

Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



## **Chirální separace klastrových sloučenin boru**

Diplomová práce

Kristýna Linková

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

Konzultant: Mgr. Ondřej Horáček

Hradec Králové, 2022

**Prohlášení autora:**

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Všechna 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 Hradci Králové dne

.....

### **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, připomínky a vstřícnost při vypracovávání diplomové práce. Dále chci poděkovat Mgr. Ondřeji Horáčkovi za pomoc a rady při provádění experimentů. A v neposlední řadě děkuji taky RNDr. Bohumíru Grünerovi, CSc za poskytnuté vzorky boranových klastrů.

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu GA UK 168120 a SVV 260 547.

# Abstrakt

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

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

**Kandidát:** Kristýna Linková

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

**Konzultant:** Mgr. Ondřej Horáček

**Název diplomové práce:** Chirální separace klastrových sloučenin boru

Atom boru má schopnost vytvářet tzv. elektron deficitní vazby, kdy se tři vazeb účastní pouze dva elektrony. Tato výrazná delokalizace elektronů nad třístředovou vazbou je pak zodpovědná za vznik trojrozměrných klastrů. Klastrové sloučeniny boru mají abiotický charakter a vyznačují se specifickými vlastnostmi, např. tepelnou a metabolickou stabilitou, vysokou lipofilitou a delokalizovaným negativním nábojem. V oblasti medicínální chemie jsou zkoumány jako vhodné izostery fenylové skupiny. Byly u nich pozorovány např. protirakovinná aktivita, schopnost inhibice HIV-proteáz a antirevmatoidní aktivita. Je nutné zmínit také jejich využití v záchytné neutronové terapii při léčbě nádorových onemocnění. Některé klastrové sloučeniny boru zkoumané jako nová potenciální léčiva jsou ale chirální, a proto je nezbytné k dalšímu rozšíření jejich použití ve farmacii a medicíně získat enantiomerně čisté látky. Dosavadní práce zaměřené na chirální separace boranových klastrů v naší vědecké skupině, byly provedeny pomocí HPLC. Kapilární elektroforéza je metoda komplementární k HPLC a její použití je vhodnou alternativou, např. pro kontrolu chirální čistoty. Tato diplomová práce se proto zabývá testováním vhodnosti různých derivátů cyklodextrinů jako chirálních selektorů pro enantioseparaci 17 vybraných klastrových sloučenin boru v nevodném prostředí a porovnáváním získaných hodnot s dříve dosaženými výsledky. Dále se práce věnuje sledování vlivu rozdílných experimentálních podmínek na chirální separaci analytů, konkrétně změně koncentrace octanu amonného, přídavku 3 % HFIP do základního elektrolytu, nástřiku na kratší konec kapiláry a změně napětí.

# Abstract

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

**Candidate:** Kristýna Linková

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

**Consultant:** Mgr. Ondřej Horáček

**Title of thesis:** Chiral separation of boron cluster compounds

The boron atom has the ability to form electro-deficient bonds, when only two electrons participate in the three bonds. Significant delocalization of electrons over the three-center bond is responsible for the formation of three-dimensional clusters. Boron cluster compounds have an abiotic character. They are characterized by their specific properties, such as thermal and metabolic stability, high lipophilicity and delocalized negative charge. These compounds are investigated as isosteric to phenyl group in the field of medicinal chemistry. They have anti-cancer activity, the ability to inhibit HIV-proteases and anti-rheumatoid activity. Furthermore, boron cluster compounds have been used in neutron capture therapy in the treatment of cancer. Some boron cluster compounds studied as new potential drugs are chiral, therefore it is necessary to get enantiomerically pure substances to further expand their use in pharmacy and medicine. The recent investigations in our research group have been focused on the chiral separation of boron clusters in HPLC. Capillary electrophoresis can be used as the alternative separation method to HPLC, e.g., in the methods concerning the enantiopurity of the studied sample. This diploma thesis focuses on testing the suitability of various cyclodextrin derivatives as chiral selectors for enantioseparation of 17 selected boron cluster compounds in a non-aqueous medium and compares the obtained outcomes with the results of previous studies. The thesis also deals with the effect of different separation conditions on the chiral separation of analytes, i.e., change in ammonium acetate concentration, addition of 3% HFIP to the background electrolyte, injection at the shorter end of the capillary and change in voltage.

## Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část .....	9
2.1. Kapilární elektroforéza .....	9
2.1.1. Instrumentace .....	9
2.1.2. Elektroforetická pohyblivost .....	10
2.1.3. Elektroosmotický tok (EOF) .....	11
2.1.4. Separační módy v CE .....	13
2.2. Nevodná kapilární elektroforéza.....	14
2.3. Chirální selektory .....	17
2.3.1. Makrocyclická antibiotika.....	17
2.3.2. Proteiny .....	18
2.3.3. Crown ethery .....	19
2.3.4. Ligand výměnné .....	20
2.4. Cyklodextriny .....	21
2.4.1. Struktura a vlastnosti.....	21
2.4.2. Výroba .....	23
2.4.3. Tvorba inkluzních komplexů .....	23
2.4.4. Cyklodextriny v NACE.....	24
2.5. Chirální separace klastrových sloučenin boru .....	25
3. Cíl práce .....	28
4. Experimentální část.....	29
4.1. Použité přístroje, pomůcky a chemikálie.....	29
4.2. Seznam testovaných látek.....	30
4.3. Příprava vzorků, pufrů a základních elektrolytů.....	33
4.3.1. Vzorky .....	33

4.3.2.	Základní elektrolyty .....	33
4.4.	Experimentální podmínky .....	34
5.	Výsledky a diskuze .....	34
5.1.	Výběr vhodného rozpouštědla analytů .....	34
5.2.	Methylované cyklodextriny .....	35
5.2.1.	Vliv koncentrace Me- $\beta$ -CD na chirální separaci .....	35
5.2.2.	Vliv koncentrace Me- $\alpha$ -CD na chirální separaci .....	38
5.2.3.	Vliv koncentrace Me- $\gamma$ -CD na chirální separaci .....	39
5.2.4.	Porovnání methylovaných cyklodextrinů .....	41
5.3.	Vliv koncentrace acetyl- $\beta$ -CD na chirální separaci .....	41
5.4.	Vliv koncentrace 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD na chirální separaci .....	42
5.5.	Optimalizace .....	44
5.6.	Změna koncentrace octanu amonného .....	44
5.7.	Přídavek 3 % HFIP do základního elektrolytu .....	46
5.8.	Nástřík na kratší konec kapiláry .....	47
5.9.	Změna napětí .....	49
5.10.	Porovnání dosažených výsledků ve vodném a nevodném prostředí .....	51
6.	Závěr .....	52
7.	Seznam použitých zkratk .....	53
8.	Seznam použité literatury .....	54

# 1. Úvod

V achirálním prostředí mají enantiomery stejné fyzikálně-chemické vlastnosti (kromě stáčení roviny polarizovaného světla) a chovají se identicky, přesto je musíme brát jako různé chemické entity. Vnitřní prostředí všech živých organismů na zemi je chirální, a právě proto často dochází k preferenci jednoho konkrétního izomeru (L-aminokyseliny, D-sacharidy). Každý enantiomer může reagovat odlišně s chirálními cíli jako jsou např. receptory, iontové kanály nebo enzymy a v důsledku toho může mít také rozdílné farmakologické účinky a toxicitu. Z tohoto důvodu, pokud se nejedná o racemickou směs, je dnes kladen velký důraz na chirální čistotu léčiv a pozornost je také věnována vývoji separačních technik, díky nimž lze zvýšit bezpečnost a účinnost léčiv. [1,2]

V dnešní době je dostupné velké množství chromatografických metod využívaných pro chirální separace, mezi které patří plynová chromatografie (GC), superkritická fluidní chromatografie (SFC) a v neposlední řadě je nutné zmínit také nejčastěji používanou metodu, kterou je bezesporu vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). V posledních desetiletích se ale do popředí dostává také kapilární elektroforéza (CE) jako vhodná alternativa k HPLC. Kapilární elektroforéza má oproti HPLC několik výhod jako např. velmi malé množství vzorku, jednoduchost, velká flexibilita, různé separační mechanismy a další. Nevýhodou naopak může být nižší koncentrační citlivost a horší robustnost. V minulosti se CE ukázala jako velmi vhodná metoda pro enantioseparaci klastrových sloučenin boru. [2,3,36]

Tato práce se zabývá testováním a porovnáváním různých cyklodextrinů jako chirálních selektorů k rozdělení klastrových sloučenin boru pomocí nevodné kapilární elektroforézy. Následně také sleduje vliv rozdílných separačních podmínek na chirální rozdělení analytů.



## 2. Teoretická část

### 2.1. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza patří mezi separační elektromigrační techniky, která umožňuje dělení nabitých iontů analytu v stejnosměrném elektrickém poli. Princip separace v CE je založen na odlišné rychlosti pohybu analytů v kapiláře, tato rychlost nezávisí jen na velikosti vloženého napětí, ale také na prostředí, ve kterém separace probíhá a v neposlední řadě též na tvaru a velikosti molekuly analytu. [4]

V posledních letech roste význam CE v chirálních separacích především díky jejím výhodným vlastnostem a komplementaritě s HPLC. Mezi velké přednosti CE patří krátký čas potřebný pro analýzu, vysoká účinnost separace, velmi nízká spotřeba činidel a vzorků. Dále je také nutné zmínit velké množství dostupných chirálních selektorů a jejich vysokou flexibilitu, kdy lze snadno měnit jak koncentraci, tak i samotný chirální selektor (CHS) a dochází tedy ke snížení nákladů vznikajících při využívání chirálních chromatografických kolon u HPLC. [3,5]

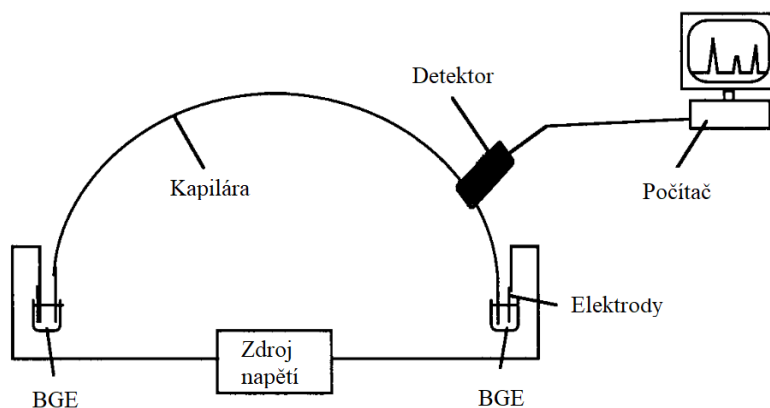
#### 2.1.1. Instrumentace

Nespornou výhodou CE je jednoduchost její instrumentace. Hlavní součástí je kapilára, ve které probíhá samotná separace. Ta je naplněna roztokem základního elektrolytu (BGE) a oba její konce jsou ponořeny do zásobníků s BGE (Obrázek 1). V zásobnících elektrolytů jsou také ponořeny dvě elektrody, na které je přivedeno stejnosměrné elektrické napětí čímž vzniká elektrické pole. [6,7]

Nejčastěji používanou kapilárou je kapilára křemenná, která pro zvýšení pevnosti bývá potažena tenkou polyamidovou vrstvou. Vnitřní průměr kapiláry se pohybuje od 10 do 200  $\mu\text{m}$ , nejčastěji se ovšem používají kapiláry s průměry 25, 50 a 75  $\mu\text{m}$ . Délka kapiláry je pak 25–100 cm a vnitřní povrch může být modifikována pro pozměnění separačních vlastností. [4,7]

Dávkování vzorku většinou probíhá na vzdálenějším konci kapiláry od detektoru, a to buď hydrodynamicky (pomocí tlaku) nebo elektrokineticky (pomocí elektrického proudu). Výhodou je, že v CE stačí velmi malá množství vzorku a obecně lze říct, že by délka vzorku neměla přesáhnout 2% délky kapiláry, aby byla zachována vysoká účinnost separace. [4,7]

Vzhledem k velmi malým dávkovaným množstvím vzorků a malé tloušťce kapiláry musí být detektory používané v CE velice citlivé. Nejvíce rozšířeným typem je UV-VIS detektor, to z důvodu jeho relativní necitlivost na změny teploty a gradientu, a pak také kvůli velkému množství látek jež absorbují záření v UV oblasti. Dalšími používanými detektory jsou fluorescenční a vodivostní, mezi novější pak patří hmotnostní detektory a detektory s laserem indukovanou fluorescencí. [4,7]



Obrázek č. 1: Instrumentace CE, převzato a upraveno z [4]

### 2.1.2. Elektroforetická pohyblivost

Základem separace v CE je rozdílná rychlost pohybu molekul v elektrickém poli, tedy jejich různá elektroforetická pohyblivost (nebo také elektroforetická mobilita). Rychlost pohybu analytu v BGE lze vyjádřit jako součin jeho pohyblivosti a intenzity elektrického pole (Rovnice 1). Kdy intenzita pole odpovídá podílu vkládaného napětí a délky kapiláry. [4,8]

$$v = \mu \times E \quad (1)$$

$v$  – rychlost pohybu částice;  $\mu$  – elektroforetická pohyblivost;  $E$  – intenzita elektrického pole

Elektroforetická pohyblivost je závislá nejen na náboji a velikosti částice, ale také na viskozitě elektrolytu. Jak je možné vyčíst z Rovnice 2, čím větší má molekula analytu náboj a čím menší je její velikost a viskozita elektrolytu, tím vyšší bude elektroforetická pohyblivost, a tím rychleji se pohybuje. [8]

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

$q$  – náboj iontu;  $\eta$  – viskozita prostředí;  $r$  – poloměr iontu

Rychlost pohybu iontů je závislá také na stupni jejich disociace. Běžně uváděné hodnoty elektroforetické pohyblivosti v literatuře, někdy také označované jako limitní pohyblivost jsou tabelovány pro 25 °C a platí pro úplně disociované molekuly v nekonečně zředěném roztoku. Po zahrnutí stupně disociace molekuly získáme tzv. efektivní pohyblivost, která se vypočítá jako součin elektroforetické pohyblivosti a stupně disociace (Rovnice 3). Výhodou je, že stupeň disociace molekul analytu, a tedy i rychlost pohybu molekul lze ovlivnit úpravou pH základního elektrolytu. [4,7]

$$\mu_{EF} = \alpha \times \mu \quad (3)$$

$\mu_{EF}$  – efektivní elektroforetická pohyblivost;  $\alpha$  – stupeň disociace molekuly

### 2.1.3. Elektroosmotický tok (EOF)

V kapilárách vyrobených z křemene vzniká díky silanolovým skupinám na jejich vnitřním povrchu elektroosmotický tok, který je hlavní hybnou silou CE. Po naplnění kapiláry elektrolytem (pufrem s pH vyšším než 4) dochází k disociaci těchto kyselých silanolových skupin a vzniká tak vrstva nesoucí záporný náboj. Na ni nasedá nepohyblivá tzv. Sternova vrstva, která je tvořena kationty z roztoku elektrolytu a je přitahována stěnou kapiláry. Tyto dvě vrstvy spolu tvoří tzv. elektrickou dvojvrstvu (Obrázek 2). Poslední, třetí vrstvou, je volná difuzní vrstva, jejíž kationty se po vložení napětí pohybují směrem ke katodě a svým pohybem unášejí i ostatní částice obsažené v elektrolytu. [4,7,9]

Vzniká tak elektroosmotický tok, někdy také označovaný jako elektroosmóza nebo elektroendoosmóza, který je dostatečně silný na to, aby ke katodě putovaly i neutrální látky a anionty. EOF unášejí všechny ionty přítomné v roztoku elektrolytu stejnou rychlostí, výsledná rychlost pohybu jednotlivých iontů je ale různá. Rychlost migrace je nejvyšší u malých molekul kationtů, protože se samy pohybují ke katodě, a navíc jsou ještě urychleny EOF. Dále se rychlost postupně snižuje přes neutrální částice, které se v elektrickém poli nepohybují a jsou tedy jen unášeny pomocí EOF, až k velkým molekulám aniontů, které sice putují k anodě, ovšem díky vyšší síle EOF jsou unášeny ke katodě. [4,8,10]

Mezi Sternovou vrstvou a difuzní vrstvou existuje rozdíl potenciálu nazývaný elektrokinetický potenciál nebo také *zeta* potenciál. Jak je patrné z Rovnice 4 rychlost EOF přímo souvisí s velikostí *zeta* potenciálu, kdy pomocí faktorů ovlivňující *zeta* potenciál lze ovlivnit i EOF. [4,8]

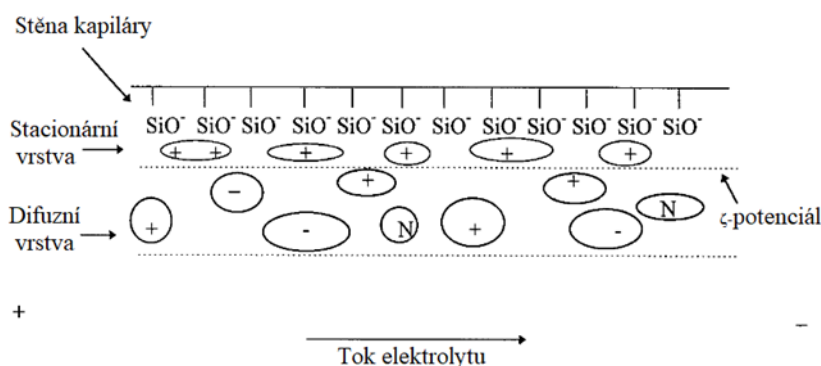
$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu}{\varepsilon} \quad (4)$$

$\zeta$  – *zeta* potenciál;  $\varepsilon$  – iontová síla elektrolytu

Prvním parametrem ovlivňujícím *zeta* potenciál je hodnota pH elektrolytu. Ovlivňuje, jaké množství silanolových skupin bude ionizováno, a tedy i povrchovou hustotu náboje na vnitřní straně kapiláry. Výrazné je EOF od pH 4, s dalším růstem pH se zvyšuje *zeta* potenciál a s ním i EOF. [4,8,10]

Dalším z ovlivňujících faktorů je pak iontová síla nebo také koncentrace elektrolytu, kdy se vzrůstající koncentrací BGE klesá *zeta* potenciál i EOF. Z tohoto důvodu se v CE používají nejčastěji pufrы o koncentraci 10 až 50 mM, ale je popsáno i využití koncentrací 100 až 500 mM a vyšších. Použití vyšších koncentrací je ale omezeno kvůli zahřívání kapiláry a omezené rozpustnosti. [10]

Významnou vlastností EOF a velkým rozdílem oproti toku mobilní fáze u HPLC je plochý profil průtoku, což je umožněno rovnoměrným rozptřením elektrické energie v kapiláře, kdy nedochází k žádnému poklesu tlaků u stěn kapiláry, jako je tomu u HPLC. To vede k menšímu rozostřování zón a tím i mnohem vyšší účinnosti separace. [10]



Obrázek č. 2: Elektrická dvojvrstva a elektroosmotický tok, převzato a upraveno z [4]

V případě potřeby lze elektroosmotický tok eliminovat nebo obrátit jeho směr pomocí modifikace stěny kapiláry. [10]

#### 2.1.4. Separační módy v CE

Kapilární elektroforéza je velice všestranná analytická metoda. Její univerzálnost je dána hlavně dostupností velkého množství separačních módů, které mají odlišné separační mechanismy. Hlavními separačními módy jsou:

1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejjednodušší a bezpochyby nejčastěji využívanou metodou. Při separaci je využíván pouze jeden základní elektrolyt (BGE) a jednotlivé analyty se rozdělují podle své rozdílné elektroforetické pohyblivosti, která je závislá hlavně na velikosti molekuly a náboje látky při daném pH. V tomto módu je možná separace jak anionů, tak kationtů, ovšem neutrální látky se nedělí a jsou pouze unášeny EOF k detektoru. [8,10]
2. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je dalším rozšířeným separačním módem v CE. Jedná se o kombinaci elektroforézy a chromatografie a zároveň metodu, kdy je umožněno dělení jak nabitých, tak i neutrálních látek. Přidáním povrchově aktivních látek do roztoku pufru vznikají při překročení kritické micelární koncentrace micely, které tvoří v roztoku BGE pseudostacionární fázi s vnitřním hydrofobním a vnějším hydrofilním povrchem. Mezi tuto fázi a roztok elektrolytu se pak rozdělují neutrální látky podle své polaritě. [10]
3. Kapilární elektrochromatografii (CEC) lze považovat za miniaturizovanou analogii k HPLC. Separace probíhá v plněné kapilární koloně, oproti HPLC však není využíván k pohybu kapaliny přes kolonu tlak, ale stejnosměrný elektrický proud. Výhodou vedoucí k vyšší účinnosti separace je plochý profil průtoku a také absence zpětného tlaku kolony, což umožňuje použití menších částic sorbentu než u HPLC kolon. [8,10]
4. Kapilární gelová elektroforéza (CGE) slouží k separaci makromolekul jako jsou proteiny a nukleové kyseliny na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti. Makromolekuly bez gelu nejde rozdělit kvůli jejich velmi malému rozdílu specifického náboje (náboj vztažený na jednotku relativní molekulové hmotnosti). Před samotnou separací je nejdříve nutná denaturace makromolekul, která se provádí pomocí dodecylsulfátu sodného (SDS). Následuje separace analytu podle velikosti pomocí elektroforézy přes vhodný polymer, kdy dochází ke zpomalení rychlosti migrace. Toto zpomalení je pak přímo úměrné velikosti molekuly analytu. [8,10]

5. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) slouží hlavně pro dělení amfoterních látek (aminokyseliny, peptidy, proteiny) podle rozdílné hodnoty jejich izoelektrického bodu. CIEF lze použít k oddělení proteinů, které se liší o  $\approx 0,005$  jednotek pI. V kapiláře je pomocí stejnosměrného elektrického proudu vytvořen gradient pH ve směsi amfolytů tvořících základní elektrolyt. Analyty migrují do doby, než se dostanou do oblasti s pH shodným s jejich pI, kde se jejich pohyb zastaví a dochází ke koncentrování v dané oblasti. Poté je nutné provést mobilizaci zón a dostat tak jednotlivé analyty k detektoru, to se provádí buď hydrodynamickým tokem, nebo elektroelucí. [8,10]
6. Kapilární izotachofóza (CITP) využívá k separaci systém dvou elektrolytů s rozdílnou pohyblivostí. Během jedné analýzy mohou být separovány buď kationty nebo anionty, ale nelze stanovovat obojí v rámci jedné analýzy. Mezi elektrolyty označující se jako vedoucí a koncový je vložen vzorek, který musí mít nižší pohyblivost než vedoucí elektrolyt a zároveň vyšší pohyblivost než koncový elektrolyt. Po vložení elektrického proudu dojde k ustavení rovnováhy, kdy všechny zóny migrují stejnou rychlostí a díky samozaostřujícímu efektu mají velmi ostrá rozhraní. [8,10]

## 2.2. Nevodná kapilární elektroforéza

I když je voda stále nejběžněji používaným rozpouštědlem v kapilární elektroforéze, získává si nevodná kapilární elektroforéza (NACE) v posledních pár desítkách let stále větší pozornost. Použití NACE má oproti klasické CE několik výhod. Mezi ty hlavní patří vyšší selektivita a účinnost separace, možnost analyzovat látky špatně rozpustné ve vodě a lze také využít chirální selektory, které se jinak ve vodě obtížně rozpouští. Další výhodou je pak generování mnohem nižších proudů než ve vodné CE. Tyto proudy jsou dostatečné pro separaci a umožňují použití vyšších koncentrací elektrolytů. Nevodná rozpouštědla nebo jejich směsi dále umožňují potlačení nebo obrácení EOF, což může být žádoucí zvláště pro chirální separace. Díky vyšší těkavosti nevodných rozpouštědel oproti vodě je také výhodnější spojení NACE s MS, kvůli snadnější ionizaci analytů. [2,11,12]

Nejčastěji používanými organickými rozpouštědly pro NACE jsou díky své nízké viskozitě a dostatečné polaritě MeOH a ACN, případně směsi těchto dvou. Dalšími, méně

využívanými rozpouštědly jsou pak například formamid, *N*-methylformamid, *N,N*-dimethylformamid, dimethylsulfoxid a nitromethan. Vhodné rozpouštědlo musí splňovat několik podmínek. Musí mít nízkou těkavost, při laboratorní teplotě být ve stavu kapaliny, musí vykazovat vysokou rozpustnost elektrolytů i vzorků, dále rovněž dostatečně vysokou disociační konstantu a přiměřeně nízkou dielektrickou konstantu, což usnadňuje interakce mezi enantiomery a chirálními selektory. V neposlední řadě je důležitá také nízká viskozita, aby nedocházelo k přílišnému zpomalování separace. Z důvodu bezpečnosti je pak vhodné se v elektrolytu vyhnout všem hořlavým a toxickým rozpouštědlům. [2,11,12,13]

Jak již bylo nastíněno, nevodná kapilární elektroforéza může být při separaci chirálních látek vhodnou alternativou pro CE ve vodném prostředí. Aplikací NACE dochází k usnadnění použití chirálních selektorů s nízkou rozpustností ve vodě a nevodné prostředí může také zlepšit enantioseparaci u selektorů s nedostatečnou nebo nízkou enantioselektivitou ve vodných elektrolytech. Velmi důležitá je volba vhodného rozpouštědla, protože to značně ovlivňuje vazbu rozpuštěného analytu na chirální selektor. Podstatný je také výběr chirálního selektoru, vhodný selektor by měl být levný, rozpustný v organickém rozpouštědle, musí tvořit dočasné diastereomerní komplexy s enantiomery a neměl by absorbovat UV záření. Tvorba diastereomerních komplexů může být založena na několika mechanismech, jsou jimi: tvorba inkluzních komplexů a iontových párů, nebo kombinace obojího a nelze opomenout mechanismus výměny ligandů. Ve spojení s NACE byly vyzkoušeny různé typy CHS, nejčastěji využívané však jsou bezesporu nativní cyklodextriny a deriváty cyklodextrinů. V Tabulce 1 je uveden přehled nejčastěji používaných rozpouštědel a elektrolytů v chirální NACE. [2,13,14]

Tabulka č. 1: Organická rozpouštědla a elektrolyty používané v chirální NACE; (-)-DIKGA – (-)-2,3,4,6-dioxo-isopropyliden-2-keto-L-gulonová kys.; podrobnější informace lze nalézt ve zdroji [2]

Rozpouštědlo	Elektrolyt	Typy selektorů
Acetonitril (ACN)	Kys. octová (HAc) a Tween 20	kys. kafrsulfonová
ACN	Methansulfonová kys. a trimethylamin (TEA)	Der. $\beta$ -CD
ACN:methanol (MeOH) (70:30)	HAc a TEA	DNB-leucin
Ethanol (EtOH) nebo MeOH	LiOH, KOH, NaOH, CsOH nebo RbOH	(-)-DIKGA
EtOH:MeOH (20:80) a (60:40)	TEA a HAc	O-(tercbutylkarbamoyl)chinidin
EtOH:MeOH (60:40)	Amoniak (NH <sub>3</sub> ) a kys. kaprylová	chinin, chinidin, cinchokain, cinchonidin a jejich der.
EtOH:MeOH (60:40)	KOH	kys. Kafrsulfonová, (-)-DIKGA
EtOH:MeOH (60:40)	TEA a kys. kaprylová	der. chininu
Formamid (FA)	Octan amonný (NH <sub>4</sub> Ac) a HAc	Kvarterní amonná sůl $\beta$ -CD
FA	Kys. citronová, Tris a TEA	$\beta$ -CD
FA	Kys. citronová a Tris	Der. $\beta$ -CD, $\gamma$ -CD
FA	HAc a NaCl	$\beta$ -CD
FA a dimethylsulfoxid	Tetra-N-butylamoniumperchlorát	(+)-18-crown-6 tetrakarboxylová kys.
MeOH	NH <sub>4</sub> Ac, HAc a CuCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	L-prolin, L-isoleucin a Cu <sup>2+</sup>
MeOH	NH <sub>4</sub> Ac	chinin, der. $\alpha$ -, $\beta$ -CD
MeOH	NaOH	(-)-DIKGA
MeOH	Kys. fosforečná (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) a LiOH	Der. $\alpha$ -CD
MeOH	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a NaOH	Der. B-, $\gamma$ -CD
MeOH:dichlormethan	NH <sub>4</sub> Ac	N-benzylkarbonyl-L-prolin
N,N-dimethylformamid	Kys. citronová a Tris	$\gamma$ -CD, $\beta$ -CD a jeho der.



## 2.3. Chirální selektory

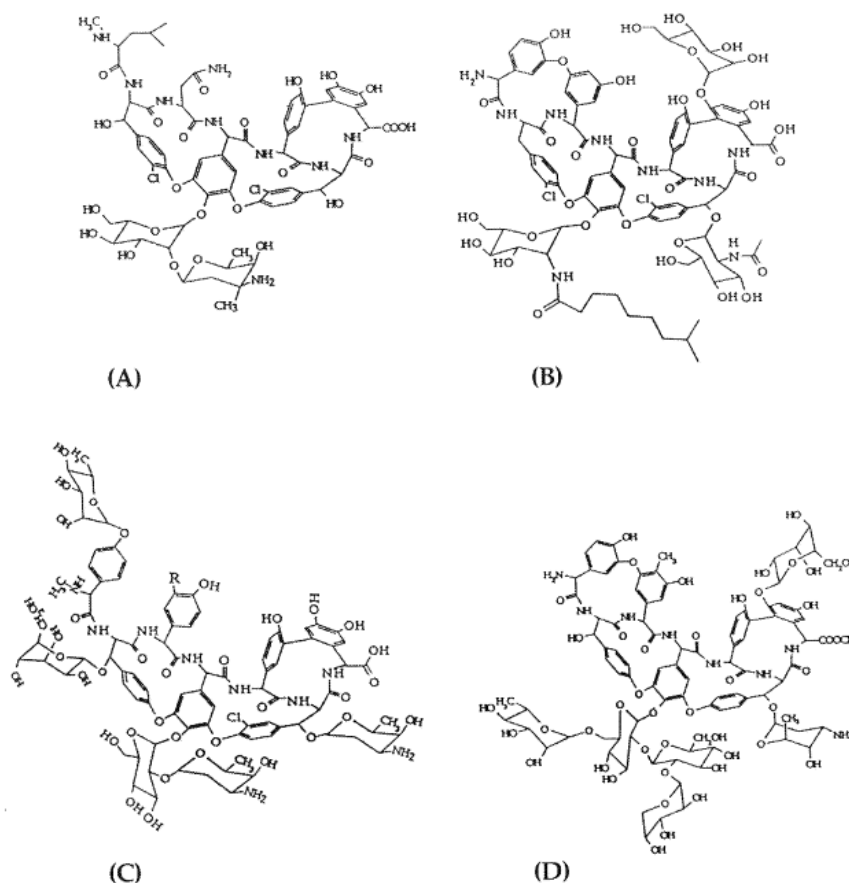
Pro chirální separace bylo vyzkoušeno mnoho různých elektromigračních metod a použito velké množství chirálních selektorů, buď byly přidávány jak do základního elektrolytu, nebo navázány například na stěnu kapiláry. K dobré chirální separaci je velmi důležitý výběr správného chirálního selektoru. Je nezbytné znát jakými mechanismy dochází k separaci enantiomerů a jaké druhy analytů jsou vhodné pro konkrétní selektor. [2,14]

### 2.3.1. Makrocyclická antibiotika

Makrocyclická antibiotika patří k významným chirálním selektorům, protože dokáží dobře separovat enantiomery velkého množství chirálních látek. Mezi zástupce této skupiny CHS patří avoparcin, vankomycin, ristocetin A, teikoplanin, derivát teikoplaninu hepta-tyr a další. Mohou být kyselé, zásadité i neutrální. [2,15]

Chemicky se jedná o makrocyclické glykopeptidy, kdy základem molekuly jsou aglykonovými částmi spojené makrocyclické kruhy připomínající charakteristický tvar košíku (Obrázek 3). Tento aglykonový koš se pak skládá buď ze 3, nebo ze 4 makrocyclů, podle konkrétní sloučeniny, na které jsou navázány sacharidové skupiny. Jednotlivá antibiotika se liší počtem a typem navázaných sacharidů, tyto cukry se mohou navíc volně otáčet a zaujímat různé orientace, což přispívá k rozdílným separačním vlastnostem jednotlivých antibiotik. Nevýhodou antibiotik je nižší citlivost, kvůli silné absorpci v UV oblasti při vlnových délkách běžně používaných v CE. [2,15,16]

Přítomnost řady různých funkčních skupin a velké množství asymetrických center, které se může pohybovat v rozmezí od 9 až do 38 u ristocentinu A, dává makrocyclickým antibiotikům vysokou schopnost enantioseparace. Dochází k řadě interakcí mezi analytem a selektorem zahrnující např. vodíkové vazby,  $\pi$ - $\pi$  interakce, hydrofobní, dipol-dipol, nebo repulzní síly, které umožňují vysokou selektivitu. [2,15,16]



Obrázek č. 3: Chemická struktura makrocyclických antibiotik: (A) vankomycin, (B) teikoplanin, (C) avoparcin, (D) ristocetin A, převzato z [15]

### 2.3.2. Proteiny

Proteiny jsou makromolekulární látky složené z aminokyselin (AMK), tyto AMK jsou chirální, a proto mají všechny bílkoviny chirální charakter. Pozornost byla této skupině selektorů věnována hlavně z důvodu jejich unikátních separačních vlastností a jejich vhodnosti pro separaci velkého množství chirálních směsí. [17] Patří zde albuminy, glykoproteiny, enzymy a další proteiny. Mezi nejčastěji využívané řadíme lidský sérový albumin (HSA), bovinní sérový albumin (BSA), z glykoproteinů je to kyselý  $\alpha$ 1-glykoprotein (AGP), ovomukoid (OMCHI) z kuřecích vaječných bílků, avidin (AVI) a riboflavin vázající protein (RfBP), z enzymů houbové celulózy, celobiohydroláza (CBH), pepsin a lysozym, z ostatních proteinů lze zmínit například kasein nebo lidský sérový transferin. [2,17]

Proteiny mají na svém povrchu velké množství vazebných míst a může tak dojít ke vzniku řady vazebných interakcí mezi selektorem a analytem. Separační mechanismus

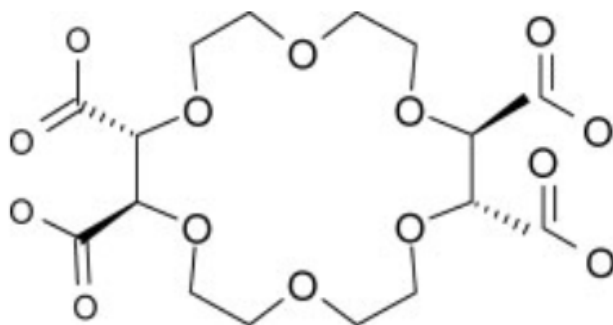
je stejně jako v případě jiných skupin CHS velmi komplexní, účastní se ho nejčastěji hydrofobní vazby, iontové vazby a vodíkové vazby. Separaci lze ovlivnit řadou faktorů, např. pH a iontová síla pufru, přidání organického modifikátoru nebo vytěšňovacího činidla jako koaditiva pro modifikaci selektivity, kdy se přidaná látka sama váže na protein a dochází tak ke změně síly vazby mezi analytem a proteinem. Další z faktorů ovlivňující separaci, který ale na rozdíl od předešlých lze experimentálně ovlivnit pouze pokud je protein rozpuštěn v BGE, je pak změna koncentrace proteinu. [2,17,18]

V CE se chirální separace s proteiny provádí ve dvou režimech. Prvním je tzv. režim afinitní kapilární elektrochromatografie (ACEC), kdy je protein imobilizován nebo absorbován na kapiláru, případně je kapilára naplněna silikagelem s navázaným imobilizovaným proteinem. Tento systém je velice podobný chirální stacionární fázi v HPLC, i v tomto případě dochází k separaci na principu rozdílné interakce jednotlivých enantiomerů s imobilizovanými proteiny. Druhým, častěji využívaným, režimem je tzv. afinitní elektrochromatografie (ACE), v tomto případě je protein rozpuštěn a je součástí základního elektrolytu. [2,17]

### **2.3.3. Crown ethery**

Crown ethery jako chirální selektory se používají především pro chirální separace sloučenin obsahujících primární aminoskupinu jako jsou například aminokyseliny, aminy nebo di- a tripeptidy. Byly ale také popsány případy chirální separace molekul sekundárních aminů. [14,19]

Struktura crown etheru (Obrázek 4) je tvořena heterocyklem, který se skládá z opakujících se jednotek ethylenoxidu ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ), počet těchto jednotek pak určuje velikost crown etheru a jeho kavity. Unikátní vlastností crown etherů je jejich schopnost silně vázat kationy. Tyto jejich vlastnosti jsou důležité pro chirální separaci enantiomerů a vznik diastereomerních komplexů mezi CHS s analytem. Předpokládá se, že mechanismus interakce je založen na vzniku vodíkových vazeb mezi amoniovým kationem a kyslíky crown etheru. [14,19,20]

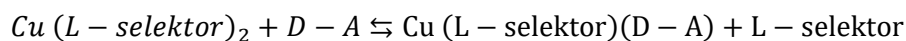
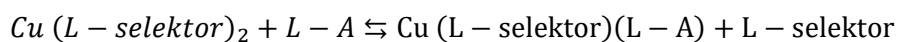


Obrázek č. 4: Struktura crown etheru, převzato z [19]

### 2.3.4. Ligand výměnné

Ligand výměnné chirální selektory vznikají přidáním ligandu a centrálního iontu do základního elektrolytu, kde interakcí s analytem vznikají komplexy a dochází tak k chirální separaci. Pro své vlastnosti jsou nejvíce využívány jako centrální ionty  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ , ale své uplatnění našly i jiné kovové ionty, např.  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Co}^{2+}$ . Jako chirální selektory se pak používají aminokyseliny prolin, hydroxyprolin, isoleucin, lysin, arginin a další. [2,21]

Mechanismus chirální separace pomocí této skupiny chirálních selektorů je založen na reverzibilní tvorbě ternálních diastereomerních komplexů (Rovnice 5). Takový diastereomerní komplex je tvořen centrálním atomem a dvěma chirálními ligandy, ligandem analytu a selektoru. Následná enantioseparace je pak založena na rozdílné termodynamické stabilitě směsných komplexů mezi selektorem a oběma enantiomery a také na stupni afinity ligandu ke kovovému iontu. [2,21,22]



Rovnice č. 5: Rovnováha tvorby komplexů, A – analyt, převzato z [22]

Nevýhodou může být, že tento typ chirální separace je omezen na přítomnost specifických funkčních skupin obsažených jak v selektoru, tak i v analytu, mezi tyto skupiny patří aminové, hydroxylové nebo třeba karboxylové funkční skupiny. Z tohoto důvodu se tímto způsobem stanovují především aminokyseliny, oligopeptidy,  $\alpha$ -hydroxykyseliny a aminoalkoholy. [21,22]

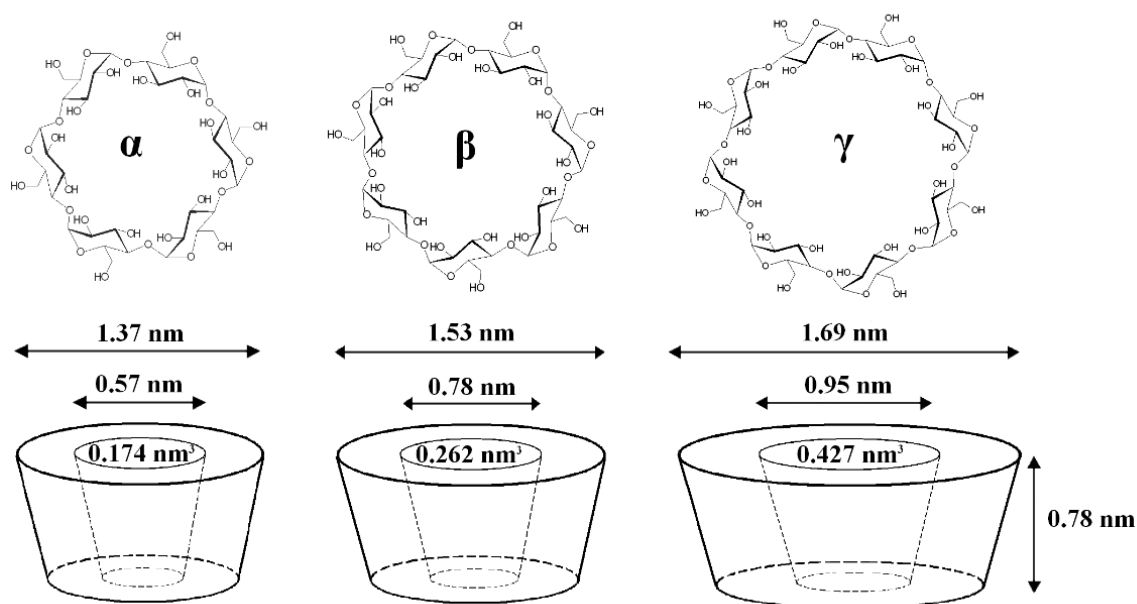
## 2.4. Cyklodextriny

### 2.4.1. Struktura a vlastnosti

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy, které se skládají z  $\alpha$ -D-glukopyranózových jednotek spojených 1,4-glykosidickými vazbami, kdy ke vzniku těchto CD dochází enzymatickou degradací škrobu pomocí enzymů cyklodextrin-glykosyltransferázy (CGTasa) a částečně  $\alpha$ -amylasy. Vlastnosti enzymu CGTasa velmi záleží na mikroorganismu, ze kterého byl získán. Poprvé byl využit ke štěpení škrobu tento enzym u bakterie *Bacillus amylobacter*, ale vyskytuje se také u jiných bakterií, např. u *Bacillus macerans*, *B. cereus*, *Clostridium* spp., *Krebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus* a dalších. [23,24,25,26]

Rozlišujeme tři základní druhy cyklodextrinů podle počtu glukózových jednotek v molekule:  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextriny.  $\alpha$ -Cyklodextriny ( $\alpha$ -CD) obsahují ve své molekule šest glukózových jednotek,  $\beta$ -cyklodextriny ( $\beta$ -CD) sedm a největší  $\gamma$ -cyklodextriny ( $\gamma$ -CD) se skládají z osmi jednotek. Molekuly běžných cyklodextrinů mají tvar dutého komolého kužele, kde navázané funkční skupiny ovlivňují jejich vlastnosti. Na užším okraji jsou navázané primární hydroxylové skupiny a na širším okraji sekundární. Naopak vnitřní kavita obsahuje uhlovodíkové řetězce a glykosidické kyslíkové můstky, které jí propůjčují hydrofobní vlastnosti. [24,25,27]

Jednotlivé skupiny CD mají odlišné velikosti molekuly, s narůstajícím počtem jednotek glukózy v molekule se zvětšuje nejen velikost celého CD, ale i šířka jeho vnitřní kavity, přičemž její hloubka zůstává ve všech případech stále stejná. Proto jsou  $\alpha$ -CD vhodné především pro separaci malých molekul analytů s jedním benzenovým jádrem v molekule,  $\beta$ -CD jsou nejúčinnější při separaci větších sloučenin se dvěma kruhy v molekule a  $\gamma$ -CD nachází uplatnění v separacích látek s třemi a více kruhy, kdy se často jedná o látky steroidní povahy. Na Obrázku 5 je znázorněna struktura, přibližné velikosti CD a přibližné objemy kavit jednotlivých CD. [2,24,27,28]



Obrázek č. 5: Struktura, přibližné velikosti a objemy kavity jednotlivých CD [24]

Pro své výhodné vlastnosti patří CD mezi nejčastěji využívané chirální selektory v kapilární elektroforéze. Hlavní předností je jejich univerzálnost, kdy neexistují prakticky žádná strukturální omezení analytů, tedy např. nutnost přítomnosti specifických funkčních skupin pro úspěšnou separaci. Další nespornou výhodou je také nízká pořizovací cena CD a schopnost tvořit inkluzní komplexy s velkým množstvím chirálních látek. [2,24,27,28]

Molekulu CD lze poměrně snadno modifikovat a tím pozměnit fyzikálně-chemické vlastnosti a především selektivitu. Každá glukózová jednotka v CD má tři volné OH skupiny a všechny mohou být derivatizovány hydrofilními i hydrofobními funkčními skupinami. Tím může dojít ke zlepšení rozpustnosti ve vodě i organických rozpouštědlech, změně velikosti kavity, změně chemické stability anebo ke změně komplexotvorných vlastností CD. Přehled fyzikálních vlastností jednotlivých typů CD je uveden v Tabulce 2. [2,27,30,31]

Tabulka č. 2: Fyzikální vlastnosti jednotlivých typů CD, převzato a upraveno z [27]

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Počet glukózových jednotek	6	7	8
Molekulová hmotnost [g/mol]	973	1135	1297
Výška molekuly [nm]	0,78	0,78	0,78
Šířka CD, strana sekundárních hydroxylů [nm]	0,57-1,37	0,68-1,53	0,95-1,69
Šířka CD, strana primárních hydroxylů [nm]	0,45-1,32	0,61-1,49	0,77-1,61
Objem kavity [nm <sup>3</sup> ]	0,174	0,262	0,427
Rozpustnost ve vodě při 25 °C [g/100 ml]	14,5	1,85	8,19

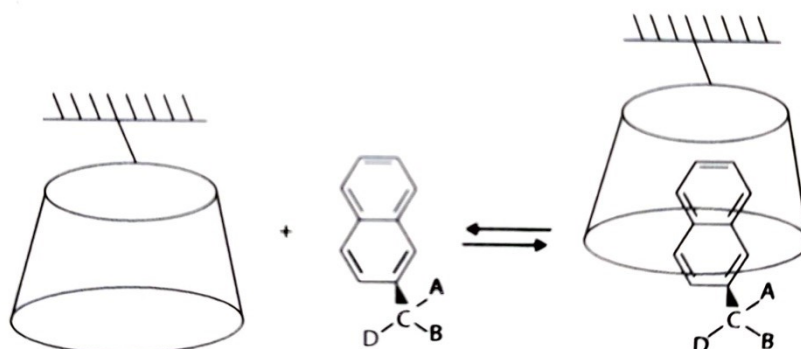
#### 2.4.2. Výroba

Proces výroby cyklodextrinů lze uskutečnit dvěma základními způsoby, tzv. procesem s rozpouštědlem a procesem bez rozpouštědla. V procesu s rozpouštědlem se přidává organické komplexotvorné činidlo (nejčastěji toluen, ethanol nebo aceton), které selektivně vysráží jeden konkrétní typ CD a usměrňuje enzymatickou reakci tak, aby produkovala hlavně tento druh CD. V procesu bez rozpouštědla se žádné komplexotvorné činidlo nepřidává a vzniká tak směs různých CD, kdy poměr jednotlivých CD závisí jen na použité CGTase a reakčních podmínkách. [25]

#### 2.4.3. Tvorba inkluzních komplexů

Pro chirální separace je základním mechanismem uplatňujícím se při chirálním rozpoznávání jednotlivých enantiomerů tvorba inkluzních komplexů (Obrázek 6). Tyto komplexy vznikají mezi analytem a cyklodextrinem, respektive kavitou CD, kdy objemná hydrofobní část analytu vniká do kavity. Naopak polární skupiny analytu v blízkosti centra chiralitity zůstávají vně CD a reagují s hydroxyskupinami přítomnými na jeho vnějším okraji. Za stabilitu takovýchto inkluzních komplexů zodpovídají různé nekovalentní vazby, jsou to např. van der Waalsovy síly, vodíkové vazby, interakce dipól-dipól a disperzní síly. Pro tvorbu inkluzního komplexu je důležitá geometrická

kompatibilita mezi dutinou CD a analytem, kdy musí být velikostně podobné. Čím větší je molekula analytu, tím pomalejší je tvorba a rozpad komplexu, což může vést ke zhoršení separace jednotlivých enantiomerů. [2,24,32,33]

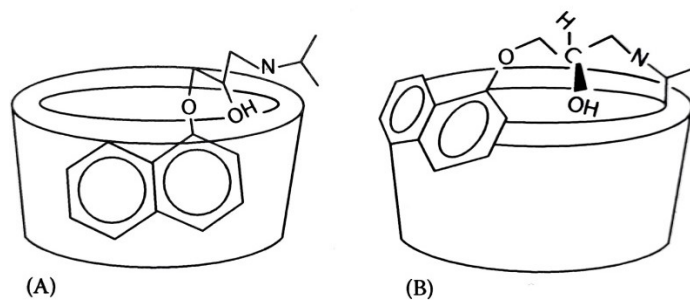


Obrázek č. 6: Vznik inkluzního komplexu analytu a CD, převzato z [2]

#### 2.4.4. Cyklodextriny v NACE

Mezi nejoblíbenější chirální selektor z řad cyklodextrinů patří  $\beta$ -CD, ten má však ve vodě velice nízkou rozpustnost, což může být problém. Proto je v některých případech výhodné použít organické rozpouštědlo (MeOH, ACN, formamid), kde je jeho rozpustnost mnohem vyšší a je možné dosáhnout vyšší koncentrace CHS v základním elektrolytu. Dalšími důvody k využití NACE může být také potlačení nechtěných interakcí se stěnou kapiláry nebo zesílení vazebných interakcí mezi analytem a cyklodextrinem. Vznik komplexů u CD je možný dvěma způsoby (Obrázek 7). Ve vodném prostředí je hlavní enantioseparační mechanismus založen na tvorbě inkluzních komplexů analyt/CD, oproti tomu v NACE je tvorba těchto komplexů většinou potlačena a ke vzniku komplexu dochází pomocí vodíkových vazeb a dipólových interakcí v blízkosti okraje CD. Takto vzniklé komplexy mají obecně nižší konstantu stability než inkluzní komplexy. [2,12,13,14]





Obrázek č. 7: Schéma dvou různých enantioseparačních mechanismů; (A) Inkluzní komplex ve vodném prostředí, (B) Komplex analyt/CD v nevodném prostředí, převzato z [2]

## 2.5. Chirální separace klastrových sloučenin boru

I když se bor vyskytuje v periodické tabulce prvků hned vedle uhlíku, nebyla jeho chemii věnována zdaleka taková pozornost. To se ale změnilo v posledních desítkách let. Atom boru má schopnost vytvářet tzv. elektrodeficitní vazby, kdy se tří vazeb účastní pouze dva elektrony. Tato výrazná delokalizace elektronů nad třířadovou vazbou je pak zodpovědná za vznik trojrozměrných klastrů a s tím souvisí i specifické vlastnosti takových sloučenin, mezi něž patří např. reakce s biomolekulami a usnadnění některých biologických reakcí, nízká chemická aktivita a další. Substitucí na takovýchto klastrech pak dochází ke vzniku chirálních sloučenin. Všechny tyto vlastnosti přispívají k využití klastrových sloučenin boru v medicíně. Výzkum se zaměřuje na jejich nově objevené účinky, např. protirakovinová aktivita, inhibice HIV-proteázy a antirevmatoidní vlastnosti. Další oblastí, kterou nelze opomenout je výzkum využití klastrů boru pro záchytanou neutronovou terapii (BNCT), při terapii nádorů (př. maligní nádory mozku, pokročilé nádory hlavy a krku). [34,35,36,37]

Na rozdíl od organických látek, které mají 1 nebo více center chiralit, u klastrových sloučenin boru je zodpovědný za vznik chirálních molekul substituent navázaný na klec klastru. Dochází tak ke vzniku molekuly se strukturální asymetrií a klastrová sloučenina je chirální jako celek. Chirální separace jednotlivých enantiomerů klastrových sloučenin boru je nezbytná pro další rozšíření jejich využití a existuje již několik prací zabývajících se chirální separací těchto klastrů pomocí HPLC. První úspěšnou HPLC chirální separaci dvanácti chirálních 11 vrcholových *nido*-karboranů popsal Plešek

a kol. v roce 1992, jako chirální stacionární fáze byl využit nativní CD přímo navázaný na silikagel a jako MF směs vody a org. rozpouštědla (methanol nebo acetonitril). Následně byla popsána separace dalších látek z 11vrcholové skupiny, dvou *nido*-karboranů pomocí acetylovaného  $\beta$ -CD ve 42% resp. 45% vodném methanolu jako MF (Grüner a kol., nepublikované výsledky). [36] Nedlouho poté následovala první separace pomocí SFC, Petersson a kol. v roce 1994 popsali chirální separaci karbonylalaninu, kdy tato sloučenina jako analog fenylalaninu byla zkoumána jako kandidát pro BNCT. Následovaly další úspěšné separace, celkem bylo pomocí HPLC popsáno asi 60 neutrálních sloučenin. Ve většině případů byly jako CSP využívány různé druhy chemicky vázaných nativních  $\beta$ -CD a acetyl- $\beta$ -CD. Byly zkoušeny i nativní  $\alpha$ -CD, ovšem bez výsledku. Naopak HPLC nebyla příliš účinná při chirální separaci klastrových aniontů boru, kdy byly odděleny pouze dvě látky se spojovacím můstkem tvořeným sírou nebo kyslíkem. Z důvodu neúspěchu chirálních separací aniontu v HPLC byla snaha rozdělit tyto látky pomocí kapilární elektroforézy. [36,38,39,40]

První chirální separaci klastrových aniontů boru popsal Slaviček a kol. v roce 2003, kdy chirálním selektorem byl zvolen nativní  $\beta$ -CD, jako pufr byla zvolena 20 mM 3-(*N*-morfolino)propansulfonová nebo orthofosforečná kyselina upravena na pH 7 a rozpouštědlem byl vodný methanol nebo vodný acetonitril, protože v čistě vodném rozpouštědle jsou interakce mezi selektorem a analytem příliš silné. Podařilo se chirálně separovat všech 10 stanovovaných sloučenin. Zároveň ale bylo zjištěno, že chirální separace se účastní i jiné vazebné interakce, než v případě separace organických sloučenin a nelze proto pravidla organické chemie jednoduše aplikovat na klastrové sloučeniny. [41] Následně v roce 2004 Horáková a kol. publikovali možnosti zlepšení detekční citlivosti a zónové symetrie při separaci sloučenin tvořených jedním klastrem s alespoň jedenácti vrcholy, bez navázaných funkčních skupin a jejich kobaltových komplexů. Jako selektor byl využit  $\beta$ -CD a v případě BGE byla zvolena směs methanol-voda a acetonitril-voda. Bylo zjištěno, že v případě použití BGE s acetonitrilem dochází po čase k poklesu pohyblivosti klastrových aniontů boru, v případě methanolu toto pozorováno nebylo. [36,42] V roce 2007 Horáková a kol. publikovali dva články zabývající se možným využitím i dalších nativních CD jako jsou  $\alpha$ - a  $\gamma$ -CD. Základním elektrolytem byla kyselina boritá upravená na pH 9 s přídavkem methanolu (30 až 75 %). První studie byla provedena se sadou derivátů 7,8-*nido*-dikarbaundekaborátových klastrů.  $\alpha$ -CD byl schopný rozdělit pouze klastry obsahující jen malé substituenty,  $\beta$ -CD

byl oproti tomu vhodný pro separaci všech strukturních typů, ovšem účinnost separace byla v obou případech nižší než při nepřítomnosti CD v BGE. Dále se ukázalo, že  $\gamma$ -CD není vhodný chirální selektor, protože při jeho použití dochází k neustálému snižování mobilit a jejich rozdílů. V druhé studii byla pozornost zaměřena na využití  $\alpha$ -CD jako chirálního selektoru a byly doplněny další anionty s více substituenty. Tyto studie ukázaly, že schopnost  $\alpha$ -CD rozdělit jednotlivé enantiomery závisí na typu substituentu, jeho velikosti a počtu, ale také na atomu klastru, ke kterému je konkrétní substituent navázán. [43,44]

### 3. Cíl práce

Cílem této práce bylo prozkoumat vhodnost methylovaného  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD, acetyl- $\beta$ -CD a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD jako chirálních selektorů pro separaci 17 aniontových klastrových sloučenin boru v nevodném prostředí.

Po systematickém screeningu provést optimalizaci elektroforetických podmínek s cílem dosáhnout co nejlepší chirální separace zkoumaných látek.

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité přístroje, pomůcky a chemikálie

#### 4.1.1. Přístroje:

- Elektroforetický analyzátor CE 7100, Agilent Technologies, Německo
- MicroSolv Window Maker, MicroSolv Technology Corporation, USA
- Křemenná kapilára, průměr 75  $\mu\text{m}$ , celková délka 60 cm, efektivní délka 51,6 cm, Polymicro Technologies, USA
- Analytické váhy Kern, Unipro-Alpha, Česká republika
- Ultrazvuková lázeň, Ecoson, Česká republika

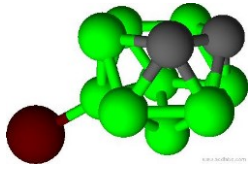
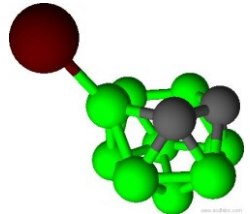
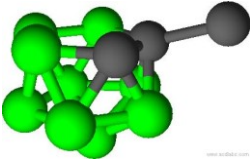
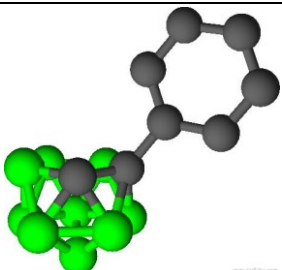
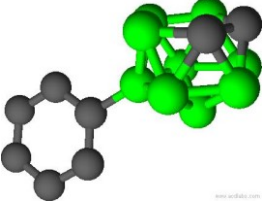
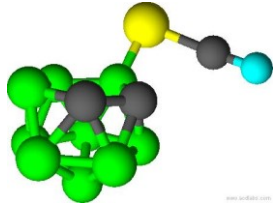
#### 4.1.2. Pomůcky:

- Kádinky, odměrné baňky, Erlenmeyerovy baňky, automatické pipety, vialky, stříkačkové filtry (0,45  $\mu\text{m}$ , polyvinylidenfluorid, Fisher Scientific, USA)

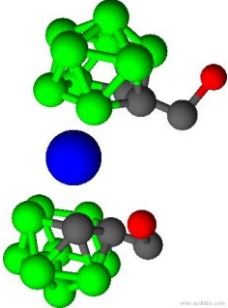
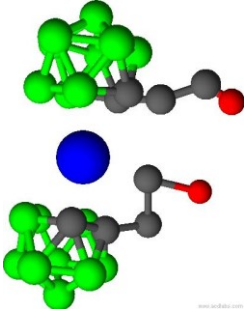
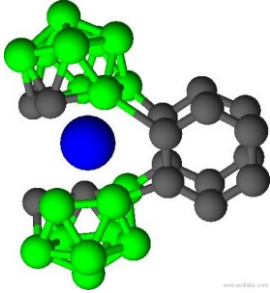
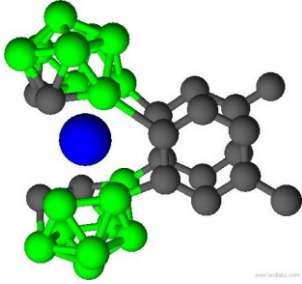
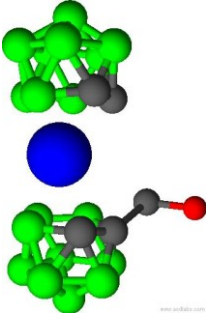
#### 4.1.3. Chemikálie:

- Methanol pro HPLC (MeOH), acetonitril (ACN) – VWR Chemicals, USA
- Chlorid sodný (NaCl), čištěná voda (Merck-Millipore) – Merck, Německo
- Kyselina fosforečná ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), hydroxid sodný (NaOH) – Penta, Česká republika
- Octan amonný ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ), hexafluoropropan-2-ol (HFIP) – Sigma-Aldrich, USA
- Me- $\beta$ -cyklodextrin, Me- $\alpha$ -cyklodextrin, Me- $\gamma$ -cyklodextrin, Acetyl- $\beta$ -cyklodextrin, (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -cyklodextrin – Cyclolab, Maďarsko

## 4.2. Seznam testovaných látek

Název	Chemický vzorec sloučeniny	Model molekuly
E1	[5-Br-7,8- <i>nido</i> -C <sub>2</sub> B <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ]Cs	
9E1	[9-Br-7,8- <i>nido</i> -C <sub>2</sub> B <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ][(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> N]	
E2	[7-Me-7,8- <i>nido</i> -C <sub>2</sub> B <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ]Cs	
E4	[7-Ph-7,8- <i>nido</i> -C <sub>2</sub> B <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ][(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> N]	
5E4	[5-Ph-7,8- <i>nido</i> -C <sub>2</sub> B <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ]Cs	
E5	[9-NCS-7,8- <i>nido</i> -C <sub>2</sub> B <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ]Cs	

E6	$[9\text{-MeS-}7,8\text{-nido-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]^-\text{Cs}^+$	
ZW	$9\text{-Me}_2\text{S-}7,8\text{-nido-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}$	
F9	$[6,6'\text{-}\mu\text{-S-(1,7-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2\text{-}2,2'\text{-Co}]^-\text{Cs}^+$	
H2NEt	$1\text{-(H}_2\text{NC}_2\text{H}_4)_2\text{-Co(1,2-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2$	
HOEt	$[1\text{-(HOC}_2\text{H}_4)\text{-Co(1,2-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2][(\text{CH}_3)_3\text{NH}]$	
HOPr	$[1\text{-(HOC}_3\text{H}_6)\text{-Co(1,2-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2][(\text{CH}_3)_3\text{NH}]$	

(HOMe) <sub>2</sub>	$[1,1'-(\text{HOCH}_2)_2\text{-Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2][(\text{CH}_3)_3\text{NH}]$	
(HOEt) <sub>2</sub>	$[1,1'-(\text{HOC}_2\text{H}_4)_2\text{-Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2][(\text{CH}_3)_3\text{NH}]$	
bisPhe	$[8,4',8',4\text{-}\mu\text{-bis}(\text{Phe})_2\text{-Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2]\text{Na}$	
bisTol	$[8,4',8',4\text{-}\mu\text{-bis}(\text{Tol})_2\text{-Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2]\text{Cs}$	
HOMe	$[1\text{-(HOCH}_2\text{)-Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2][(\text{CH}_3)_3\text{NH}]$	

Tabulka č. 3: Systematické názvy a 3D modely analytů; šedá-C, zelená-B, hnědá-Br, světle modrá-N, žlutá-S, červená-O, tmavě modrá-Co; vytvořeno v [45]



## 4.3. Příprava vzorků, pufrů a základních elektrolytů

### 4.3.1. Vzorky

Vzorky byly připraveny navážením 0,5 mg látek z tabulky 3 a jejich následným rozpuštěním v 0,5 ml methanolu pomocí ultrazvukové lázně. Vzniklý roztok byl poté přefiltrován přes stříkačkový filtr. 100  $\mu$ l roztoku vzorku bylo naředěno 400  $\mu$ l roztoku octanu amonného v methanolu v poměru 1:4 (v/v) na výslednou koncentraci 0,1 mg/ml. Vzorky byly uchovávány v lednici.

### 4.3.2. Základní elektrolyty

Byly připraveny celkem 4 methanolicke roztoky octanu amonného o 4 různých koncentracích (25, 50, 100 a 200 mM).

Odpovídající množství octanu amonného bylo rozpuštěno v methanolu a následně kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku.

Následně byly připraveny základní elektrolyty s různými deriváty CD jako CHS s odlišnými koncentracemi octanu amonného i CD.

1. 200mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + 37,9mM Me- $\beta$ -CD (BGE 1)
2. 100mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + Me- $\beta$ -CD o různých koncentracích (1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 37,9, 40, 50 a 60 mM) (BGE 2)
3. 100mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + Me- $\alpha$ -CD o různých koncentracích (1, 10, 20, 30 a 50 mM) (BGE 3)
4. 100mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + Me- $\gamma$ -CD o různých koncentracích (1, 10, 20 a 30 mM) (BGE 4)
5. 100mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + acetyl- $\beta$ -CD o různých koncentracích (1, 10, 20 a 30 mM) (BGE 5)
6. 100mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD o různých koncentracích (1, 10, 20 a 30 mM) (BGE 6)

Všechny BGE byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství příslušného CD v metanolicím roztoku octanu amonného v 5ml odměrné baňce a doplněn stejným roztokem po rysku. V rámci optimalizace byl u některých analýz použit při přípravě BGE metanolicí roztok octanu amonného o nižší koncentraci (50 a 25 mM).

U série analýz byly k BGE přidány 3 % HFIP.

#### **4.4. Experimentální podmínky**

K měření byly využity křemenné kapiláry s vnitřním průměrem 75  $\mu\text{m}$ , celkovou délkou 60 cm a efektivní délkou 51,6 cm. Před první analýzou byla vždy kapilára kondicionována 30 minut 0,1M NaOH, 2 minuty vodou, 30 minut 0,1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 2 minuty vodou. Každý den byla kapilára před první analýzou propláchnuta 20 minut vodou, 10 minut MeOH a 10 minut BGE. Po poslední analýze dne následoval proplach 10 minut MeOH a 10 minut vodou. Mezi každou analýzou byla kapilára vždy proplachována 5 minut methanolem a 5 minut základním elektrolytem. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky, rozdílem tlaků 60 mbar po dobu 4 s. Kapilára byla temperována na 25°C. Pro většinu analýz bylo na kapiláru vkládáno napětí -25 kV. Detekce pomocí UV/vis detektoru probíhala u *nido*-karboranů při vlnové délce 210 nm, pro cosany byla použita ještě detekce při 290 nm.

### **5. Výsledky a diskuze**

#### **5.1. Výběr vhodného rozpouštědla analytů**

Výběr vhodného rozpouštědla se testoval na analytu E2. Jako základní elektrolyt byl použit octan amonný s přídavkem Me- $\beta$ -CD jako CHS (BGE 1). Vzorek E2 byl postupně rozpuštěn v acetonitrilu, methanolu, MeOH s přídavkem 10 mM NaCl, MeOH s přídavkem 200 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  a MeOH s přídavkem BGE 1. U všech takto připravených vzorků byl naměřen přibližně stejný migrační čas, rozlišení i další parametry (Tabulka 4). Podle dosažených výsledků bylo zhodnoceno, že rozpouštědlo vzorku nemá zásadní vliv na chirální separaci a na základě tohoto zjištění byl pro všechny další analýzy vybrán jako rozpouštědlo vzorku methanol. V průběhu měření bylo také zjištěno, že koncentrace pufru 200 mM v základním elektrolytu je příliš vysoká a dochází k ucpávání kapiláry. Z tohoto důvodu byla koncentrace pufru pro další analýzy snížena na 100 mM.

Tabulka č. 4: Vliv rozpouštědla vzorku na chirální separaci

Analyt	Chirální separace	Migrační čas 1	Rs	w50	Selektivita	Tailing
E2 ACN	ano	12,69	1,51	0,112	1,02	1,60
E2 MeOH	ano	12,75	1,51	0,114	1,02	1,75
E2 MeOH + 10 mM NaCl	ano	13,05	1,49	0,119	1,02	1,95
E2 MeOH + 200 mM NH <sub>4</sub> Ac	ano	13,40	1,01	0,183	1,02	1,23
E2 MeOH + BGE 1	ano	13,41	1,36	0,131	1,02	1,31

Vliv nižší koncentrace octanu amonného na separaci bylo testováno v BGE 2, při zachování stejné koncentrace CHS jako v BGE 1, tedy 37,9 mM Me-β-CD. Při nižší koncentraci octanu amonného již nedocházelo k ucpávání kapiláry. V Tabulce 5 naleznete srovnání parametrů pro vzorek E2 při obou koncentracích octanu amonného.

Tabulka č. 5: Parametry E2 při rozdílných koncentracích pufru

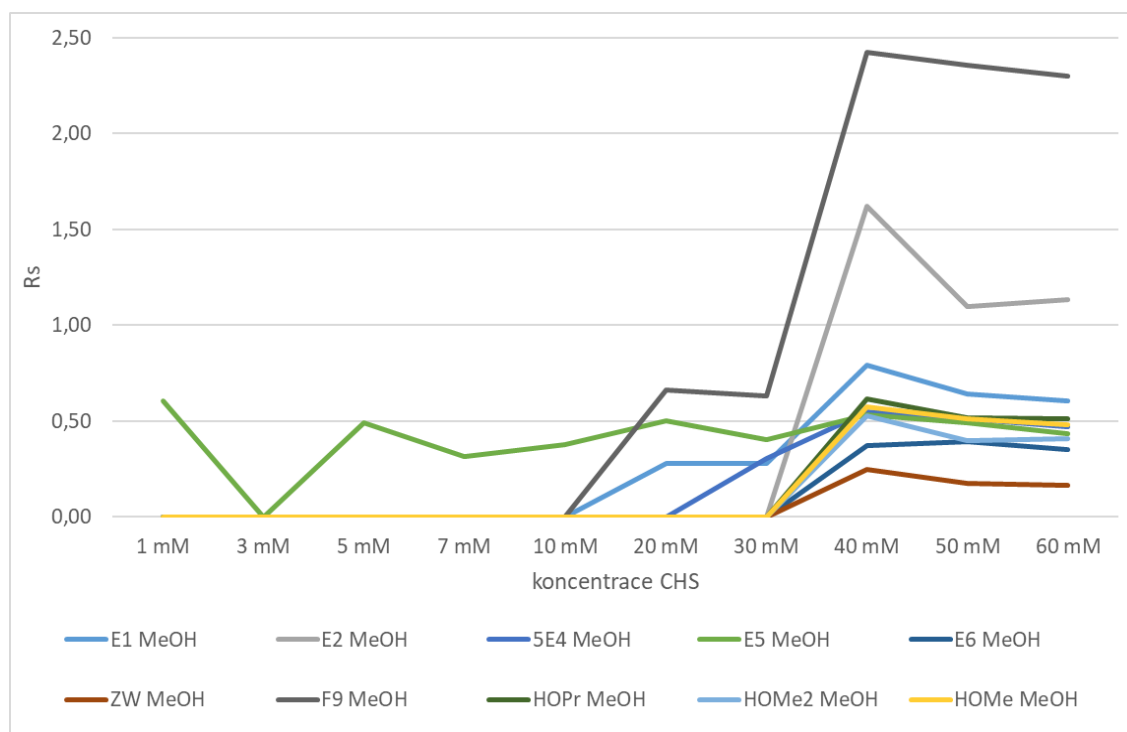
Koncentrace NH <sub>4</sub> Ac	Chirální separace	Migrační čas 1	Rs	w50	Selektivita	Tailing
200mM	ano	12,75	1,51	0,114	1,02	1,75
100mM	ano	13,49	1,52	0,14	1,03	2,27

## 5.2. Methylované cyklodextriny

### 5.2.1. Vliv koncentrace Me-β-CD na chirální separaci

Následně byly vzorky analyzovány za použití octanu amonného s přidavkem Me-β-CD (BGE 2) jako základního elektrolytu, kdy se koncentrace Me-β-CD postupně zvyšovala (1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 mM). Cílem bylo nalezení optimální koncentrace CD pro chirální separaci analytů v přiměřeně dlouhém čase. Při nižších koncentracích CD (<10 mM) nedocházelo k chirální separaci kvůli příliš malému množství CHS. Výjimkou byly látky E5 a bisPhe, které se separovaly už při 1mM koncentraci CD. Při koncentracích 20 a 30 mM se začínají dělit některé analyty ze skupiny *nido*-karboranů (př. E1, E5). Výrazná změna nastává při koncentraci CD 40 mM, kdy se chirálně separují už i cosany a zároveň dochází ke zvýšení rozlišení

u *nido*-karboranů (viz Obrázek 8). Další zvyšování koncentrace CD již vedlo pouze ke zhoršování rozlišení, výrazně začal vzrůstat tailing, docházelo k rozmývání píků a prodlužoval se čas analýzy. Látky 9E1, E4, HOEt, HOEt2 a bisTol se chirálně neseperoaly při žádné koncentraci. Látka H<sub>2</sub>NEt za daných podmínek chová jako zwitterion, a tedy se v kapiláře nepohybovala. Shrnutí dosažených výsledků vybraných vzorků je uvedeno v Tabulce 6.



Obrázek č. 8: Graf rozlišení separovaných analytů za použití Me-β-CD jako CHS, pozn. Pro větší přehlednost je vynechán analyt bisPhe

Tabulka č. 6: Chirální separace vybraných vzorků za použití Me-β-CD jako CHS

Analyt	Chirální separace	Migrační čas 1	Migrační čas 2	Rs	Tailing
<b>1mM Me-β-CD</b>					
E1	ne	5,71	-	-	0,84
ZW	ne	5,90	-	-	0,75
F9	ne	7,22	-	-	0,77
(HOMe) <sub>2</sub>	ne	9,08	-	-	2,26
bisPhe	ano	9,40	9,68	<b>4,24</b>	2,08
<b>10mM Me-β-CD</b>					
E1	ne	7,68	-	-	1,74
ZW	ne	7,98	-	-	1,54
F9	ne	9,04	-	-	0,86
(HOMe) <sub>2</sub>	ne	11,30	-	-	1,36
bisPhe	ano	12,68	14,87	<b>4,24</b>	1,63
<b>20mM Me-β-CD</b>					
E1	ano	10,17	10,22	0,28	3,91
ZW	ne	10,42	-	-	1,97
F9	ano	11,15	11,37	0,66	1,36
(HOMe) <sub>2</sub>	ne	13,24	-	-	1,55
bisPhe	ano	15,39	19,00	<b>6,57</b>	1,82
<b>30mM Me-β-CD</b>					
E1	ano	12,40	12,47	0,28	3,19
ZW	ne	12,68	-	-	1,96
F9	ano	13,27	13,58	0,63	1,22
(HOMe) <sub>2</sub>	ne	15,17	-	-	1,55
bisPhe	ano	17,81	22,38	<b>6,18</b>	1,72
<b>40mM Me-β-CD</b>					
E1	ano	16,86	17,08	0,79	2,07
ZW	ano	20,49	20,60	0,25	6,21
F9	ano	18,36	18,89	<b>2,43</b>	1,34
(HOMe) <sub>2</sub>	ano	20,52	20,69	0,53	3,17
bisPhe	ano	25,21	32,73	<b>18,12</b>	1,63
<b>50mM Me-β-CD</b>					
E1	ano	16,86	17,08	0,64	2,56
ZW	ano	16,81	16,90	0,17	12,54
F9	ano	18,28	18,82	<b>2,36</b>	1,35
(HOMe) <sub>2</sub>	ano	19,03	19,14	0,40	5,38
bisPhe	ano	26,48	33,39	<b>15,18</b>	2,29
<b>60mM Me-β-CD</b>					
E1	ano	18,28	18,51	0,61	2,72
ZW	ano	19,58	19,68	0,17	21,02
F9	ano	19,50	20,09	<b>2,30</b>	1,31
(HOMe) <sub>2</sub>	ano	22,81	22,95	0,41	6,46
bisPhe	ano	27,60	34,72	<b>14,40</b>	1,46

## 5.2.2. Vliv koncentrace Me- $\alpha$ -CD na chirální separaci

Při druhé sérii analýz byl jako základní elektrolyt použit BGE 3, ve kterém byl přítomen octan amonný s přidavkem Me- $\alpha$ -CD. Stejně jako v předchozím případě docházelo k postupnému navyšování koncentrace Me- $\alpha$ -CD. S ohledem na výsledky předchozích experimentů, kdy k chirální separaci docházelo až při vyšších koncentracích byly měřeny pouze koncentrace 1, 10, 20 a 30 mM.  $\alpha$ -CD má ze všech cyklodextrinů nejmenší kavitu, očekávala se proto lepší interakce *nido*-karboranů s tímto CHS. Tento předpoklad se ale nepotvrdil. Na rozdíl od Me- $\beta$ -CD, Me- $\alpha$ -CD špatně interagoval *nido*-karborany i cosany a k chirální separaci nedocházelo. Pro případ, že by chirální separace s tímto CD probíhala až při vyšších koncentracích, byla provedena ještě koncentrace 50 mM. Došlo k částečné separaci 3 analytů ze skupiny cosanů, zároveň ovšem i ke zvýšení tailingu. Přehled získaných výsledků je uveden v Tabulce 7. Me- $\alpha$ -CD jako CHS se za daných experimentálních podmínek jeví jako nevhodný k chirální separaci klastrových sloučenin boru.

Tabulka č. 7: Chirální separace vybraných vzorků za použití Me- $\alpha$ -CD jako CHS

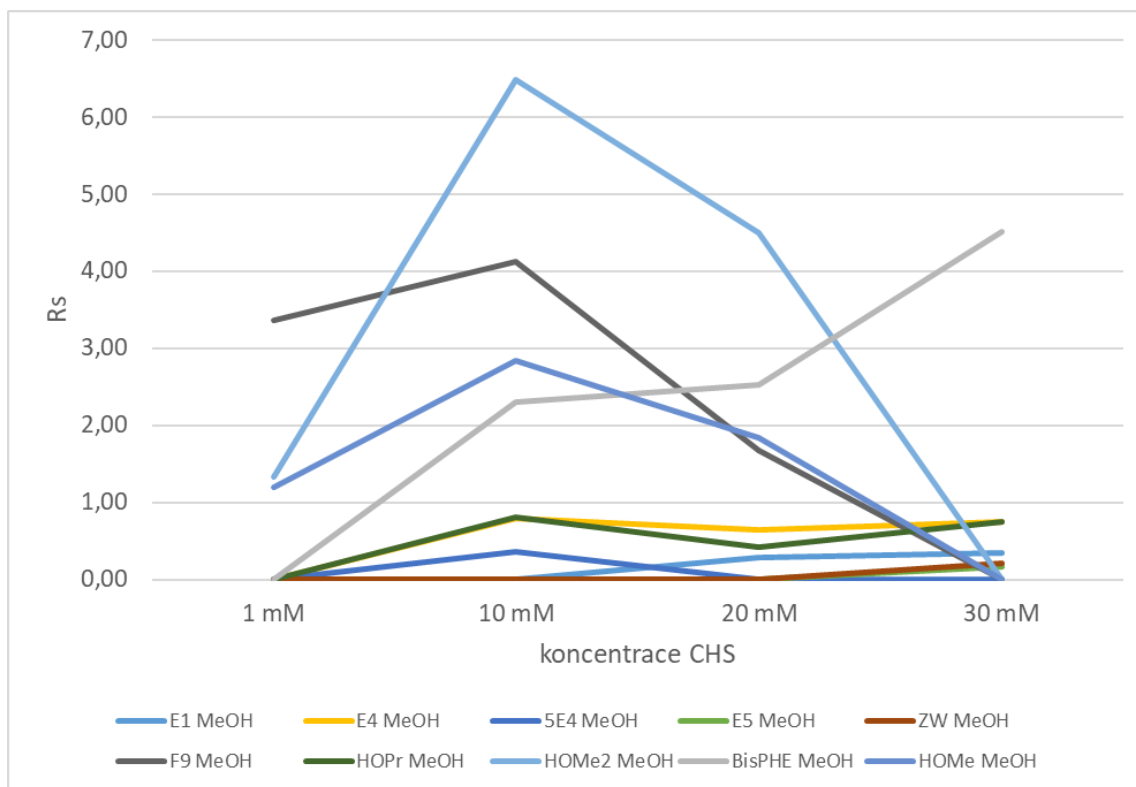
Analyt	Chirální separace	Migrační čas 1	Migrační čas 2	Rs	Tailing
<b>1mM Me-<math>\alpha</math>-CD</b>					
E1	ne	5,05	-	-	0,71
ZW	ne	5,62	-	-	0,63
F9	ne	6,84	-	-	0,82
(HOMe) <sub>2</sub>	ne	8,86	-	-	0,89
bisPhe	ne	9,21	-	-	0,92
<b>10mM Me-<math>\alpha</math>-CD</b>					
E1	ne	5,63	-	-	0,71
ZW	ne	5,80	-	-	0,60
F9	ano	7,34	7,42	0,33	4,09
(HOMe) <sub>2</sub>	ne	9,39	-	-	1,65
bisPhe	ne	9,68	-	-	0,92
<b>20mM Me-<math>\alpha</math>-CD</b>					
E1	ne	5,86	-	-	0,88
ZW	ne	6,12	-	-	0,76
F9	ne	7,48	-	-	0,94
(HOMe) <sub>2</sub>	ne	10,35	-	-	1,28
bisPhe	ne	10,49	-	-	1,61

30mM Me- $\alpha$ -CD					
E1	ne	6,15	-	-	1,29
ZW	ne	6,65	-	-	0,59
F9	ne	7,19	-	-	1,24
(HOMe) <sub>2</sub>	ne	10,90	-	-	1,21
bisPhe	ne	11,23	-	-	1,63
50mM Me- $\alpha$ -CD					
E1	ne	7,16	-	-	1,69
ZW	ne	7,49	-	-	0,76
F9	ne	9,05	-	-	1,13
(HOMe) <sub>2</sub>	ano	12,87	12,98	0,52	2,89
bisPhe	ano	12,96	13,17	0,65	5,69

### 5.2.3. Vliv koncentrace Me- $\gamma$ -CD na chirální separaci

Dalším základním elektrolytem pro analýzu byl BGE 4 s Me- $\gamma$ -CD jako chirálním selektorem. Protože  $\gamma$ -CD mají největší kavitu, předpokládala se lepší separace hlavně větších analytů obsahujících ve své molekule 2 *nido*-karborany spojené kobaltem. Měřené koncentrace byly 1, 10, 20 a 30 mM. U 30mM koncentrace byl pozorován velmi dlouhý migrační čas, docházelo k výraznému rozmývání píků a tím i snižování rozlišení, proto vyšší koncentrace již nebyly testovány.

Při nejnižší měřené koncentraci 1 mM se separovaly pouze 3 analyty a to F9, (HOMe)<sub>2</sub> a HOMe (viz Obrázek 9). Zvýšením koncentrace CHS na 10 mM se zlepšilo rozlišení již separovaných analytů a došlo k rozdělení dalších vzorků, převážně cosanů. Následné další zvyšování koncentrace vedlo ve většině případů ke zhoršování rozlišení a přílišnému prodloužení migračního času. Pouze u vzorku bisPhe docházelo se vzrůstající koncentrací CHS ke zlepšování separace a snížení tailingu. Při větším množství CHS se také začaly nepatrně separovat některé analyty s malou molekulou. Látky 9E1, E2, E6, HOEt, (HOEt)<sub>2</sub> a bisTol se nepodařilo chirálně separovat ani při nejvyšší zkoušené koncentraci CHS. Látka H<sub>2</sub>NEt se za daných separačních podmínek chová jako zwitterion, tudíž se v kapiláře nepohybovala. Souhrn dosažených výsledků vybraných vzorků je uveden v Tabulce 8.



Obrázek č. 9: Grafrozlišení separovaných analytů za použití Me- $\gamma$ -CD jako CHS

Tabulka č. 8: Chirální separace vybraných vzorků za použití Me- $\gamma$ -CD jako CHS

Analyt	Chirální separace	Migrační čas 1	Migrační čas 2	Rs	Tailing
<b>1mM Me-<math>\gamma</math>-CD</b>					
E1	ne	5,73	-	-	1,40
ZW	ne	5,90	-	-	1,47
F9	ano	10,68	11,66		2,81
(HOMe) <sub>2</sub>	ano	10,27	10,79		2,68
bisPhe	ne	9,78	-	-	1,34
<b>10mM Me-<math>\gamma</math>-CD</b>					
E1	ne	9,69	-	-	2,61
ZW	ne	11,62	-	-	6,11
F9	ano	24,50	26,11	<b>4,13</b>	1,75
(HOMe) <sub>2</sub>	ano	17,92	20,55	<b>6,48</b>	2,00
bisPhe	ano	11,85	12,90	<b>2,29</b>	3,10
<b>20mM Me-<math>\gamma</math>-CD</b>					
E1	ano	15,02	15,10	0,28	7,2
ZW	ne	14,86	-	-	8,00
F9	ano	31,55	32,82	<b>1,67</b>	1,04
(HOMe) <sub>2</sub>	ano	28,13	32,21	<b>4,49</b>	1,06
bisPhe	ano	16,41	18,83	<b>2,53</b>	0,94



30mM Me- $\gamma$ -CD					
E1	ano	22,48	22,32	0,34	6,26
ZW	ano	23,81	23,96	0,20	10,44
F9	Příliš dlouhý migrační čas				
(HOMe) <sub>2</sub>	Příliš dlouhý migrační čas				
bisPhe	ano	21,11	25,42	<b>4,52</b>	0,96

#### 5.2.4. Porovnání methylovaných cyklodextrinů

Porovnáním všech tří testovaných methylovaných CD můžeme říci, že nejméně vhodným pro chirální separaci je Me- $\alpha$ -CD. V tomto případě se předpokládala lepší separace látek ze skupiny *nido*-karboranů, což se ovšem nepotvrdilo. Me- $\alpha$ -CD špatně interagoval se všemi testovanými analyty a k chirální separaci nedocházelo. Me- $\gamma$ -CD je podle předpokladu vhodný především k rozdělení látek s větší molekulou ze skupiny cosanů, kdy už při koncentraci 10 mM dochází k separaci na základní linii. Nejsířší uplatnění z těchto tří chirálních selektorů má bezesporu Me- $\beta$ -CD. Je vhodný pro separaci obou strukturních typů tzn. *nido*-karboranů, i cosanů. Optimální koncentrace tohoto CHS byla stanovena na 40 mM, při této koncentraci bylo dosaženo nejlepšího rozlišení, zároveň byly migrační časy přiměřeně dlouhé a separovalo se nejvíce analytů.

### 5.3. Vliv koncentrace acetyl- $\beta$ -CD na chirální separaci

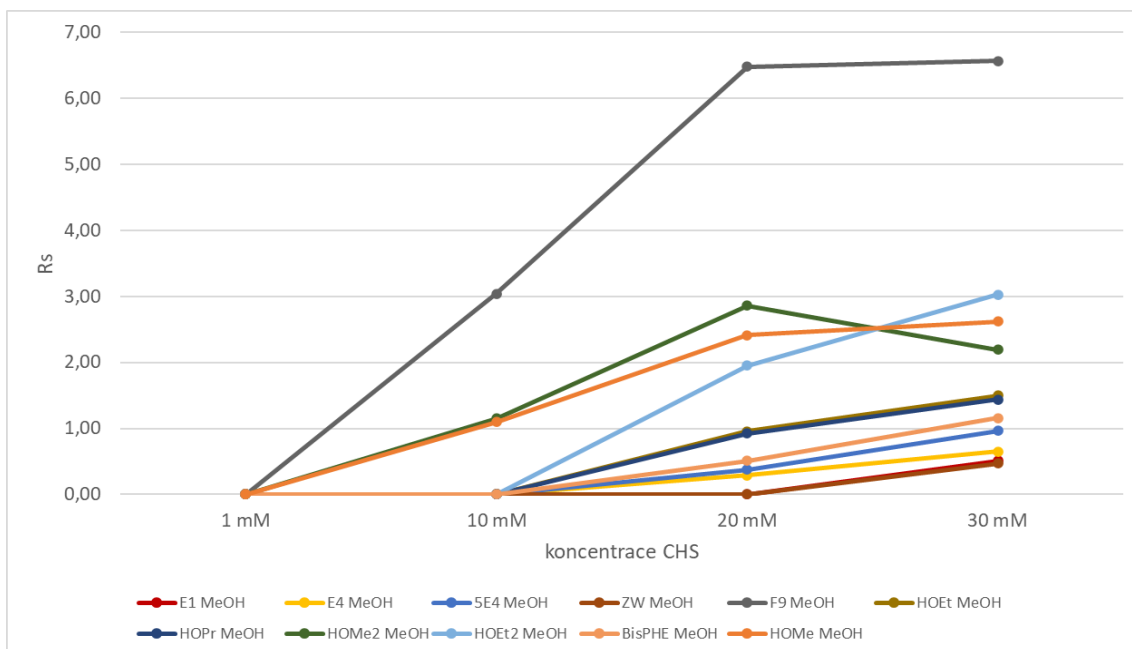
Následujícím základním elektrolytem byl BGE 5 obsahující acetyl- $\beta$ -CD jako chirální selektor, jehož koncentrace byla postupně navyšována (1, 10, 20 a 30 mM). Při koncentraci 20 mM a vyšší základní elektrolyt nebo chirální selektor během probíhajících analýz vykrystalizoval. Z dohledaných hodnot rozpustnosti v MeOH (7,89 g/100 ml pro NH<sub>4</sub>Ac a >50 g/100 ml pro acetyl- $\beta$ -CD) vyplývá, že množství obou látek je výrazně pod jejich hranicí rozpustnosti a ke krystalizaci tak pravděpodobně dochází v důsledku jejich kombinace v roztoku. Kvůli těmto komplikacím již vyšší koncentrace měřeny nebyly. K chirální separaci nedošlo u žádného analytu ani při nejvyšší měřené koncentraci 30 mM a migrační čas se s narůstajícím množstvím CHS prodlužoval jen nepatrně. Z toho vyplývá, že analyty pravděpodobně s acetyl- $\beta$ -CD neinteragují, a proto je tento CHS v porovnání s methylovanými CD nevhodný.

Pro ověření správnosti naměřených dat byla analýza ještě jednou opakována s novou sadou vzorků a s novým základním elektrolytem, toto měření mělo stejný výsledek.

## 5.4. Vliv koncentrace 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD na chirální separaci

Posledním testovaným základním elektrolytem pro chirální separaci byl BGE 6, ve kterém byl jako CHS přítomen 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD s postupně narůstající koncentrací. Analýzy probíhaly postupně při koncentracích 1, 10, 20 a 30 mM. Stejně jako v případě Me- $\gamma$ -CD se očekávala lepší separace především větších molekul analytů obsahujících 2 klastry v molekule spojených kobaltem.

Během analýzy s nejnižší koncentrací 1 mM nedošlo k chirální separaci u žádného analytu (viz Obrázek 10). Zvýšením množství CHS na 10 mM se začaly separovat některé cosany, ovšem na základní linii byl separován pouze analyt F9. Při koncentraci 20 mM dochází k rozdělení všech analytů ze skupiny cosanů kromě analytu bisTol, tento analyt se ale nepodařilo rozdělit pomocí žádného z testovaných CD. Dalším navýšením koncentrace CHS na 30 mM došlo ke zlepšení rozlišení již separovaných analytů, kdy téměř všechny cosany byly chirálně separovány až na základní linii. Při této koncentraci také došlo k separaci některých analytů ze skupiny *nido*-karboranů, jejich rozlišení však bylo nižší než u cosanů a dosahovalo maximálně hodnoty 0,97 (látka 5E4). Látky 9E1, E2, E5, E6, H<sub>2</sub>NEt a bisTol se nepodařilo separovat při žádné koncentraci. Podle předpokladu se potvrdilo, že 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD je jako CHS vhodný především pro látky s 2 klastry v molekule. Přehled získaných výsledků vybraných analytů je uveden v Tabulce 9.



Obrázek č. 10: Graf rozlišení separovaných analytů za použití 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD jako CHS

Tabulka č. 9: Chirální separace vybraných vzorků za použití 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD jako CHS

Analyt	Chirální separace	Migrační čas 1	Migrační čas 2	Rs	Tailing
<b>1mM 2-hydroxypropyl-<math>\gamma</math>-CD</b>					
E1	ne	5,61	-	-	0,69
ZW	ne	5,83	-	-	0,67
F9	ne	7,70	-	-	1,03
(HOME) <sub>2</sub>	ne	9,77	-	-	0,88
bisPhe	ne	10,11	-	-	0,64
<b>10mM 2-hydroxypropyl-<math>\gamma</math>-CD</b>					
E1	ne	7,39	-	-	1,13
ZW	ne	7,49	-	-	1,05
F9	ano	13,47	15,13	<b>3,04</b>	3,68
(HOME) <sub>2</sub>	ano	11,75	12,22	1,15	1,40
bisPhe	ne	10,32	-	-	0,90
<b>20mM 2-hydroxypropyl-<math>\gamma</math>-CD</b>					
E1	ne	10,05	-	-	2,77
ZW	ne	10,33	-	-	2,57
F9	ano	20,04	22,70	<b>6,48</b>	3,75
(HOME) <sub>2</sub>	ano	16,00	16,78	<b>2,86</b>	2,03
bisPhe	ano	11,09	11,23	0,51	1,39

30mM 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD					
E1	ano	12,52	12,64	0,51	2,79
ZW	ano	12,91	13,02	0,47	3,05
F9	ano	25,70	28,73	<b>6,57</b>	3,19
(HOMe) <sub>2</sub>	ano	19,10	19,74	<b>2,19</b>	2,37
bisPhe	ano	11,75	11,99	1,16	0,94

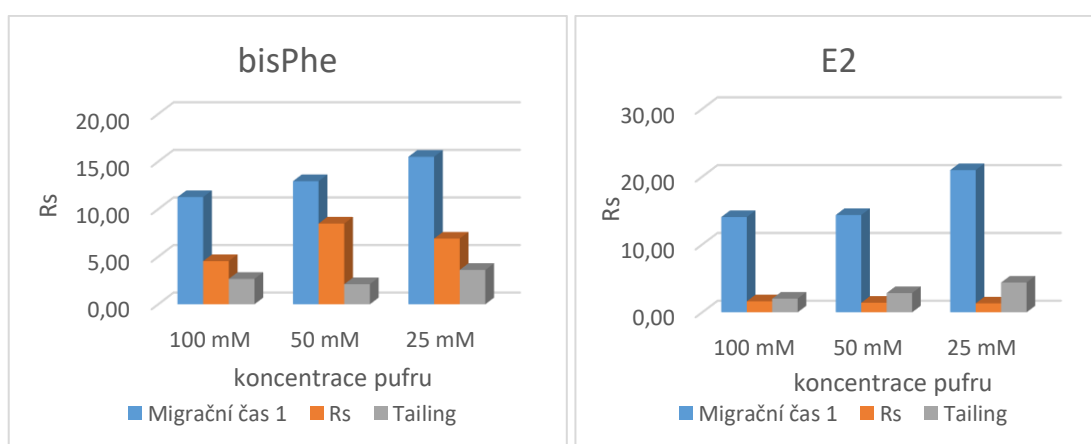
## 5.5. Optimalizace

Po systematickém screeningu vybraných cyklodextrinů následovala optimalizace separačních podmínek kapilární elektroforézy. Pro každý z analytů byly vybrány nejlepší separační podmínky, při kterých bylo dosaženo chirální separace v přijatelném čase. Pro vzorky E1, E2, E5, E6 a ZW byl použit základní elektrolyt s obsahem 40 mM Me- $\beta$ -CD. Vzorky E4, 5E4, HOEt, HOPr, (HOMe)<sub>2</sub>, HOEt<sub>2</sub> a HOMe byly analyzovány za použití BGE s přidavkem 30mM HOPr- $\gamma$ -CD. Pro analyt F9 byl zvolen BGE obsahující 1 mM Me- $\gamma$ -CD a nakonec pro bisPhe s 5mM HOPr- $\gamma$ -CD. Vzorky 9E1, H<sub>2</sub>NEt a bisTol, které se nepodařilo rozdělit žádným z testovaných CD ani při nejvyšší zkoušené koncentraci byly z optimalizace vynechány.

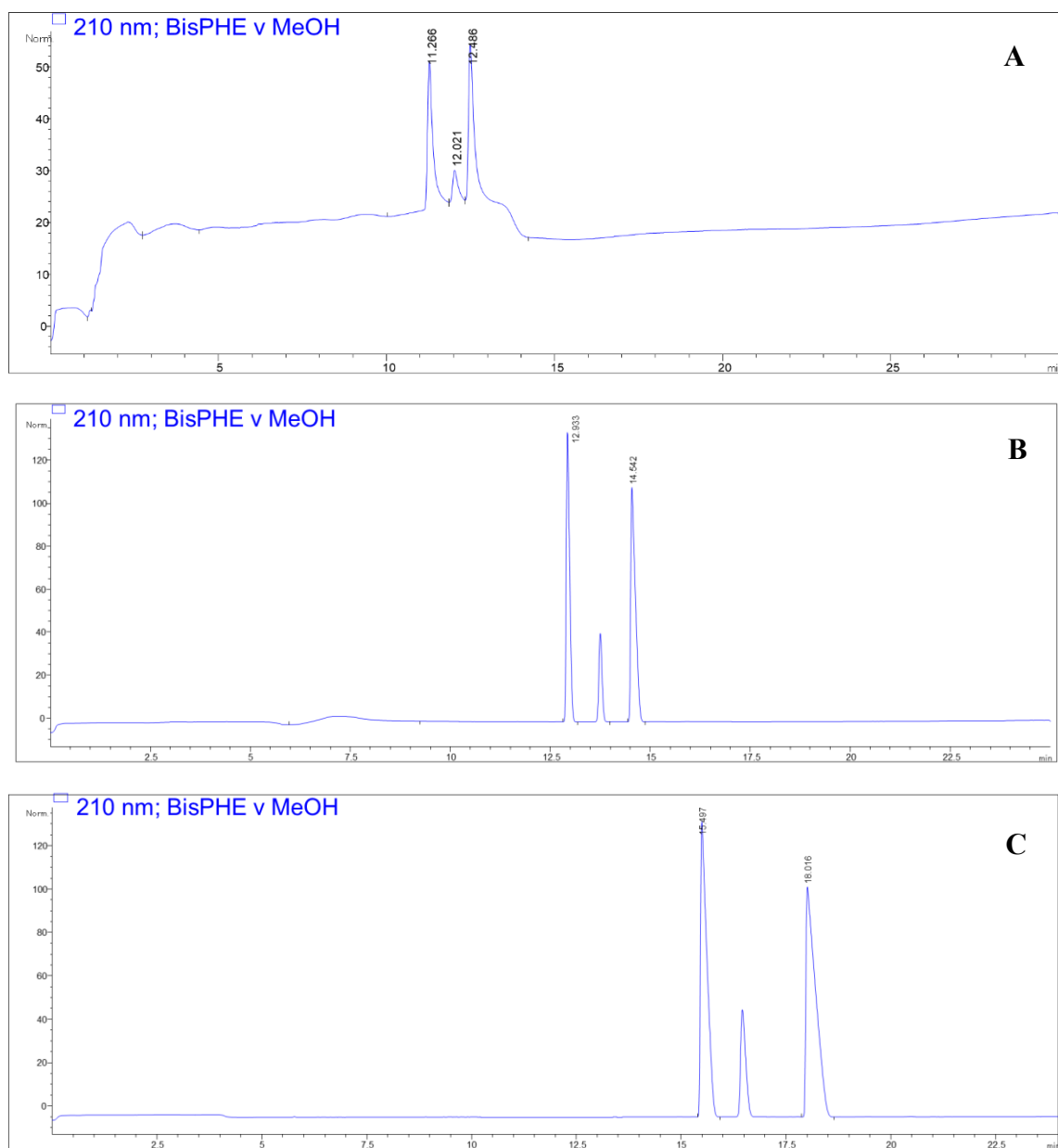
## 5.6. Změna koncentrace octanu amonného

Jako první byla věnována v rámci optimalizace pozornost vlivu koncentrace octanu amonného na chirální separaci sledovaných látek. Vzhledem ke zkušenostem z první série analýz, kdy při koncentraci 200 mM NH<sub>4</sub>Ac docházelo k ucpávání kapiláry, byly testovány pouze BGE s koncentrací octanu amonného nižší než 100 mM. Konkrétně byly testovány BGE s koncentrací 50 a 25mM NH<sub>4</sub>Ac. Se snižující se koncentrací octanu amonného téměř ve všech případech došlo k prodlužování migračního času, jedinou výjimkou byl vzorek ZW, který měl i s měnící se koncentrací migrační čas vždy přibližně stejný. Při snížení koncentrace octanu amonného na 50 mM se rozlišení u některých analytů zlepšilo, u bisPhe dokonce skoro na dvojnásobek, při srovnání se 100 mM. Ale u některých látek naopak došlo ke snížení rozlišení. Toto platí jak pro *nido*-karborany, tak cosany. Oproti koncentraci 100 mM také u většiny analytů došlo ke zvýšení chvostování píků. Dalším snížením množství octanu amonného na 25 mM nastalo již u všech látek zhoršení rozlišení a také další výrazný nárůst chvostování píků v porovnání s koncentracemi 100 a 50 mM.

Z těchto výsledků vyplývá, že snížení koncentrace octanu amonného na 50 mM u většiny měřených analytů nemá význam, protože buď ke zlepšení rozlišení nedojde, nebo je jen velice malé. Výjimkou jsou látky ze skupiny closanů (kromě HOME a (HOME)<sub>2</sub>). Jak je vidět na Obrázku 9 záznam B dosahuje rozdělení až na základní linii a oproti záznamu A je zde také symetričtější tvar píků. Při pohledu na záznam C je vidět, že se snížením koncentrace octanu amonného na 25 mM dochází k nárůstu chvostování píků a s tím související zhoršení všech měřených parametrů. V Obrázku 11 je znázorněn vliv koncentrace pufru na chirální separaci u vybraných analytů.



Obrázek č. 11: Grafy vlivu koncentrace pufru na separaci analytů bisPhe a E2



Obrázek č. 12: Elektroforeogramy látky bisPhe (A) 100mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , (B) 50mM  $\text{HN}_4\text{Ac}$ , (C) 25 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$

## 5.7. Přídavek 3 % HFIP do základního elektrolytu

Jako další byl testován vliv přídavku 3 % hexafluoroisopropan-2-olu do základního elektrolytu. HFIP je polární látka, dobře mísitelná s většinou organických rozpouštědel (kromě uhlovodíků s dlouhým řetězcem) i s vodou, vytváří pevné vodíkové vazby, dále neabsorbuje UVzáření a je teplotně stabilní. Díky specifickým vlastnostem HFIP se předpokládalo možné zlepšení chirální separace, což se ale nepotvrdilo. [46]

Ve většině případů došlo u vzorků po přidavku HFIP k prodloužení migračního času a také tailingu. Výjimkou byly vzorky E1 a E2, které měly migrační čas v obou případech téměř stejný. Dále se odlišně choval také analyt ZW, u kterého došlo ke zkrácení migračního času i tailingu a přestal se chirálně dělit. Srovnáním hodnot rozlišení bez přítomnosti HFIP a po jeho přidavku lze říct, že je stále přibližně stejné, a tedy přítomnost HFIP nemá vliv na chirální separaci analytů. U některých vzorků sice došlo ke zvýšení rozlišení, což je ale dáno spíše prodloužením migračního času, než vlivem HFIP na selektivitu separace. Srovnání dosažených výsledků vybraných analytů je uvedeno v Tabulce 10.

Tabulka č. 10: Srovnání chirální separace vybraných vzorků bez a s použitím HFIP

Analyt	100mM NH <sub>4</sub> Ac			100mM NH <sub>4</sub> Ac + HFIP (97:3)		
	Migrační čas 1	Rs	Tailing	Migrační čas 1	Rs	Tailing
E1	17,22	0,79	2,07	17,15	0,62	2,72
E4	12,78	0,65	2,15	16,30	0,57	3,07
ZW	20,49	0,25	6,11	17,86	-	2,40
F9	10,68	<b>3,37</b>	2,81	12,64	<b>2,70</b>	4,79
(HOEt) <sub>2</sub>	13,99	<b>3,03</b>	1,22	17,83	<b>5,23</b>	2,42
bisPhe	11,27	<b>4,53</b>	2,66	22,75	<b>6,25</b>	1,84

*Migrační čas 1* – migrační čas prvního píku analytu

## 5.8. Nástřík na kratší konec kapiláry

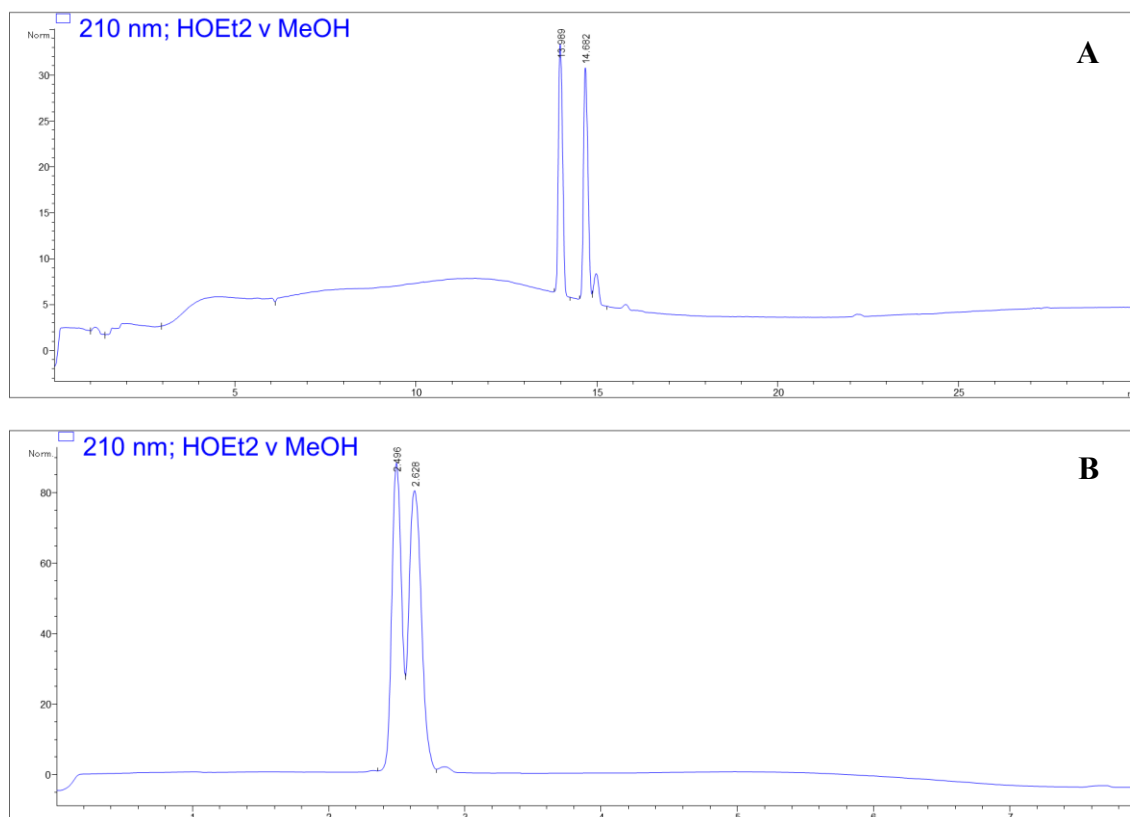
Následně byla během optimalizace vyzkoušena analýza na kratším konci kapiláry. Efektivní délka je v tomto případě jen 8,4 cm což je přibližně 6,1krát méně oproti původní délce. Očekávalo se tedy poměrné zkrácení času potřebného pro analýzu, což by bylo výhodné. Nebylo však jasné, zda takto krátký čas bude dostatečný pro chirální separaci analytů.

Zkrácení migračního času bylo opravdu výrazné a ani čas nejdelší analýzy v tomto případě nepřesáhl dobu 5 minut. Kratší efektivní délka kapiláry měla také pozitivní vliv na tailing a vedla k jeho snížení u všech *nido*-karboranů, naopak u molekul cosanů došlo obecně ke zvýšení chvostování, a to někdy i velmi výrazně. Bohužel zkrácení času separace mělo negativní dopad na rozlišení, *nido*-karborany se nepodařilo separovat vůbec, u skupiny cosanů došlo ke snížení rozlišení asi o 74 % a přestal se dělit vzorek HOPr (Obrázek 13). Po zhodnocení výsledků lze říct, že analýza na kratším konci

kapiláry má smysl pouze u analytů s velmi dlouhým migračním časem, kde je žádoucí jeho zkrácení a zároveň i poté dojde k úplné chirální separaci. Přehled získaných výsledků vybraných analytů je uveden v Tabulce 11.

Tabulka č. 11: Srovnání chirální separace vybraných vzorků na delším a kratším konci kapiláry

Analyt	Delší konec kapiláry			Kratší konec kapiláry		
	Migrační čas 1	Rs	Tailing	Migrační čas 1	Rs	Tailing
E1	17,22	0,79	2,07	2,53	-	1,94
E4	12,78	0,65	2,15	2,33	-	1,59
ZW	20,49	0,25	6,11	2,67	-	1,16
F9	10,68	<b>3,37</b>	2,81	1,79	0,50	3,11
(HOEt) <sub>2</sub>	13,99	<b>3,03</b>	1,22	2,50	0,84	1,38
bisPhe	11,27	<b>4,53</b>	2,66	1,92	1,47	1,06



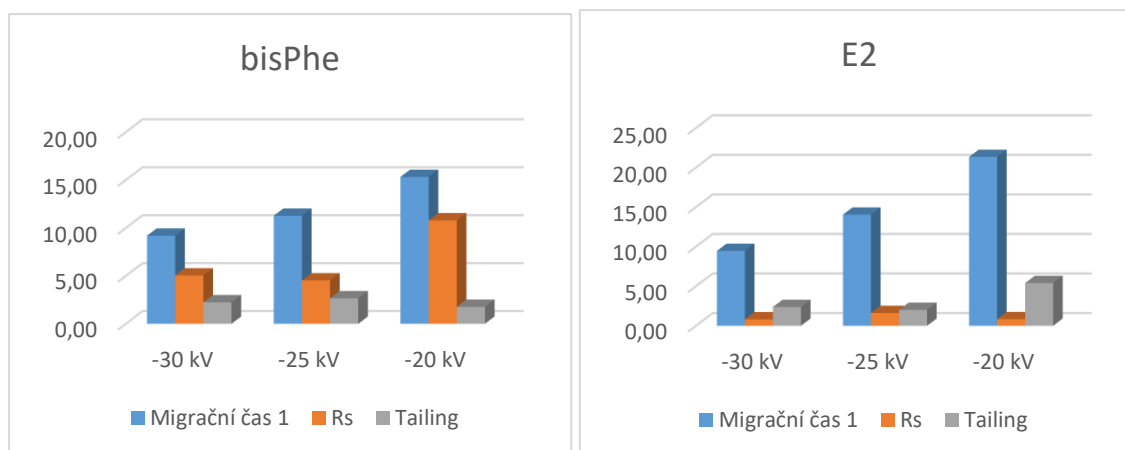
Obrázek č. 13: Elektroforeogramy analytu HOEt<sub>2</sub>, (A) efektivní délka kapiláry 51,6 cm, Rs 3,03; (B) efektivní délka kapiláry 8,4 cm, Rs 0,84



## 5.9. Změna napětí

Posledním zkoumaným parametrem byl vliv změny napětí na chirální separaci. Původní screening probíhal při záporném napětí -25 kV. V rámci optimalizace pak bylo testováno -30 kV, a -20 kV. Při napětí -30 kV došlo podle předpokladu ke zkrácení migračního času. Současně ale paradoxně nastalo ve většině případů zvýšení chvostování, a to někdy i velmi výrazné. Výjimkou byly analyty E5, ZW a bisPhe u kterých se chvostování naopak snížilo. Ve výsledku se rozlišení u *nido*-karboranů významně nezměnilo (E5) nebo se zhoršilo cca o 40,5 % (E1, E2, E4, E6). U cosanů už to takto jednoznačné nebylo, v jedné polovině případů nastalo zlepšení (HOPr, (HOMe)<sub>2</sub>, (HOEt)<sub>2</sub>, bisPhe) a v druhé naopak zhoršení separace (F9, HOEt, HOMe).

V dalším kroku byly všechny látky analyzovány při napětí -20 kV. Zde došlo podle očekávání v důsledku vloženého nižšího napětí ke zpomalení analýzy, a tedy i prodloužení migračního času, který se v mnoha případech blížil půlhodině, výjimečně byl i delší. S delší separací se dal očekávat i nárůst tailingu, ovšem nebylo tomu tak u všech analytů. *Nido*-karborany vykazovaly asi v polovině případů nárůst a v druhé naopak pokles tailingu, jeho zvýšení i snížení bylo pozorováno u stejných látek jako tomu bylo při napětí -30 kV, jedinou výjimkou byla látka 5E4. U analytů ze skupiny cosanů byl ve většině případů tailing podobný jako při napětí -25 kV. Stejně tak rozlišení měly všechny *nido*-karborany přibližně stejné, jedinou výjimkou byl analyt E2, u kterého došlo k poklesu rozlišení. U cosanů došlo stejně jako při napětí -30 kV v polovině případů ke zhoršení a v polovině ke zlepšení separace. Většinou byl nárůst i pokles rozlišení pozorován u stejných analytů jako při napětí -30 kV, výjimkou byly látky HOEt a (HOMe)<sub>2</sub>. U analytu bisPhe se dokonce rozlišení zlepšilo více jak dvakrát. Dosažené výsledky vybraných analytů jsou zobrazeny na Obrázku 14. Závěrem lze tedy říci, že vliv vloženého napětí je ve většině případů závislý na typu látky a optimalizaci je třeba provádět pro každou látku zvlášť.



Obrázek č. 14: Grafy vlivu napětí na separaci analytů bisPhe a E2

## 5.10. Porovnání dosažených výsledků ve vodném a nevodném prostředí

Práce zkoumající využití  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD jako chirálních selektorů pro rozdělení klastrových sloučenin boru využívaly elektrolyt tvořený z borátového pufru o pH 9,4 a MeOH, kdy koncentrace MeOH se pohybovala v rozmezí od 30 % do 70 % podle konkrétního selektoru. Přídavek MeOH je nezbytný jednak pro zlepšení rozpustnosti klastrů boru a dále také k zeslabení vazebných interakcí mezi analytem a cyklodextrinem. [43] Jako nejefektivnější selektor pro skupinu *nido*-karboranů, který dosahoval nejvyššího rozlišení byl  $\alpha$ -CD. Chirální separaci zhoršovala přítomnost velkých substituentů většího množství malých substituentů nebo pokud byl substituent navázán na atom boru v klastru.  $\beta$ -CD byl oproti tomu vhodný pro separaci všech strukturních typů klastrových sloučenin boru, ovšem rozlišení *nido*-karboranů bylo nižší než v případě  $\alpha$ -CD. Dále se ukázalo, že  $\gamma$ -CD není vhodný chirální selektor, protože při jeho použití dochází k neustálému snižování mobilit a jejich rozdílů, což je dáno jeho rozkladem ve směsi voda-MeOH [43]. Rozpustnost nativních CD v MeOH je menší než 1 g na 100 ml. Proto byly zvoleny deriváty nativních CD byly zvoleny kvůli jejich mnohem vyšší rozpustnosti v MeOH, která je více jak 50 g na 100 ml při 25 °C.

Výhodou bezvodého prostředí oproti vodnému je, že odpadá potřeba nastavení vhodného poměru voda-organika a také nutnost úpravy pH. Modifikovaný  $\alpha$ -CD se ukázal jako nejméně vhodný pro použití při nevodných podmínkách. Me- $\alpha$ -CD špatně interagoval se všemi testovanými analyty a k chirální separaci nedocházelo. Nejsířší uplatnění ze všech testovaných chirálních selektorů má bezesporu Me- $\beta$ -CD. Podobně jako nativní  $\beta$ -CD ve vodném prostředí byl schopen chirálně rozdělit jak *nido*-karborany tak cosany. Schopnost derivátů  $\beta$ -CD chirálně rozdělit látky ovšem záleží také na modifikující skupině, kdy s její rostoucí objemností se snižuje separační účinnost. Proto je acetyl- $\beta$ -CD jako selektor nevhodný. Při použití bezvodého prostředí lze k chirální separaci využít také Me- $\gamma$ -CD, které ve vodném prostředí rozkládal [43]. Deriváty Me- $\gamma$ -CD se ukázaly jako vhodné především k rozdělení látek s větší molekulou ze skupiny cosanů.

## 6. Závěr

Tato diplomová práce se věnuje zkoumání využití derivátů  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD jako chirálních selektorů pro rozdělení klastrových sloučenin boru v bezvodém prostředí MeOH. Bylo zjištěno, že v bezvodých podmínkách není Me- $\alpha$ -CD vhodným chirálním selektorem, testované látky s ním špatně interagovaly a k enantioseparaci nedocházelo. Me- $\beta$ -CD dokázal při koncentraci 40mM účinně rozdělit *nido*-karborany i cosany, a je proto nejuniverzálnějším ze všech testovaných chirálních selektorů. Me- $\gamma$ -CD, díky své struktuře, nejlépe separuje látky ze skupiny cosanů při koncentraci 10mM. V porovnání s Me- $\beta$ -CD se acetyl- $\beta$ -CD ukázal jako horší selektor, při nižších koncentracích neinteragoval s analyty a již při koncentraci 20 mM docházelo během analýzy ke krystalizaci BGE. Posledním testovaným chirálním selektorem byl 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD. Nedosahoval sice univerzálnosti Me- $\beta$ -CD, zato se ukázal jako vhodnější pro separaci látek ze skupiny cosanů. Při koncentraci 30 mM se chirálně separovaly všechny cosany (kromě bisTol, ale tento se nepodařilo separovat žádným z testovaných CD) a dále se podařilo rozdělit i některé látky ze skupiny *nido*-karboranů, ovšem jen s nízkým rozlišením.

Byl testován vliv rozpouštědla vzorku na jeho chirální separaci a bylo zjištěno, že ve všech případech se naměřené parametry liší jen nepatrně, a tedy volba rozpouštědla nemá žádný vliv. Dále snížení koncentrace octanu amonného nemá význam, protože ke zlepšení rozlišení nedojde, nebo je jen velice malé. Dále z výsledků vyplývá, že přídavek 3 % HFIP do BGE nemá vliv na chirální separaci analytů. Analýzou na kratším konci kapiláry došlo k výraznému zkrácení migračního času, a proto je takto optimalizovat vhodné jen v případě látek s vysokým rozlišením a velmi dlouhým migračním časem, kde je žádoucí zkrácení času analýzy. Optimalizovaným parametrem byla také změna napětí. Při vyšším i nižším napětí došlo ke zlepšení i zhoršení separace většinou u stejných látek a je třeba optimalizovat pro každou látku zvlášť, nezávisle na strukturním typu. Nevýhodou nižšího napětí byly poměrně dlouhé migrační časy.

Závěrem lze konstatovat, že se podařilo získat nové poznatky týkající se chirálních separací klastrových sloučenin boru v prostředí bezvodé elektroforézy. Jako nejlepší chirální selektor se za daných podmínek jeví pro *nido*-karborany Me- $\beta$ -CD a pro cosany 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD.

## 7. Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
BGE	základní elektrolyt
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
HFIP	hexafluoroisopropan-2-ol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHS	chirální selektor
MF	mobilní fáze
NACE	nevodná kapilární elektroforéza
Rs	rozlišení
w50	šířka píku v polovině jeho výšky
$\alpha$ -CD	alfa-cyklodextrin
$\beta$ -CD	beta-cyklodextrin
$\gamma$ -CD	gama-cyklodextrin

## 8. Seznam použité literatury

- [1] BONNER, William A. Chirality and life. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **1995**, 25(1-3), 175-190. doi:10.1007/BF01581581
- [2] EECKHAUT, Ann van a Yvette MICHOTTE. *Chiral separations by capillary electrophoresis*. Boca Raton: Taylor & Francis, **2009**. ISBN 978-1-4200-6933-4
- [3] BERNARDO-BERMEJO, Samuel, Elena SÁNCHEZ-LÓPEZ, María CASTRO-PUYANA a María Luisa MARINA. Chiral capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2020**, 124, 1-2. doi:10.1016/j.trac.2020.115807
- [4] WESTON, Andrea a Phyllis R. BROWN. *HPLC and CE: principles and practice*. San Diego: Academic Press, **1997**. ISBN 0-12-136640-5
- [5] LI, Libo, Xia LI, Quan LUO a Tianyan YOU. A comprehensive study of the enantioseparation of chiral drugs by cyclodextrin using capillary electrophoresis combined with theoretical approaches. *Talanta*. **2015**, 142, 28-34. doi:10.1016/j.talanta.2015.04.039
- [6] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, **2016**. ISBN 978-80-86369-22-8
- [7] MATYSOVÁ, Ludmila. *Elektromigrační metody*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové.
- [8] KAŠIČKA, Václav. *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod*. Chem. listy, **1997**, 91.5: 321-325.
- [9] SHAH, Mansi, Nrupesh PATEL, Nagja TRIPATHI a Vivek K. VYAS. Capillary electrophoresis methods for impurity profiling of drugs: A review of the past decade. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. **2021**, 6-9. doi:10.1016/j.jpha.2021.06.009
- [10] LAUER, Henk H. a Gerard P. ROZING. *High Performance Capillary Electrophoresis*. 3th ed. Germany: Agilent Technologies, **2018**. ISBN 5990-3777EN
- [11] KENNDLER, Ernst. A critical overview of non-aqueous capillary electrophoresis. Part I: Mobility and separation selectivity. *Journal of Chromatography A*. **2014**, 1335, 16-30. doi:10.1016/j.chroma.2014.01.010

- [12] RIEKKOLA, Marja-Liisa, Matti JUSSILA, Simo P PORRAS a István E VALKÓ. Non-aqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 892(1-2), 155-170. doi:10.1016/S0021-9673(00)00108-4
- [13] ALI, Imran, Mohd Marsin SANAGI a Hassan Y. ABOUL-ENEIN. Advances in chiral separations by nonaqueous capillary electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis. *ELECTROPHORESIS*. **2014**, 35(7), 926-936. doi:10.1002/elps.201300222
- [14] WANG, Fang a Morteza G. KHALEDI. Enantiomeric separations by nonaqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 875(1-2), 277-293. doi:10.1016/S0021-9673(00)00110-2
- [15] WARD, Timothy J a Alton B FARRIS III. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review. *Journal of Chromatography A*. **2001**, 906(1-2), 73-89. doi:10.1016/S0021-9673(00)00941-9
- [16] PROKHOROVA, Aleksandra F., Elena N. SHAPOVALOVA a Oleg A. SHPIGUN. Chiral analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selectors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2010**, 53(5), 1170-1179. doi:10.1016/j.jpba.2010.07.005
- [17] HAGINAKA, Jun. Enantiomer separation of drugs by capillary electrophoresis using proteins as chiral selectors. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 875(1-2), 235-254. doi:10.1016/S0021-9673(99)01168-1
- [18] MILLOT, M.C. Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. *Journal of Chromatography B*. **2003**, 797(1-2), 131-159. doi:10.1016/j.jchromb.2003.08.035
- [19] ZHOU, Lili, Zhihao LIN, Robert A. REAMER, Bing MAO a Zhihong GE. Stereoisomeric separation of pharmaceutical compounds using CE with a chiral crown ether. *ELECTROPHORESIS*. **2007**, 28(15), 2658-2666. doi:10.1002/elps.200600788
- [20] GÜBITZ, Gerald a Martin G. SCHMID. Recent advances in chiral separation principles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *ELECTROPHORESIS*. **2004**, 25(23-24), 3981-3996. doi:10.1002/elps.200406173
- [21] ZHANG, Haizhi, Li QI, Lanqun MAO a Yi CHEN. Chiral separation using capillary electromigration techniques based on ligand exchange principle. *Journal of Separation Science*. **2012**, 35(10-11), 1236-1248. doi:10.1002/jssc.201200067

- [22] SCHMID, M.G. Chiral metal-ion complexes for enantioseparation by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography: A selective review. *Journal of Chromatography A*. **2012**, 1267, 10-16. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.088
- [23] PELUSO, Paola a Bezhana CHANKVETADZE. Native and substituted cyclodextrins as chiral selectors for capillary electrophoresis enantioseparations: Structures, features, application, and molecular modeling. *ELECTROPHORESIS*. **2021**, 42(17-18), 1676-1708. doi:10.1002/elps.202100053
- [24] JIN, Zheng-Yu. *Cyclodextrin Chemistry: Preparation And Application*. Singapore: WORLD SCIENTIFIC / CHEMICAL INDUSTRY PRESS, CHINA, **2013**. doi:10.1142/8630
- [25] BIWER, A., G. ANTRANIKIAN a E. HEINZLE. Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2002**, 59(6), 609-617. doi:10.1007/s00253-002-1057-x
- [26] LIU, Zongjian, Lin YE, Jianing XI, Jin WANG a Zeng-guo FENG. Cyclodextrin polymers: Structure, synthesis, and use as drug carriers. *Progress in Polymer Science*. **2021**, 118. doi:10.1016/j.progpolymsci.2021.101408
- [27] HORSKÝ, J. a J. JINDŘICH. Cyklodextriny ve světě polymerů. *Chemické listy*. **2013**, 107(10), 769-776.
- [28] ŘEZANKA, Pavel, Klára NAVRÁTILOVÁ, Michal ŘEZANKA, Vladimír KRÁL a David SÝKORA. Application of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*. **2014**, 35(19), 2701-2721. doi:10.1002/elps.201400145
- [29] HORÁKOVÁ, H., GRÜNER, B., VESPALEC, R. Nativní cyklodextriny jako chirální selektory elektroforetických separací aniontových klastrových sloučenin boru. In: GAVENDA, A., ŠEVČÍK, J., eds. *Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2005 & CHIRANAL 2005. Sborník*. Olomouc: Univerzita Palackého, **2005**, s. 56. ISBN 80-244-0984-4.
- [30] JUVANCZ, Zoltán, Rita Bodáné KENDROVICS, Róbert IVÁNYI a Lajos SZENTE. The role of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*. **2008**, 29(8), 1701-1712. doi:10.1002/elps.200700657
- [31] HEGROVÁ, M., K. ŘEZANKOVÁ, M. KUCHAR a P. ŘEZANKA. Separace enantiomerů kationů kapilární elektroforézou s využitím cyklodextrinů jako chirálních selektorů. *Chemické listy*. **2016**, 110(3), 200-203.



- [32] JANSOOK, Phatsawee, Noriko OGAWA a Thorsteinn LOFTSSON. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. **2018**, 535(1-2), 272-284. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.11.018
- [33] FEJŐS, Ida, Eszter KALYDI, Milo MALANGA, Gábor BENKOVICS a Szabolcs BÉNI. Single isomer cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. **2020**, 1627. doi:10.1016/j.chroma.2020.461375
- [34] SLAVÍČEK, Viktor, Bohumír GRÜNER a Radim VESPALEC. Exploration of the electrophoretic behaviour of borane cluster anions and of the capability of capillary electrophoresis to separate them chirally. *Journal of Chromatography A*. **2003**, 984(1), 121-134. doi:10.1016/S0021-9673(02)01816-2
- [35] ALI, Fayaz, Narayan S HOSMANE a Yinghuai ZHU. Boron Chemistry for Medical Applications. *Molecules*. **2020**, 25(4). doi:10.3390/molecules25040828
- [36] HORÁKOVÁ, Hana, Bohumír GRÜNER a Radim VESPALEC. Emerging subject for chiral separation science: Cluster boron compounds. *Chirality*. **2011**, 23(4), 307-319. doi:10.1002/chir.20918
- [37] HORÁČEK, Ondřej, Monika PAPAJOVÁ-JANETKOVÁ, Bohumír GRÜNER, Lukáš LOCHMAN, Petra ŠTĚRBOVÁ-KOVAŘÍKOVÁ, Radim VESPALEC a Radim KUČERA. The first chiral HPLC separation of dicarba-nido-undecarborate anions and their chromatographic behavior. *Talanta*. **2021**, 222. doi:10.1016/j.talanta.2020.121652
- [38] PLEŠEK, Jaromír, Bohumír GRÜNER a Petr MALOŇ. Liquid chromatographic resolution of enantiomers of deltahedral carborane and metallaborane derivatives. *Journal of Chromatography A*. **1992**, 626(2), 197-206.:10.1016/0021-9673(92)85410-U
- [39] PETERSSON, P., J. MALMQUIST, K.E. MARKIDES a S. SJÖBERG. Determination of enantiomeric purity of (S)-carboranylalanine using capillary column supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1994**, 670, 239-242.
- [40] GRÜNER, Bohumír, Josef HOLUB, Jaromír PLEŠEK, Tomáš VANĚK a Hana VOTAVOVÁ. High-performance liquid chromatographic enantiomeric resolution in the ten-vertex carborane series. *Journal of Chromatography A*. **1998**, 793(2), 249-256. doi:10.1016/S0021-9673(97)00904-7

- [41] SLAVÍČEK, Viktor, Bohumír GRÜNER a Radim VESPALEC. Exploration of the electrophoretic behaviour of borane cluster anions and of the capability of capillary electrophoresis to separate them chirally. *Journal of Chromatography A*. **2003**, 984(1), 121-134. doi:10.1016/S0021-9673(02)01816-2
- [42] HORÁKOVÁ, Hana, Bohumír GRÜNER a Radim VESPALEC. Preconditions for reasonable detection sensitivity and for zone symmetry in electrophoretic separations of cluster borane anions. *Journal of Chromatography A*. **2004**, 1051(1-2), 227-235. doi:10.1016/j.chroma.2004.07.078
- [43] HORÁKOVÁ, Hana a Radim VESPALEC. Chiral separability of hydrophobic boron cluster anions with native cyclodextrins in water–methanol background electrolytes. *ELECTROPHORESIS*. **2007**, 28(20), 3639-3649. doi:10.1002/elps.200600814
- [44] HORÁKOVÁ, Hana a Radim VESPALEC. Influence of substituents on selectivity and efficiency of chiral separations of anions containing single nido-7,8-dicarbaundecaborane cluster with  $\alpha$ -cyclodextrin. *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1143(1-2), 143-152. doi:10.1016/j.chroma.2006.12.089
- [45] ChemSketch 2021.1.2, Advanced Chemistry Development, Inc.
- [46] COLOMER, Ignacio, Anna E. R. CHAMBERLAIN, Maxwell B. HAUGHEY a Timothy J. DONOHOE. Hexafluoroisopropanol as a highly versatile solvent. *Nature Reviews Chemistry*. **2017**, 1(11), 1-2. doi:10.1038/s41570-017-0088.