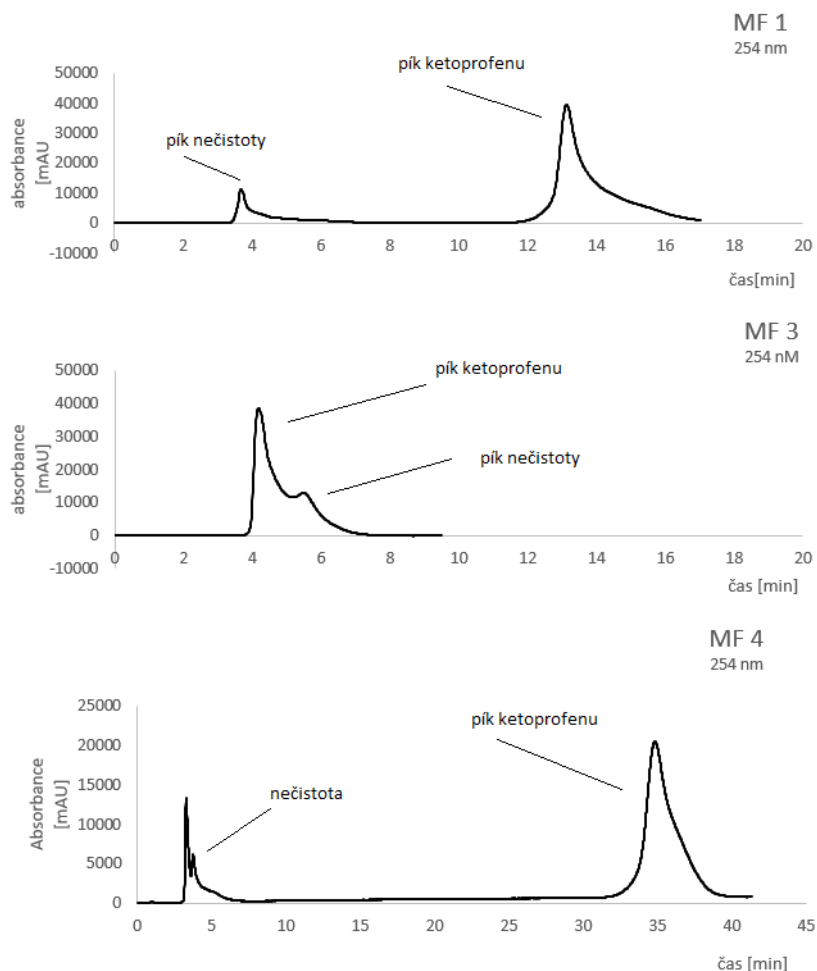


Dále bylo pozorováno zužování šířky píku s rostoucí koncentrací EDTA,, které vykazovalo podobný trend jako retenční faktor, viz graf č. 5. Dle výsledků naměřených u MF 2 lze předpokládat, že bez obsahu EDTA při této koncentraci organického rozpouštědla by k eluci ketoprofenu nedošlo vůbec.

Poslední zkoušenou mobilní fází byla kombinace organického rozpouštědla a AcA (0,1M, pH 3,2). Kyselina octová je při tomto pH neionizována z 97,32% a nechelatuje kovové nečistoty. K chirální separaci nedošlo u žádného ze zkoumaných analytů, ale jelikož při tomto pH analyty jsou převážně v nedisociované formě (ketoprofen 89,59%), vliv achirální interakce s povrchem silikagelu je potlačen a analyt tak může

interagovat s chirálním selektorem. Při použití 70% ACN a MeOH byl eluován i ibuprofen. Se zvyšujícím se podílem organického rozpouštědla v MF docházelo ke snížení retence, ale u 80% acetonitrilu mírně narostla. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Na obrázku č. 18 jsou uvedeny chromatogramy ketoprofenu v jednotlivých mobilních fázích. MF 2 zde není zobrazena z důvodu vysoké retence ketoprofenu.



**Obrázek 18:** Chromatogramy ketoprofenu v jednotlivých mobilních fázích při koncentraci 80% MeOH.

### 6.3 Neionizované látky

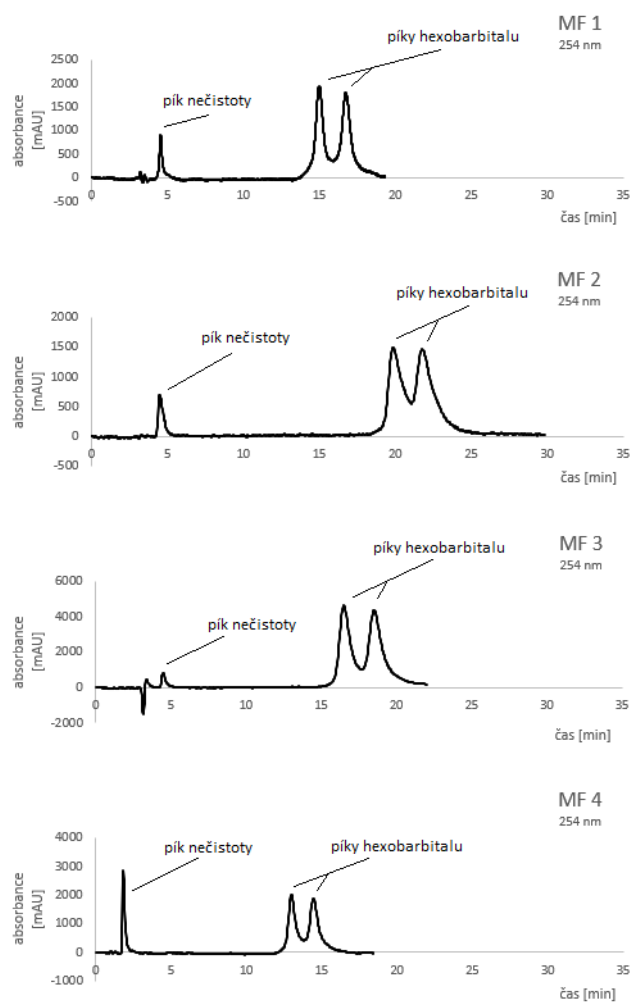
Neionizované látky hexobarbital a oxazepam sloužily k potvrzení naší teorie. Hexobarbital je velmi slabá kyselina ( $pK_A = 8,21$ ), zatímco oxazepam je velmi slabou bazí ( $pK_A = 11,65$ ). Za uvedených chromatografických podmínek jsou obě látky v nedisociované podobě. Předpokládali jsme, že díky tomu nedochází k elektrostatickým interakcím s kovovými nečistotami na povrchu silikagelu. Tento předpoklad reflektuje



výsledky již dříve provedených experimentů. [73].

Ve všech použitých mobilních fázích docházelo k chirální separaci obou látek. Při stejných koncentracích organické složky byla vyšší retence a rozlišení za použití methanolu. Hexobarbital byl výrazně více zadržován nežli oxazepam. Naměřené retenční faktory lze nalézt v tabulkách č. 10 a 11. V případě oxazepamu byl také pozorován tzv. batman pík, což ukazuje na přechod jednoho enantiomeru oxazepamu v druhý během analýzy. Tento proces je závislý na teplotě a jejím snížením by došlo ke snížení sedla mezi píky. [75]

Vysvětlení větší retence hexobarbitalu může spočívat v částečné ionizaci látky a iontových interakcích s povrchem silikagelu či v komplexaci analytu s kovem na povrchu nebo v nespecifické absorpci. [73] Na obrázku č. 19 jsou uvedeny chromatogramy hexobarbitalu.



**Obrázek 19:** Chromatogramy hexobarbitalu v jednotlivých mobilních fázích při koncentraci 35% ACN.

Testován byl i vliv kovových nečistot na retenční chování analytů v nedisociované

**Tabulka 10:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci neionizovaných látek za použití MF 1 a MF 2.

Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení
<b>MF 1 : ACN-AcA (0,1M, pH 5,6), (10:90, v/v)</b>									
hexobarbital	eluce po 55 minutách	-	-	-	hexobarbital	-	-	-	-
oxazepam	ano	2,07	4,31	6,86	oxazepam	ano	4,60	9,97	7,41
20% ACN									
hexobarbital	ano	3,66	4,19	1,74	hexobarbital	ano	15,30	17,72	1,98
oxazepam	ano	0,56	1,06	3,44	oxazepam	ano	2,39	4,97	6,32
35% ACN									
hexobarbital	ano	0,73	0,84	0,83	hexobarbital	ano	4,46	5,14	1,73
oxazepam	ano	0,00	0,16	0,54	oxazepam	ano	0,75	1,43	3,72
<b>MF 2 : ACN-H<sub>2</sub>O, (20:80, v/v)</b>									
MeOH-H <sub>2</sub> O, (20:80, v/v)									
hexobarbital	ano	4,56	5,10	0,10	hexobarbital	ano	17,56	20,27	1,70
oxazepam	ano	0,88	0,97	2,24	oxazepam	ano	2,46	5,27	5,72
35% ACN									
hexobarbital	ano	0,88	0,97	0,32	hexobarbital	ano	6,14	6,94	1,32
oxazepam	ano	-0,02	0,63	0,37	oxazepam	ano	0,88	1,69	3,36

**Tabulka 11:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci neionizovaných látek za použití MF 3 a MF 4.

Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení
<b>MF 3 : ACN-EDTA (1,25mM), (20:80, v/v)</b>					<b>MeOH-EDTA (1,25mM), (20:80, v/v)</b>				
hexobarbital	ano	4,85	5,56	1,33	hexobarbital	ano	18,26	21,18	2,19
oxazepam	ano	0,78	1,41	3,07	oxazepam	ano	3,09	6,32	5,72
35% ACN					35% MeOH				
hexobarbital	ano	1,09	1,21	0,55	hexobarbital	ano	5,45	6,32	1,38
oxazepam	ano	0,21	0,32	0,57	oxazepam	ano	0,93	1,77	3,32
<b>MF 4 : ACN-AcA (0,1M, pH 3,2), (10:90, v/v)</b>					<b>MeOH-AcA (0,1M, pH 3,2), (10:90, v/v)</b>				
hexobarbital	-	-	-	-	hexobarbital	-	-	-	-
oxazepam	ano	1,84	3,79	5,83	oxazepam	ano	4,13	8,67	5,15
20% ACN					20% MeOH				
hexobarbital	ano	3,32	3,80	1,42	hexobarbital	ano	12,85	15,05	1,79
oxazepam	ano	0,58	1,06	2,37	oxazepam	ano	2,16	4,43	5,25
35% ACN					35% MeOH				
hexobarbital	ano	0,80	0,90	0,61	hexobarbital	ano	4,21	4,83	1,36
oxazepam	ano	0,17	0,25	0,42	oxazepam	ano	0,76	1,42	2,96

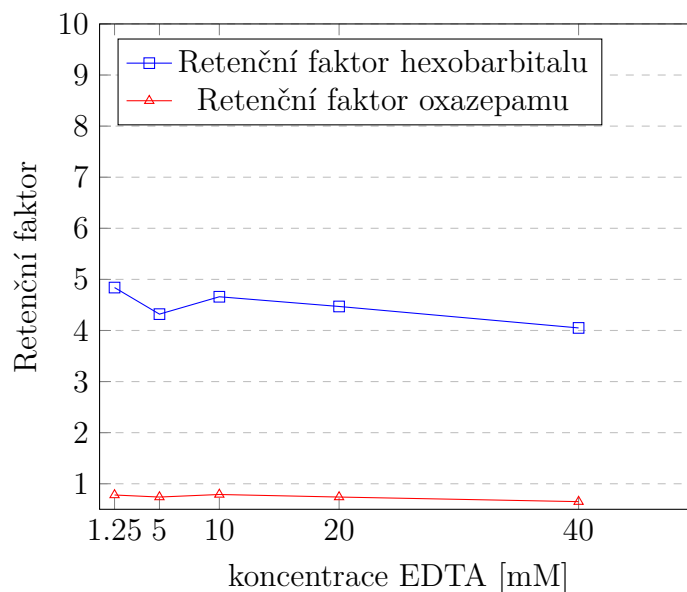
podobě pomocí EDTA. Předpokládali jsme, že kovové nečistoty nebudou mít na retenční chování vliv. Na základě naměřených dat byl ke zkoumání vlivu EDTA na achirální interakce použit 20% acetonitril se zvyšující se koncentrací EDTA (1,25 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM a 40 mM). Naměřené výsledky pro hexobarbital a oxazepam jsou k dispozici v tabulce č. 12.

Koncentrace (mM)	$k_1$	$k_2$	Rozlišení	$w_1$	$w_2$
hexobarbital					
1,25	4,85	5,56	1,33	1,04	1,14
5	4,32	4,96	1,57	1,07	1,21
10	4,66	5,37	1,67	1,17	1,28
20	4,47	5,13	1,45	1,19	1,46
40	4,05	4,65	1,44	1,11	1,44
oxazepam					
1,25	0,78	1,41	3,07	0,52	0,64
5	0,74	1,34	3,03	0,51	0,61
10	0,80	1,49	3,37	0,54	0,67
20	0,74	1,40	3,15	0,52	0,66
40	0,65	1,20	2,82	0,53	0,62

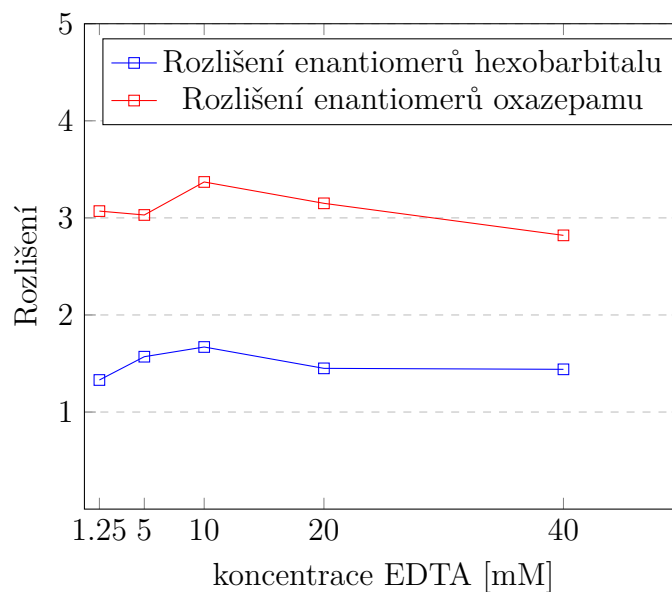
**Tabulka 12:** Vliv koncentrace EDTA na retenční chování hexobarbitalu a oxazepamu v ACN-EDTA, (20:80 *v/v*).  $k_{1,2}$  - retenční faktory jednotlivých enantiomerů hexobarbitalu,  $w_{1,2}$  - šířky píků.

U hexobarbitalu a oxazepamu bylo pozorováno mírné snížení retenčního faktoru, u hexobarbitalu i snížení rozlišení. Tato změna byla pozorována mezi 20 a 40 mM, viz grafy 6 a 7.

**Graf 6:** Závislost retenčních faktorů prvních píků neionizovaných látek na koncentraci EDTA.

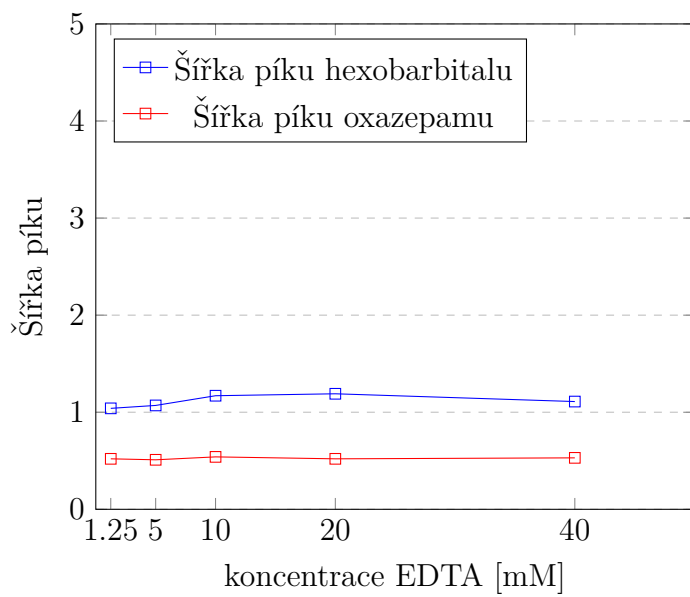


**Graf 7:** Závislost rozlišení píků neionizovaných látek na koncentraci EDTA.



EDTA chelatuje kationická místa na povrchu silikagelu. Jelikož může docházet k částečné ionizaci hexobarbitalu nebo jeho komplexaci s kovem na povrchu silikagelu, snížení retence je pravděpodobně založené na podkladu ovlivnění achirálních interakcí. Snížení rozlišení lze přisoudit kratší retenci. Vliv zvyšující se koncentrace EDTA na šířku píků nebyl pozorován, viz graf č. 8.

**Graf 8:** Závislost šířky prvních píků neionizovaných látek na koncentraci EDTA.



## 6.4 Porovnání cyklodextrinových kolon

Součástí této práce bylo také porovnat retenční chování modelových analytů na koloně použité v této práci (dále jako kolona A) a koloně použité v práci [73] (dále jako kolona B). Mezi oběma kolonami existují drobné rozdíly. Jako chirální selektor je v koloně A použit nativní cyklodextrin a v koloně B bromovaný cyklodextrin. Dále předpokládáme rozdílný obsah kovů v obou kolonách. K porovnání vlivu experimentálních podmínek na retenci a chirální separaci bylo využito rozlišení, spočítané podle rovnice č. 2 a retenční faktory, spočítané podle výsledků uvedených v [73] pomocí rovnice č. 3.

Retenční faktory a rozlišení pro bazické, kyselé a neionizované analyty v jednotlivých mobilních fázích z práce A.Daňka [73] jsou uvedeny v tabulkách č. 13 a 14 pro bazické analyty, 15 a 16 pro kyselé analyty a pro neionizované látky v tabulkách 17 a 18.

Podrobný popis výsledků získaných na koloně B lze najít v [73]. Za nejdůležitější rozdíl lze považovat chirální separaci kyselých analytů na koloně B, ke které nedošlo na koloně A s nativním cyklodextrinem. Tuto skutečnost lze připsat rozdílu v chirálním selektoru. Dále byl pozorován rozdílný vliv zvyšující se koncentrace EDTA v mobilní fázi na retenci, rozlišení a šířku píků. Zatímco pro bazické analyty nebyla u kolony B pozorována významná změna výše zmíněných parametrů při koncentraci EDTA nad 5 mM, u kolony A se tyto parametry měnily v celém rozsahu koncentrací. Zlepšení rozlišení a zvýšení retenčních faktorů u bazických látek a snížení retence pro kyselé látky bylo zjištěno na obou stacionárních fázích. Rozdílné chování bazických a kyselých látek si vysvětlujeme rozdílnou achirální interakcí s povrchem silikagelu v závislosti na jejich náboji. Tím, jak jsou kovové nečistoty na povrchu silikagelu postupně chelátovány, klesá i příspěvek jimi způsobených achirálních interakcí. Na koloně B se obecně lépe dělil propranolol i ve vyšších koncentracích organického rozpouštědla, než na koloně A. Co se týče neionizovaných látek, na koloně A byl hexobarbital ve všech methanolických fázích zadržován nepoměrně déle, než na koloně B, což předpokládáme, že bylo způsobeno vyšším obsahem kovových iontů na povrchu silikagelu. Na rozdíl od kolony B byl na koloně A také pozorován vliv zvyšující se koncentrace EDTA na retenci hexobarbitalu, což předpoklad potvrzuje.

**Tabulka 13:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci bazických látek za použití MF 1 a MF 2, převzato z [73] a upraveno.

Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení
<b>MF 1 : ACN-AcA (0,1M, pH 5,6), (10:90, v/v)</b>									
propranolol	ne	0,71	-	-	propranolol	ano	1,89	2,02	0,83
metadon	ano	0,42	0,46	0,19	metadon	ano	0,95	1,06	1,04
20% ACN									
propranolol	ne	0,30	-	-	propranolol	ano	1,06	1,14	0,64
metadon	ne	0,30	-	-	metadon	ano	0,43	0,49	0,47
40% ACN									
propranolol	ne	-0,05	-	-	propranolol	ne	0,22	-	-
metadon	-	-0,06	-	-	metadon	ne	0,01	-	-
<b>MF 2 : ACN-H<sub>2</sub>O, (20:80, v/v)</b>									
propranolol	ne	0,24	-	-	propranolol	ne	-0,25	-	-
metadon	ne	-0,16	-	-	metadon	ne	0,64	-	-
40% ACN									
propranolol	ne	-0,02	-	-	propranolol	ne	0,93	-	-
metadon	ne	-0,27	-	-	metadon	ne	0,41	-	-
40% MeOH									
propranolol	ne	-0,02	-	-	propranolol	ne	0,93	-	-
metadon	ne	-0,27	-	-	metadon	ne	0,41	-	-



**Tabulka 14:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci bazických látek za použití MIF 3 a MIF 4, převzato z [73] a upraveno.

Vzorek	Chirální separace	$k_1$	$k_2$	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	$k_1$	$k_2$	Rozlišení
<b>MIF 3 : ACN-EDTA (1,25mM), (10:90, v/v)</b>					<b>MeOH-EDTA (1,25mM), (50:50, v/v)</b>				
propranolol	ne	0,44	-	-	propranolol	-	-	-	-
metadon	ano	1,56	1,65	0,29	metadon	ano	1,25	1,41	0,75
20% ACN					20% MeOH				
propranolol	ne	0,09	-	-	propranolol	ano	2,21	2,34	0,53
metadon	ne	0,49	-	-	metadon	ne	0,61	-	-
40% ACN					40% MeOH				
propranolol	ne	0,01	-	-	propranolol	-	-	-	-
metadon	ne	0,20	-	-	metadon	ne	0,11	-	-
<b>MIF 4 : ACN-AcA (0,1M, pH 3,2), (20:80, v/v)</b>					<b>MeOH-AcA (0,1M, pH 3,2), (20:80, v/v)</b>				
propranolol	ne	-0,14	-	-	propranolol	ne	-0,33	-	-
metadon	ne	-0,30	-	-	metadon	ne	-0,35	-	-
40% ACN					40% MeOH				
propranolol	ne	-0,24	-	-	propranolol	ne	-0,40	-	-
metadon	ne	-0,28	-	-	metadon	ne	0,39	-	-

**Tabulka 15:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci kyselých látek za použití MF 1 a MF 2. Převzato z [73] a upraveno.

Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení
<b>MF 1 : ACN-AcA (0,1M, pH 5,6), (70:30, v/v)</b>									
ketoprofen	ano	0,73	0,79	1,02	ketoprofen	ano	2,20	2,47	1,26
fenoprofen	-	-	-	-	fenoprofen	neeluováno po 30 min	-	-	-
ibuprofen	-	-	-	-	ibuprofen	neeluováno po 22 min	-	-	-
80% ACN									
ketoprofen	ano	0,76	0,81	0,67	ketoprofen	ano	2,35	2,51	1,22
fenoprofen	ano	1,01	1,29	1,95	fenoprofen	neeluováno po 22 minutách	-	-	-
ibuprofen	ano	5,59	7,01	3,45	ibuprofen	-	-	-	-
<b>MF 2: ACN-H<sub>2</sub>O, (70:30, v/v)</b>									
MeOH-H <sub>2</sub> O, (70:30, v/v)									
ketoprofen	ano	8,31	10,28	1,43	ketoprofen	neeluováno po 78 minutách	-	-	-
fenoprofen	-	-	-	-	fenoprofen	-	-	-	-
ibuprofen	-	-	-	-	ibuprofen	-	-	-	-
80% ACN									
ketoprofen	ano	7,31	9,16	1,22	ketoprofen	neeluováno po 22 minutách	-	-	-
fenoprofen	neeluováno po 22 minutách	-	-	-	fenoprofen	-	-	-	-
ibuprofen	neeluováno po 60 minutách	-	-	-	ibuprofen	-	-	-	-

**Tabulka 16:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci kyselých látek za použití MF 3 a MF 4. Převezato z [73] a upraveno.

Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení
<b>MF 3 : ACN-EDTA (1,25mM), (70:30, v/v)</b>									
ketoprofen	-	-	-	-	ketoprofen	ano	3,33	4,42	1,85
fenoprofen	-	-	-	-	fenoprofen	-	-	-	-
ibuprofen	-	-	-	-	ibuprofen	neeluhováno po 45 min	-	-	-
80% ACN									
ketoprofen	ano	0,62	0,88	1,73	ketoprofen	ano	1,76	2,27	1,66
fenoprofen	ano	1,20	2,04	1,51	fenoprofen	ano	6,70	10,37	1,68
ibuprofen	neeluhováno po 70 minutách	-	-	-	ibuprofen	neeluhováno po 50 minutách	-	-	-
<b>MF 4: ACN-AcA (0,1M, pH 3,2), (70:30, v/v)</b>									
ketoprofen	ano	0,54	0,65	1,62	ketoprofen	ano	2,60	3,29	2,57
fenoprofen	-	-	-	-	fenoprofen	-	-	-	-
ibuprofen	-	-	-	-	ibuprofen	neeluhováno po 44 minutách	-	-	-
80% ACN									
ketoprofen	ano	0,77	0,89	1,65	ketoprofen	ano	2,74	3,14	1,58
fenoprofen	ano	0,79	1,21	2,14	fenoprofen	ano	6,26	8,86	2,08
ibuprofen	ano	3,70	4,95	3,43	ibuprofen	neeluhováno po 42 minutách	-	-	-
80% MeOH									

**Tabulka 17:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci neionizovaných látek za použití MF 1 a MF 2. Převzato z [73] a upraveno.

Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	Rozlišení
<b>MF 1 : ACN-AcA (0,1M, pH 5,6), (20:80, v/v)</b>									
hexobarbital	ano	0,74	0,85	1,58	hexobarbital	ano	4,96	6,00	2,96
oxazepam	ano	0,44	0,57	1,21	oxazepam	ano	1,32	2,01	4,62
40% ACN									
hexobarbital	ne	0,13	-	-	hexobarbital	ano	0,78	0,90	1,47
oxazepam	ne	0,06	-	-	oxazepam	ano	0,39	0,52	1,35
<b>MF 2 : ACN-H<sub>2</sub>O, (20:80, v/v)</b>									
MeOH-H <sub>2</sub> O, (20:80, v/v)									
hexobarbital	ano	2,37	2,57	1,61	hexobarbital	ano	9,14	10,23	1,77
oxazepam	ano	1,12	1,35	1,71	oxazepam	ano	1,80	2,86	5,10
40% ACN									
hexobarbital	ne	0,66	-	-	hexobarbital	ne	1,70	-	-
oxazepam	ne	0,37	-	-	oxazepam	ano	0,57	0,77	1,90

**Tabulka 18:** Vliv experimentálních podmínek na chirální separaci neionizovaných látek za použití MF 3 a MF 4. Převzato z [73] a upraveno.

Vzorek	Chirální separace	$k_1$	$k_2$	Rozlišení	Vzorek	Chirální separace	$k_1$	$k_2$	Rozlišení
<b>MF 3 : ACN-EDTA (1,25mM), (20:80, v/v)</b>									
					MeOH-EDTA (1,25mM), (20:80, v/v)				
hexobarbital	ano	1,05	1,22	2,05	hexobarbital	ano	4,15	4,93	2,54
oxazepam	ano	1,43	1,59	1,49	oxazepam	ano	1,64	2,45	3,97
40% ACN									
hexobarbital	ne	0,25	-	-	hexobarbital	ano	0,93	1,12	1,92
oxazepam	ne	0,23	-	-	oxazepam	ano	0,41	0,54	1,19
<b>MF 4 : ACN-AcA (0,1M, pH 3,2), (20:80, v/v)</b>									
					MeOH-AcA (0,1M, pH 3,2), (20:80, v/v)				
hexobarbital	ano	0,63	0,74	1,13	hexobarbital	ano	3,42	4,16	2,79
oxazepam	ano	0,37	0,46	0,72	oxazepam	ano	1,19	1,78	3,38
40% ACN									
hexobarbital	ne	0,20	-	-	hexobarbital	ano	0,69	0,82	1,32
oxazepam	ne	0,17	-	-	oxazepam	ano	0,38	0,49	0,93
40% MeOH									

## 7 Závěr

V této diplomové práci byl sledován vliv experimentálních podmínek na retenci a chirální separaci vybraných modelových analytů. Pozornost byla zaměřena na ovlivnění achirálních interakcí mezi modelovými látkami a stacionární fází s nativním  $\beta$ -cyklodextrinem. Získaná data byla následně porovnána s výsledky získanými v diplomové práci A. Daňka, který pro tento účel použil kolonu s bromovaným  $\beta$ -cyklodextrinem [73]. Soubor modelových látek zahrnoval bazické a kyselé analyty a dále pak látky, které nebyly za experimentálních podmínek ionizované. Na obou stacionárních fázích byl patrný podstatný příspěvek achirálních iontových interakcí mezi povrchem silikagelu a ionizovatelnými látkami. Tyto interakce bylo možné modifikovat volbou chromatografických podmínek, což se také ukázalo jako zásadní pro ovlivnění retence modelových látek a také pro jejich chirální separaci. Pokud byly podmínky nastaveny tak, že příspěvek těchto achirálních interakcí byl dominantní, byla chirální separace modelových látek negativně ovlivněna a v některých případech i znemožněna.

Nejvýznamnějšími rozdíly mezi oběma stacionárními fázemi byly následující: 1) kyselé analyty se nepodařilo separovat za žádných experimentálních podmínek na koloně s nativním  $\beta$ -cyklodextrinem. Separace těchto analytů se ale podařila na stacionární fází s bromovaným  $\beta$ -cyklodextrinem. Tento jev lze připsat rozdílu v chirálním selektoru; 2) na stacionární fází obsahující nativní  $\beta$ -cyklodextrin byly iontové interakce podstatně silnější, což patrně souvisí s rozdílným obsahem kovových iontů na povrchu silikagelu. Tento jev ovlivnil také enantiosektivitu na obou stacionárních fázích.

## Citovaná literatura

- (1) Development of New Stereoisomeric Drugs <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-new-stereoisomeric-drugs> (cit. 11. 01. 2020).
- (2) Calcaterra, A.; D'Acquarica, I. The Market of Chiral Drugs: Chiral Switches versus de Novo Enantiomerically Pure Compounds. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2018**, *147*, 323–340, ISSN: 07317085.
- (3) *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, 2. vyd.; Subramanian, G., ed.; Wiley-VCH: Weinheim ; New York, 2001, ISBN: 978-3-527-29875-4.
- (4) Scriba, G. K. E., *Chiral Separations: Methods and Protocols*, OCLC: 1107495341; Springer: 2019, ISBN: 978-1-4939-9438-0.
- (5) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W., *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition*; John Wiley and Sons, Inc: New York, 2011; sv. 22, ISBN: 978-0-470-16754-0.
- (6) Nawrocki, J. Silica Surface Controversies, Strong Adsorption Sites, Their Blockage and Removal. Part I. *Chromatographia* **1991**, *31*, 177–192, ISSN: 0009-5893, 1612-1112.
- (7) Snyder, L. R., *PRINCIPLES OF ADSORPTION CHROMATOGRAPHY*; Wiley-VCH: Weinheim ; New York, 1968; 10-36, ISBN: 978-0-8247-1639-4.
- (8) *Český Lékopis*; Grada Publishing, a.s.: Praha, 2009; 1-1184, ISBN: 9788024729947.
- (9) Klimeš, J.; Kastner, P.; Pilařová, P.; Mokřý, M., *Kontrolně-Analytické Hodnocení Léčiv Lékopisnými Metodami*, 2. vyd., 2009; 36-41, ISBN: 978-80-260-8175-3.
- (10) Meyer, V. R., *Practical High-Performance Liquid Chromatography*; John Wiley and Sons, Ltd: 2010, ISBN: 978-0-470-68218-0.
- (11) Miller, J., *Chromatography: Concepts and Contrasts*, 2. vyd.; John Wiley and Sons, Inc: 2009, ISBN: 978-0-470-53025-2.
- (12) Lundanes, E.; Reubsaet, L.; Greibrokk, T., *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*, 1. vyd.; Wiley-VCH: 2013; 47-104, ISBN: 978-3-527-33620-3.

- (13) Nexera HPLC/UHPLC Column Oven - CTO-40C <https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/nexera/column-oven-cto-40c.html> (cit. 14.01.2020).
- (14) Hayes, R.; Ahmed, A.; Edge, T.; Zhang, H. Core-Shell Particles: Preparation, Fundamentals and Applications in High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1357*, 36–52, ISSN: 0021-9673.
- (15) Mazzeo, J. R.; Neue, U. D.; Kele, M. Advancing LC Performance with Smaller Particles and Higher Pressure. *Anal. Chem* **2005**, *77*, 460–467, ISSN: 1520-6882.
- (16) Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3498–3501, ISSN: 0003-2700, 1520-6882.
- (17) Svec, F.; Fretchet, J. M. Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 820–822, ISSN: 0003-2700.
- (18) Svec, F.; Christian G, H. Monolithic Materials: Promises, Challenges, Achievements. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2100–2107, ISSN: 0003-2700.
- (19) Xiaoli, D.; Jing, Y.; Yuming, D. Advancements in the Preparation of High-Performance Liquidchromatographic Organic Polymer Monoliths for the Separation Ofsmall-Molecule Drugs. *J. Pharm. Anal.* **2018**, *8*, 75–85, ISSN: 2095-1779.
- (20) Ruta, J.; Zurlino, D.; Grivel, C.; Heinisch, S.; Veuthey, J.-L.; Guillaume, D. Evaluation of Columns Packed with Shell Particles with Compounds of Pharmaceutical Interest. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1228*, 221–231, ISSN: 0021-9673.
- (21) Berthod, A. Silica: Backbone Material of Liquid Chromatographic Column Packings. *J. Chromatogr. A* **1991**, *549*, 1–28, ISSN: 0021-9673.
- (22) Unger, K., *Porous Silica—Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography*; 2; Elsevier: New York, 1979; sv. 179, s. 1–163, ISBN: 978-0-080-85816-6.
- (23) Nawrocki, J. The Silanol Group and Its Role in Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1997**, *779*, 29–71, ISSN: 00219673.



- (24) Iler, R. K., *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*; Wiley: New York, 1979, s. 661, ISBN: 978-0-471-02404-0.
- (25) Wilhelm, S.; Kind, M. Influence of pH, Temperature and Sample Size on Natural and Enforced Syneresis of Precipitated Silica. *Polymers* **2015**, *7*, 2504–2521, ISSN: 2073-4360.
- (26) Engelhardt, H.; Lobert, T. Chromatographic Determination of Metallic Impurities in Reversed-Phase HPLC Columns. *Anal. Chem* **1999**, *71*, 1885–1892, ISSN: 0003-2700.
- (27) Tanabe, K.; Sumiyoshi, T.; Shibata, K.; Kiyoura, T.; Kitagawa, J. A New Hypothesis Regarding the Surface Acidity of Binary Metal Oxides. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1974**, *47*, 1064–1066, ISSN: 0009-2673.
- (28) Bocian, S.; Buszewski, B. Residual Silanols at Reversed-Phase Silica in HPLC - a Contribution for a Better Understanding. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 1191–1200, ISSN: 1615-9314.
- (29) Verzele, M.; De Potter, M.; Ghysels, J. Trace Elements in HPLC Silica Gel. *J. Sep. Sci* **1979**, *2*, 151–153, ISSN: 1615-9314.
- (30) Verzele, M.; Dewaele, C. The Evaluation of „Reversed Phase“ High-Performance Liquid Chromatography Packing Materials. *Chromatographia* **1984**, *18*, 84–86, ISSN: 0009-5893.
- (31) Ohtsu, Y.; Shiojima, Y.; Okumura, T.; Koyama, J.; Nakamura, K.; Nakata, O.; Tanaka, N. Performance of Polymer-Coated Silic C18 Packing Materials Prepared from High-Purity Silica Gel. *J. Chromatogr. A* **1989**, *481*, 147–157, ISSN: 0021-9673.
- (32) Kimata, K.; Tanaka, N.; Araki, T. Suppression of the Effect of Metal Impurities in Alkylsilylated Silica Packing Materials. *J Chromatogr A* **1992**, *594*, 87–96, ISSN: 0021-9673.
- (33) Engelhardt, H.; Löw, H.; Göttinger, W. Chromatographic Characterization of Silica-Based Reversed Phases. *J. Chromatogr. A* **1991**, *544*, 371–379, ISSN: 0021-9673.

- (34) Visky, D.; Vanderheyden, Y.; Ivanyi, T.; Baten, P.; Debeer, J.; Kovacs, Z.; Noszal, B.; Dehouck, P.; Roets, E.; Massart, D. Characterisation of Reversed-Phase Liquid Chromatographic Columns by Chromatographic tests Rational Column Classification by a Minimal Number of Column Test Parameters. *J. Chromatogr. A.* **2003**, *1012*, 11–29, ISSN: 00219673.
- (35) Of Europe, C., *The European Pharmacopoeia*; Directorate for the Quality of Medicines: Strasbourg, 2019; sv. 10, s. 572–577.
- (36) Kimata, K.; Iwaguchi, K.; Onishi, S.; Tanaka, N. Chromatographic Characterization of Silica C18 Packing Materials. Correlation between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase. *J. Chromatogr. Sci.* **1989**, *27*, 721–728, ISSN: 1615-9314.
- (37) McMurry, J. E., *Organic Chemistry*, 8. vyd.; Cengage Learning: Boston, 2008; 142-173, ISBN: 978-0-8400-5444-9.
- (38) Rice, J.; Proctor, K.; Lopardo, L.; Evans, S.; Kasprzyk-Hordern, B. Stereochemistry of Ephedrine and Its Environmental Significance: Exposure and Effects Directed Approach. *J. Hazard. Mater* **2018**, *348*, 39–46, ISSN: 03043894.
- (39) Subramanian, G., *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, 3. vyd.; Wiley-VCH: Weinheim ; New York, 2007, ISBN: 978-3-527-61173-7.
- (40) Maier, N. M.; Franco, P.; Lindner, W. Separation of Enantiomers: Needs, Challenges, Perspectives. *J. Chromatogr. A.* **2001**, *31*.
- (41) Alkadi, H.; Jbeily, R. Role of Chirality in Drugs: An Overview. *IDDT* **2018**, *18*, 88–95, ISSN: 18715265.
- (42) Lämmerhofer, M. Chiral Recognition by Enantioselective Liquid Chromatography: Mechanisms and Modern Chiral Stationary Phases. *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 814–856, ISSN: 00219673.
- (43) Patel, D. C.; Wahab, M. F.; Armstrong, D. W.; Breitbach, Z. S. Advances in High-Throughput and High-Efficiency Chiral Liquid Chromatographic Separations. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1467*, 2–18, ISSN: 00219673.
- (44) Lämmerhofer, M. Chiral Recognition by Enantioselective Liquid Chromatography: Mechanisms and Modern Chiral Stationary Phases. *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 814–856, ISSN: 00219673.

- (45) Scriba, G. K. Chiral Recognition in Separation Science – an Update. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1467*, 56–78, ISSN: 00219673.
- (46) Schneider, H. Binding Mechanisms in Supramolecular Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3924–3977, ISSN: 1521-3773.
- (47) Levkin, P.; Maier, N. M.; Lindner, W.; Volker, S. A Practical Method for the Quantitative Assessment of Non-Enantioselective versus Enantioselective Interactions Encountered in Liquid Chromatography on Brush-Type Chiral Stationary Phase. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1269*, 270–278.
- (48) Toyo’oka, T. Resolution of Chiral Drugs by Liquid Chromatography Based upon Diastereomer Formation with Chiral Derivatization Reagents. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2002**, *54*, 25–56, ISSN: 0165022X.
- (49) Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Hatada, K. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenyl-carbamates of polysaccharides coated on silica gel. *Journal of the American Chemical Society*, *1984*, 5357–5359, ISSN: 1520-5126.
- (50) Chankvetadze, B. Recent Developments on Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases for Liquid-Phase Separation of Enantiomers. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1269*, 26–51, ISSN: 00219673.
- (51) Tang, M.; Zhang, J.; Zhuang, S.; Liu, W. Development of Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatographic Separation. *TrAC Trend. Anal. Chem.* **2012**, *39*, 180–194, ISSN: 01659936.
- (52) Yashima, E. Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparation. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 105–125, ISSN: 00219673.
- (53) Guo, J.; Wang, Q.; Xu, D.; Crommen, J.; Jiang, Z. Recent Advances in Preparation and Applications of Monolithic Chiral Stationary Phases. *TrAC Trend. Anal. Chem.* **2020**, *123*, 115774, ISSN: 01659936.
- (54) Biber, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E. Enzymatic Production of Cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 609–617, ISSN: 0175-7598, 1432-0614.
- (55) Frömring, K.-H.; Szejtli, J., *Cyclodextrins in Pharmacy*, OCLC: 751580132; Springer: Dordrecht; London, 2011, ISBN: 978-90-481-4242-2.

- (56) Mitchell, C.; Armstrong, D. in *Chiral Separations. Methods Mol. Biol.* 2008; sv. 243, s. 61–112, ISBN: 978-1-62703-263-6.
- (57) Zhou, M.; Long, Y.; Zhi, Y.; Xu, X. Preparation and Chromatographic Evaluation of a Chiral Stationary Phase Based on Carboxymethyl- $\beta$ -Cyclodextrin for High-Performance Liquid Chromatography. *Chin. Chem. Lett.* **2018**, *29*, 1399–1403, ISSN: 10018417.
- (58) Wang, Y.; Ong, T.-T.; Li, L.-S.; Tan, T. T. Y.; Ng, S.-C. Enantioseparation of a Novel “Click” Chemistry Derived Native  $\beta$ -Cyclodextrin Chiral Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 2388–2393, ISSN: 00219673.
- (59) Guo, Z.; Jin, Y.; Liang, T.; Liu, Y.; Xu, Q.; Liang, X.; Lei, A. Synthesis, Chromatographic Evaluation and Hydrophilic Interaction/Reversed-Phase Mixed-Mode Behavior of a “Click  $\beta$ -Cyclodextrin” Stationary Phase. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 257–263, ISSN: 00219673.
- (60) Teixeira, J.; Tiritan, M. E.; Pinto, M. M. M.; Fernandes, C. Chiral Stationary Phases for Liquid Chromatography: Recent Developments. *Molecules* **2019**, *24*, 865, ISSN: 1420-3049.
- (61) Li, Q.; Li, Y.-Y.; Zhu, N.; Gao, Z.-X.; Li, T.-J.; Zhou, T.; Ma, Y.-L. Preparation of Cyclodextrin Type Stationary Phase Based on Graphene Oxide and Its Application in Enantioseparation and Hydrophilic Interaction Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2018**, *46*, 1455–1463, ISSN: 18722040.
- (62) Xie, S.-M.; Yuan, L.-M. Recent Development Trends for Chiral Stationary Phases Based on Chitosan Derivatives, Cyclofructan Derivatives and Chiral Porous Materials in High Performance Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2019**, *42*, 6–20, ISSN: 16159306.
- (63) Hyun, M. H. Liquid Chromatographic Enantioseparations on Crown Ether-Based Chiral Stationary Phases. *J. Chromatogr. A.* **2016**, *1467*, 19–32, ISSN: 00219673.
- (64) Fernandes, C.; Tiritan, M. E.; Pinto, M. Small Molecules as Chromatographic Tools for HPLC Enantiomeric Resolution: Pirkle-Type Chiral Stationary Phases Evolution. *Chromatographia* **2013**, *76*, 871–897, ISSN: 0009-5893, 1612-1112.

- (65) Yu, R. B.; Quirino, J. P. Chiral Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography: Trends from 2017 to 2018. *TrAC Trend. Anal. Chem.* **2019**, *118*, 779–792, ISSN: 01659936.
- (66) Ward, T. J.; Farris III, A. B. Chiral Separations Using the Macrocyclic Antibiotics: A Review. *J. Chromatogr. A.* **2001**, *906*, 73–89, ISSN: 00219673.
- (67) Khan, N. A.; Hasan, Z.; Jung, S. H. Adsorptive Removal of Hazardous Materials Using Metal-Organic Frameworks (MOFs): A Review. *J. Hazard. Mater.* **2013**, *244-245*, 444–456, ISSN: 03043894.
- (68) Troyano, J.; Carné-Sánchez, A.; Avci, C.; Imaz, I.; Maspocho, D. Colloidal Metal–Organic Framework Particles: The Pioneering Case of ZIF-8. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 5534–5546, ISSN: 0306-0012, 1460-4744.
- (69) Liu, Y.; Xuan, W.; Cui, Y. Engineering Homochiral Metal-Organic Frameworks for Heterogeneous Asymmetric Catalysis and Enantioselective Separation. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 4112–4135, ISSN: 09359648.
- (70) Han, Z.; Shi, W.; Cheng, P. Synthetic Strategies for Chiral Metal-Organic Frameworks. *Chin. Chem. Lett.* **2018**, *29*, 819–822, ISSN: 10018417.
- (71) Zhang, J.; Chen, Z. Metal-Organic Frameworks as Stationary Phase for Application in Chromatographic Separation. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1530*, 1–18, ISSN: 00219673.
- (72) Chen, L.; Wang, X.; Lu, W.; Wu, X.; Li, J. Molecular Imprinting: Perspectives and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2137–2211, ISSN: 0306-0012, 1460-4744.
- (73) Daněk, A. Využití HPLC v chirálních separacích IV. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
- (74) ChemDraw 19.1., PerkinElmer Informatics, Inc.
- (75) Polavarapu, P. L., *Chiral Analysis: Advances in Spectroscopy, Chromatography and Emerging Methods*. 2. vyd.; Elsevier: 2018, ISBN: 978-0-444-64027-7.