

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



## **Využití HPLC v chirálních separacích III.**

diplomová práce

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

Konzultant diplomové práce: doc. Ing. Radim Vespalec, DrSc.

Hradec Králové 2017

Monika Janetková



Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a zdroje, z ktorých som čerpala pri spracovaní sú uvedené v zozname literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá za účelom získania iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové dňa 1.9.2017

.....



Moje poďakovanie patrí **doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D.** za odborné vedenie, trpezlivosť a cenné rady pri spracovávaní tejto práce, konzultantovi **doc. Ing. Radimovi Vespalcovi, DrSc.** za sprostredkovanie vzoriek bórových klastrov a konzultáciu získaných dát, **doc. Ing. Michalovi Kohoutovi, Ph.D.** z Ústavu organickej chémie Vysokej školy chemicko-technologickej v Prahe a **Mgr. et Mgr. Rafaelovi Doležalovi, Ph.D.** z Centra biomedicínskeho výzkumu Fakultnej nemocnici v Hradci Králové za zapožičanie chromatografických kolón.

Táto diplomová práca bola vytvorená za podpory projektu SVV 260 401.



# Obsah

<b>Obsah</b> .....	- 7 -
<b>Zoznam použitých skratiek</b> .....	- 9 -
<b>Abstrakt</b> .....	- 11 -
<b>Abstract</b> .....	- 12 -
<b>1. Úvod</b> .....	- 13 -
<b>2. Teoretická časť</b> .....	- 14 -
2.1. CHIRALITA A ENANTIOSELEKTÍVNA SEPARÁCIA .....	- 14 -
2.1.1. <i>Stereoizoméria a súvisiace názvoslovie</i> .....	- 14 -
2.1.2. <i>Význam chiralít a enantiomérskej separácie vo farmácii</i> .....	- 16 -
2.1.3. <i>Metódy separácie a detekcie enantiomérov</i> .....	- 19 -
2.2. VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRÁFIA .....	- 25 -
2.2.1. <i>Inštrumentácia</i> .....	- 25 -
2.2.2. <i>Vybrané základné charakteristiky chromatografického procesu</i> .....	- 25 -
2.3. CHIRÁLNE STACIONÁRNE FÁZE A CHIRÁLNE SELEKTORY .....	- 27 -
2.3.1. <i>Proteínové stacionárne fáze</i> .....	- 28 -
2.3.2. <i>Cyklodextríny</i> .....	- 28 -
2.3.3. <i>Cyklofruktany</i> .....	- 29 -
2.3.4. <i>Makrocyclické glykopeptidy</i> .....	- 29 -
2.3.5. <i>Polysacharidy</i> .....	- 30 -
2.3.6. <i>Donor-akceptorové stacionárne fáze</i> .....	- 31 -
2.3.7. <i>Iontové meniče</i> .....	- 31 -
2.3.8. <i>Syntetické polyméry a molekulárne imprintované polyméry</i> .....	- 31 -
2.3.9. <i>Crownétery</i> .....	- 32 -
2.3.10. <i>Ďalšie chirálne selektory</i> .....	- 32 -
2.4. BÓROVÉ KLASTRE .....	- 34 -
2.4.1. <i>Syntéza</i> .....	- 34 -
2.4.2. <i>Názvoslovie</i> .....	- 35 -
2.4.3. <i>Vlastnosti</i> .....	- 36 -
2.4.4. <i>Využitie</i> .....	- 37 -
2.4.5. <i>Analýza</i> .....	- 40 -
<b>3. Ciele práce</b> .....	- 42 -
<b>4. Experimentálna časť</b> .....	- 43 -
<b>5. Výsledky a diskusia</b> .....	- 46 -

5.1.	CHIRÁLNY SELEKTOR: BETA-CYKLODEXTRÍN .....	- 46 -
5.2.	CHIRÁLNY SELEKTOR: BROMOVANÝ BETA-CYKLODEXTRÍN .....	- 57 -
5.3.	CHIRÁLNY SELEKTOR: ALFA <sub>1</sub> -KYSLÝ GLYKOPROTEÍN.....	- 60 -
5.4.	CHIRÁLNY SELEKTOR: TRIS(3,5-DIMETYLFENYLKARBAMÁT) CELULÓZY .....	- 63 -
5.5.	CHIRÁLNY SELEKTOR: O-9-(TERC-BUTYLKARBAMOYL)CHINÍN .....	- 63 -
5.6.	CHIRÁLNY SELEKTOR: TEIKOPLANÍN .....	- 66 -
<b>6.</b>	<b>Záver .....</b>	<b>- 67 -</b>
<b>7.</b>	<b>Zoznam citovanej literatúry .....</b>	<b>- 68 -</b>



## Zoznam použitých skratiek

AA	kyselina octová
ACN	acetonitril
AcNH <sub>4</sub>	octan amónny
AGP	α <sub>1</sub> -kyslý glykoproteín
BCs	bórové klastre
BNCT	bórová neutrónová záchytná terapia
BSA	hovädzí sérový albumín
CBH 1	cellobiohydroláza 1
CCC	protiprúdová chromatografia
CD	cyklodextrín
CE	kapilárna elektroforéza
CEC	kapilárna elektrochromatografia
CSF	chirálna stacionárna fáza
DEA	dietylamín
EDTA-Na <sub>2</sub>	edetán disodný
EtOH	etanol
FA	kyselina mravčia
FA-NH <sub>4</sub>	mravčan amónny
FDA	Food and Drug Administration
GC	plynová chromatografia
HPLC	vysokoúčinná kvapalínová chromatografia
HSA	ľudský sérový albumín
LC	kvapalínová chromatografia
L-L extrakcia	liquid-liquid extrakcia
MeOH	metanol
MES	2-(N-morfolino)etansulfoňová kyselina
MF	mobilná fáza
NP	normálne-fázový mód
OVM	ovomucoid
PC	počítač
PO mód	polárne-organický mód
RP mód	reverzne-fázový mód
SF	stacionárna fáza
SFC	superkritická kvapalínová chromatografia
SMB	simulovaná protiprúdová separácia

TbACl	tetrabutylamonium chlorid
TEA	trietylamín
TFA	kyselina trifluoroctová
TLC	chromatografia na tenkej vrstve
TRIS	2-amino-2-(hydroxymetyl)propan-1,3-diol, trometamol, trisaminol
$\alpha$ -CD	alfa-cyklodextrín
$\beta$ -CD	beta-cyklodextrín
$\gamma$ -CD	gama-cyklodextrín

## Abstrakt

Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Kandidát: Monika Janetková

Školiteľ: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. Radim Vespalec, DrSc.

Názov práce: Využití HPLC v chirálných separáciách III.

Bórové klastre sú kompletne syntetické anorganické štruktúry jedinečných vlastností, ktoré si razia cestu medzi organickými molekulami zvyčajne používanými v medicíne. Základná štruktúra je tvorená atómami bóru a vodíka, ktoré v priestore vytvárajú mnohosten s trojuholníkovými plochami. Väzba medzi atómami B-H-B je trojstredová a atómy spája len jeden elektrónový pár. Zdieľaný mrak elektrónov je príčinou pseudoaromatického charakteru a delokalizovaného negatívneho náboja štruktúry. Bóry neutrálnych klastrov majú tendenciu uvoľňovať protón vodíka za vzniku aniontu, a to v protických aj aprotických rozpúšťadlách. Typická je vysoká lipofilita, stabilita voči metabolickým pochodom v organizme a tepelná odolnosť. V praxi sú najvyužívanejšími *closo-*, *nido-* a *arachno-*karborány líšiac sa priestorovým usporiadaním s 11-12 vrcholmi. Bórové klastre sú vysoko symetrické molekuly, u ktorých endo- aj exoskeletálna substitúcia narušuje symetriu klastru za vzniku enantiomérov.

V súčasnosti sú využívané ako stereoselektívne kalatyzátory, rádiofarmaka, extrakčné činidlá pri odstraňovaní rádioaktívneho odpadu a tvorbe stacionárnych fáz pre plynovú chromatografiu. Zúročiť charakteristické vlastnosti klastrov ako je metabolická stabilita, rigidita štruktúry, lipofilita a delokalizovaný negatívny náboj možno vo farmácii v úlohe farmakoforov, kedy v molekule liečiva zvyčajne nahradzujú fenyl alebo heterocyklus za účelom modifikácie vlastností molekuly.

Z dôvodu rastúceho záujmu o bórové klastre, ich predpokladom k vzniku enantiomérov a významu chiralít vo farmácii je preštudovanie ich správania v HPLC systéme a stanovenie vhodných podmienok pre chirálnu diskrimináciu nevyhnutnosťou. V centre záujmu tejto práce je nezrovnalosť medzi výsledkami získanými kapilárnou elektroforézou a HPLC, kedy sa kapilárna elektroforéza s použitím  $\beta$ -cyklodextrínu ako chirálneho selektoru javila ako vhodný systém pre chirálnu separáciu niektorých aniontov, avšak pomocou HPLC sa chirálna diskriminácia aniontov doposiaľ nepodarila. Ďalej sme sa zamerali na ostatné faktory ovplyvňujúce chirálnu diskrimináciu testovaných aniontov a zwitteriontu (predovšetkým modifikáciu mobilných fáz a využitie ďalších chirálnych stacionárnych fáz).

## Abstract

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University

Candidate: Monika Janetková

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

Consultant: doc. Ing. Radim Vespalec, DrSc.

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

Boron cluster compounds are completely synthetic inorganic structures possessing unique properties. Exceptional characteristics allow them to prove competent among organic molecules predominantly used in medicine. Basic structure is made of boron and hydrogen atoms forming three-dimensional polyhedron with triangular planes. The atoms B-H-B are forming electrondeficient three-centred two-electron bond. Cloud of electrons that is shared inside polyhedron structure is the cause of delocalized negative charge of a whole molecule. Boron cluster compounds are likely to lose hydrogen proton in both, protic and aprotic solvents, ending in formation of an anion. Among their typical characteristics belong extreme hydrophobicity, metabolic and thermal stability. Considering stability and reactivity *closo*-, *nido*- and *arachno*-clusters with 11-12 vertices are largely used. Either of endo- or exoskeletal substitution might impair symmetry of a boron cluster molecule resulting in a formation of a chiral species.

Nowadays boron cluster compounds are used as radiopharmaceuticals, stereoselective catalysts, extract reagents in disposal of radioactive waste and in production of thermally stable stationary phases for gas chromatography. The usage of boron cluster compounds as pharmacophores is brought about their properties such as metabolic stability, rigidity of the structure, hydrophobicity, delocalised negative charge. They usually replace phenyl ring or heterocycle in order to modify characteristics of a molecule.

Owing to growing interest in boron cluster compounds, their predisposition to formation of enantiomers and the importance of chirality in pharmaceutical industry there is a need for deeper study of appropriate conditions for chiral discrimination in HPLC. The aim of this work was to elucidate discrepancy between the ability of a chiral discrimination of a cluster anions using capillary electrophoresis and HPLC. Capillary electrophoresis using  $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector proved to be able to provide separation of boron cluster anions. Furthermore we explored various conditions (constitution of mobile phase and chiral stationary phases) that might influence chiral separation of tested anions and zwitterion.

## 1. Úvod

Bórové klastre sú kompletne syntetické anorganické štruktúry jedinečných vlastností, ktoré si razia cestu medzi organickými štruktúrami zvyčajne používanými v medicíne.

V súčasnosti sú využívané ako stereoselektívne kalatyzátory, rádiofarmaka, extrakčné činidlá pri odstraňovaní rádioaktívneho odpadu a tvorbe stacionárnych fáz pre plynovú chromatografiu. Zúročiť charakteristické vlastnosti klastrov ako je metabolická stabilita, rigidita štruktúry, lipofilita a aj delokalizovaný negatívny náboj možno vo farmácii v úlohe farmakoforov, kedy v molekule liečiva zvyčajne nahradzuje fényl alebo heterocyklus za účelom modifikácie vlastností molekuly.

V centre záujmu tejto práce je nezrovnalosť medzi výsledkami získanými kapilárnou elektroforézou a HPLC, kedy sa kapilárna elektroforéza s použitím  $\beta$ -cyklodextrínu ako chirálneho selektoru javila ako vhodný systém pre chirálnu separáciu niektorých aniontov, avšak pomocou HPLC sa chirálna diskriminácia aniontov doposiaľ nepodarila. Ďalej sme sa zamerali na ostatné faktory ovplyvňujúce chirálnu diskrimináciu testovaných aniontov a zwitteriontu (hlavne modifikáciu mobilných fáz a využitie ďalších chirálnych stacionárnych fáz).

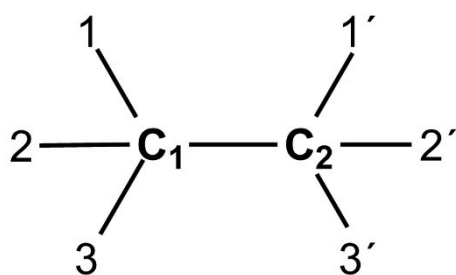
## 2. Teoretická časť

### 2.1. Chiralita a enantioselektívna separácia

Molekulárna chiralita bola popísaná už v polovici 19. storočia, kedy Louis Pasteur zaoberajúci sa kryštalografiou a optickou rotáciou zistil, že niektoré kryštály kremeňa vykazujú ľavotočivú a iné pravotočivú morfológiu. Svojou prácou naviazal na pozorovania Biota, ktorý študoval rotáciu polarizovaného svetla nekryštalizujúcimi organickými zlúčeninami, či Araga a Haiya zaoberajúcich sa rotáciou polarizovaného svetla kremennými kryštálmi. Louis Pasteur bol zároveň prvým, kto oddelil (ručne) a skúmal dva enantioméry, konkrétne enantioméry soli kyseliny hroznovej na základe rozličnej kryštalickej morfológie. Fenoménu chiralitu sa aj naďalej venoval vo svojej vedeckej práci a štvrt'oročie po jeho objave bol identifikovaný a popísaný asymetrický uhlík ako nositeľ molekulej chiralitu.[1] Chiralita je priestorovou vlastnosťou mnohých molekúl a nadmolekulárnych štruktúr, ktoré nás bežne obklopujú (napr. aminokyseliny, cukry, nukleosidy...). V prírode môžeme sledovať preferenčnú syntézu, interakciu, metabolizmus aj vylučovanie jedného z enantiomérov, čo odpozoroval už Pasteur na preferenčnom kvasení jedného z enantiomérov kyseliny hroznovej. Podanie xenobitika do chirálneho prostredia akým je organizmus vedie k otázkam o jeho absorpcii, metabolizme, účinku a vylučovaní. V súčasnosti je povinné preskúmať každý existujúci enantiomér molekuly, ktorá má byť použitá ako liečivo. Cieľom je zaistiť účinnú a bezpečnú terapiu pre pacienta. S povinnosťou skúmania vlastností a účinkov enantiomérov úzko súvisí potreba rozvoja metód, ktoré umožnia identifikovať a kvantifikovať jednotlivé enantioméry, a to ako v analytickom, tak preparatívnom merítku.[1, 2, 3]

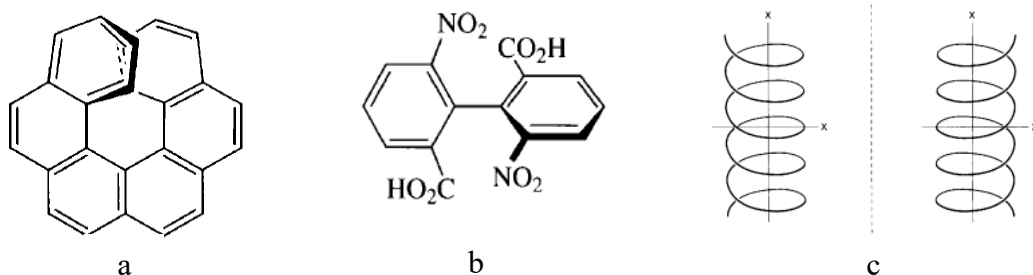
#### 2.1.1. Stereoizoméria a súvisiace názvoslovie

Izoméry sú molekuly s rovnakým chemickým vzorcom líšiac sa buď priestorovým usporiadaním molekuly (priestorové izoméry) alebo poradím (organizáciou) atómov v molekule (konštitučné izoméry). Medzi priestorové izoméry (stereoizoméry) patria enantioméry a diastereoméry. Enantioméry sú nestotožiteľné zrkadlové obrazy a v achirálnom prostredí majú rovnaké fyzikálne aj chemické vlastnosti (s výnimkou smeru stočenia roviny polarizovaného svetla, avšak platí, že hodnota stočenia ostáva zachovaná). Zmes enantiomérov v pomere 1:1 sa nazýva ako racemát/ racemická zmes a nevykazuje optickú aktivitu. Chirálny diastereoméry môžu obsahovať dve a viac centier chiralitu, nie sú vzájomne zrkadlovými obrazmi a rovnako ako v prípade enantiomérov sú molekuly nestotožiteľné. Diastereoméry majú odlišné chemické a fyzikálne vlastnosti. Vzťah medzi enantiomérmi a diastereomérmi zobrazuje Obr.1.[1, 4, 5]



**Obr. 1** pokiaľ predpokladáme asymetrickú substitúciu na oboch uhlíkoch, potom po určení priestorového usporiadania podľa Cahn-Ingold-Prelog konvencie môžu existovať 4 stereoizoméry: (1S,2S), (1R,2R), (1S,2R), (1R,2S). Stereoizomérne dvojice (1S,2S) a (1R,2R), (1R,2S) a (1S,2R) sú vo vzájomne enantiomérom vzťahu. Ostatné možné kombinácie stereoizomérov sú diastereomémi.

Chiralita je geometrická vlastnosť molekuly popisujúca jej (a)symetriu. Najčastejšie je zdrojom chiralít asymetrická substitúcia jedného alebo viacerých atómov. Zvyčajne je týmto atómom (stereogénnym centrom) uhlík, na ktorý sú naviazané 4 rôzne substituenty. Centrom môže byť aj dusík, síra, kremík, germánium, cín, alebo fosfor. S rastúcim počtom chirálnych centier stúpa počet stereoizomérov, ktoré môže molekula poskytnúť (celkový počet stereoizomérov možno získať jednoduchým výpočtom:  $2^n$ , kde  $n$ =počet centier chiralít). Chiralita nieje záväzne spätá len s prítomnosťou stereogénneho centra, ide o zmenu v symetrii molekuly dostatočne stabilnú pre existenciu dvoch a viac stereoizomérov (Obr. 2). Príkladom môže byť hexahelicén, u ktorého je tvorba enantiomérov dôsledkom napätia v štruktúre kruhu. Uvoľnenie napätia posunutím jedného z kruhov mimo roviny vedie k vzniku ohybu a na základe smeru stočenia je možné rozlíšiť enantioméry (Obr. 2a). Rovnako napohľad achirálna molekula *o*-substituovaného bifénylu môže byť chirálnou, pokiaľ je substitúcia na cykloch dostatočne odlišná a veľká, aby zabránila rotácii kolo jednoduchej väzby (Obr. 2b). Ďalším príkladom je DNA, u ktorej je zdrojom asymetrie smer zatočenia štruktúry (Obr. 2c).[5]

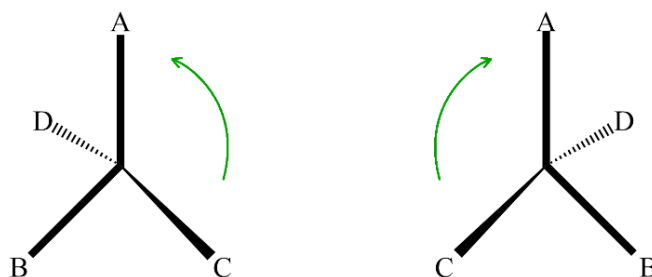


**Obr. 2** a) helicén, b) *o*-substituovaný bifenyľ, u ktorého je obmedzená voľná otáčavosť okolo jednoduchej väzby, c) supramolekulárny helikálny systém (DNA) [5]

Najstaršia terminológia používaná pre popis chirálnych molekúl je založená na ich optickej aktivite. Pri stáčaní roviny polarizovaného svetla v smere hodinových ručičiek je enantiomér označovaný (+) *dextro*-rotatory, v prípade jeho stáčania v protismere

hodinových ručičiek je označovaný (-) *levo*-rotatory. Pretože tento popis nie je dostačujúci a nevystihuje priestorové usporiadanie na centre chiralít, využívame okrem označenia ( $\pm$ ) aj Cahn-Ingold-Preloovu konvenciu a Fisherovu projekciu.

Absolútna konfigurácia na stereogénnom centre je určovaná podľa Cahn-Ingold-Preloovu konvenciu na základe klesajúcej priority (klesajúceho protónového čísla) funkčnej skupiny naviazanej na chirálny atóm (Obr. 3). Za predpokladu, že sa na molekulu pozeráme v smere väzby, ktorá vedie k skupine s najnižšou prioritou (D), potom pokles priorit substituentov v smere hodinových ručičiek označujeme ako (R) = *rectus*/ pravý a v protismere pohybu hodinových ručičiek ako (S) = *sinister*/ ľavý.



**Obr. 3** R-enantiomér stáčajúci rovinu polarizovaného svetla v smere hodinových ručičiek (na obrázku vpravo) a S-enantiomér stáčajúci rovinu polarizovaného svetla v protismere hodinových ručičiek (na obrázku vľavo)

Fisherova projekcia je v praxi využívaná najmä pre popis sacharidov a aminokyselín. Hlavný reťazec molekuly je zakreslený zvislou priamkou (väzby smerujúce za nákras). Väzby zakreslené horizontálne smerujú pred nákras a v mieste preťatia s vertikálnou priamkou je chirálny atóm, ktorého konfiguráciu posudzujeme. V prípade prítomnosti viacerých stereogénnych centier je nutné posudzovať každé zvlášť. V závislosti od polohy -OH sa centrum označuje sa ako "D" (skupina je napravo) alebo "L" (skupina je naľavo). Pre popis supramolekulárnych helikálnych systémov možno smer otáčania molekuly vyjadriť ako (P) = plus/ pravotočivý alebo (M) = mínus/ ľavotočivý.[4, 6, 7, 8]

### 2.1.2. Význam chiralít a enantiomérskej separácie vo farmácii

Význam enantioseparácie vo farmácii úzko súvisí s úlohou a prítomnosťou chiralít v prírode. Pri pohľade na stereocharakter základných stavebných jednotiek (aminokyseliny, proteíny, karbohydráty, nukleosidy), sekundárnych produktov rastlín, enzýmov, hormónov alebo receptorov môžeme sledovať preferenciu tvorby a interakcie s jedným z enantiomérov (L-aminokyseliny, D-cukry, pravotočivá závitnica DNA, atď.). U liečiv sa rozdiel v priestorovom usporiadaní môže prejaviť vo farmakokinetike, farmakodynamike, imunologickom aj toxickom účinku. Tento fenomén je vysvetľovaný



trojbodovou interakciou, kedy je odlišné priestorové usporiadanie molekuly zodpovedné za rozdielnu interakciu s cieľovým miestom. Líšiť sa môže sila interakcie, a tým doba a intenzita účinku liečiva alebo môže molekula vyvolať úplne inú reakciu organizmu. Enantioméry môžu mať zhodné farmakologické vlastnosti (flekainid, cyklofosfamid), v niektorých prípadoch je jeden z enantiomérov menej aktívny (D-tyroxin, R-amlodipín), neaktívny (R-omeprazol) alebo škodlivý (S-talidomid, D-DOPA). Väčšinou ide zmena farmakologického účinku ruka v ruke s prítomnosťou a incidenciou nežiadúcich účinkov. U niektorých liečivých látok dochádza ku konverzii enantiomérov *in vivo* (napr. ketoprofén, ibuprofén, thalidomid). Všetky tieto rozdiely a riziká nás vedú k rozvoju a používaniu metód umožňujúcich detekciu, popis a následné použitie bezpečného a účinného prípravku.[6] Na začiatku 90. rokov 20. storočia vydala americká FDA (Food and Drug Administration) nasledovaná ďalšími krajinami smernice, na základe ktorých bolo nutné dokladovať dopad chiralít molekuly na farmakologický a toxikologický efekt liečivej látky. Ďalšou sledovanou vlastnosťou je stereochemická stabilita *in vivo* a v priebehu skladovania. Tieto opatrenia majú viesť najmä k zvýšeniu bezpečnosti terapie.[2, 3, 6]

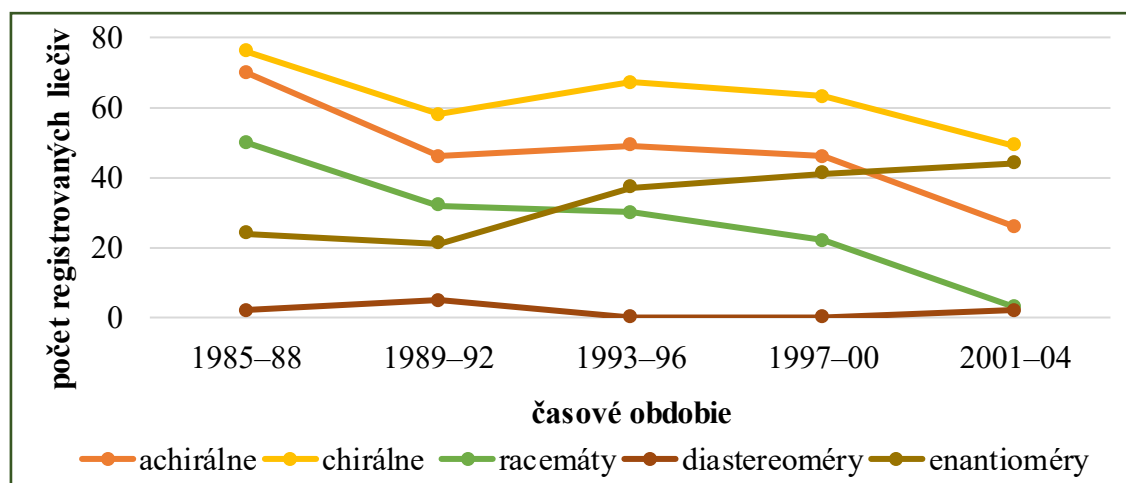
Štúdium farmakokinetiky a farmakodynamiky jednotlivých enantiomérov nám umožňuje použiť vhodnejší z nich (tzv. eutomér) a docieľiť tak žiaduci efekt, znížiť dávku potrebnú pre dosiahnutie účinku, zmierniť alebo až eliminovať niektoré nežiadúce účinky a toxicitu pre pacienta. Vzťah koncentrácie látky v plazme a dávky sa môže stať ľahšie predikovateľným a môže dôjsť k zníženiu množstva interakcii s ostatnými liečivami. Enantiomér s odlišnými, nežiadúcimi, nevýhodnejšími, alebo nedostačujúcimi účinkami označujeme ako distomér. Dôsledky stereoizomérie na chovanie liečiva v organizme boli popísané u viacerých farmakodynamických skupín liečiv- antibiotík, chemoterapeutík, antipsychotík, antirevmatik, atď.[6, 7, 9] Praktickými príkladmi tohoto vzťahu je D-tyroxín, ktorý v porovnaní s L-tyroxínom dosahuje len 4% účinnosť a má vyššiu incidenciu nežiadúcich účinkov na srdce.[10] Porovnaním levobupivakainu a bupivakainu (racemát), bolo zistené, že anestetický efekt je síce zhodný, ale racemát vykazuje vyššiu kardio- a neurotoxicitu.[11] D-DOPA, narozdiel od L-DOPY používa nejako antiparkinsonikum, spôsobuje agranulocytózu.[6]

Trendom posledných rokov sa stáva tzv. chiral/ racemic switching, čo je používanie chirálne čistých izomérov (eutomérov), ktoré má viesť k zvýšeniu kvality a bezpečnosti terapie. Týka sa molekúl, ktoré už boli schválené a obchodované ako zmesi enantiomérov alebo diastereomérov, ale niekoľko rokov od uvedenia na trh došlo k ich prevedeniu na chirálne čisté prípravky. V roku 2001 tvorili prípravky s obsahom len jedného enantioméru viac ako 70 % liečiv, ktoré boli schválené FDA.[11] Celkový počet takýchto

prípravkov schválených medzi rokmi 2001 a 2011 bol 9.[12] Preskripčný úspech enantiočistých liečivých prípravkov potvrdzujú údaje z roku 2005, kde sa medzi desiatimi najpredpisovanejšími liečivami v USA objavilo 7 malých molekúl (z ktorých šesť bolo vo forme samotného enantioméru, lanzoprazol vo forme racemátu) a tri biomolekuly.[13] Pozíciu najpredpisovanejšieho inhibítora protónovej pumpy v USA si dlhodobo udržuje esomeprazol (Nexium– AstraZeneca), ktorý sa v roku 2015 zaradil medzi 20 najziskovejších prípravkov na lekárske predpis a je nástupcom omeprazolu (Prilosec– AstraZeneca), ktorého patent skončil v roku 2002.[14, 15]

Skutočný terapeutický prínos prípravkov s obsahom jedného z enantiomérov je u rady molekúl z rôznych dôvodov spochybňovaný. Porovnávacie štúdie boli krátke (esomeprazol 8-24 týždňov), neboli porovnávané odpovedajúce množstvá účinných látok (escitalopram, R-salbutamol), porovnanie prebehlo len voči placebo (dexmetylfenidát, salbutamol, escitalopram), enantiomér dosahoval v preregistračných testoch výsledky nelíšiace sa od racemických prípravkov (levocetirizin, dexlanzaprazol) alebo nebolo možné vylúčiť manipuláciu dát s ohľadom na sponzorov. Výsledky naznačujú, že si výrobcovia pomocou enantioméru udržali postavenie na trhu, avšak pre pacienta táto (zvyčajne) drahšia liečba nieje prínosom z hľadiska účinku, tolerancie alebo bezpečnosti. V súčasnosti neexistuje záväzná metodika, na základe ktorej by účinok jednotlivého enantioméru mal byť porovnaný s jeho racemickým prekursorom.[2, 6, 10, 12]

Pohľad na stereoizomérny charakter liečiv registrovaných medzi rokmi 1985–2004 celosvetovo ukazuje Obr. 4. Napríklad v roku 2004 bolo schválených 16 syntetických liečiv, z ktorých 13 bolo na trh uvedených vo forme jednotlivých enantiomérov. Čísla ukazujú jasný trend preferencie enantioméru čistých prípravkov pred použitím racemátov.[3]

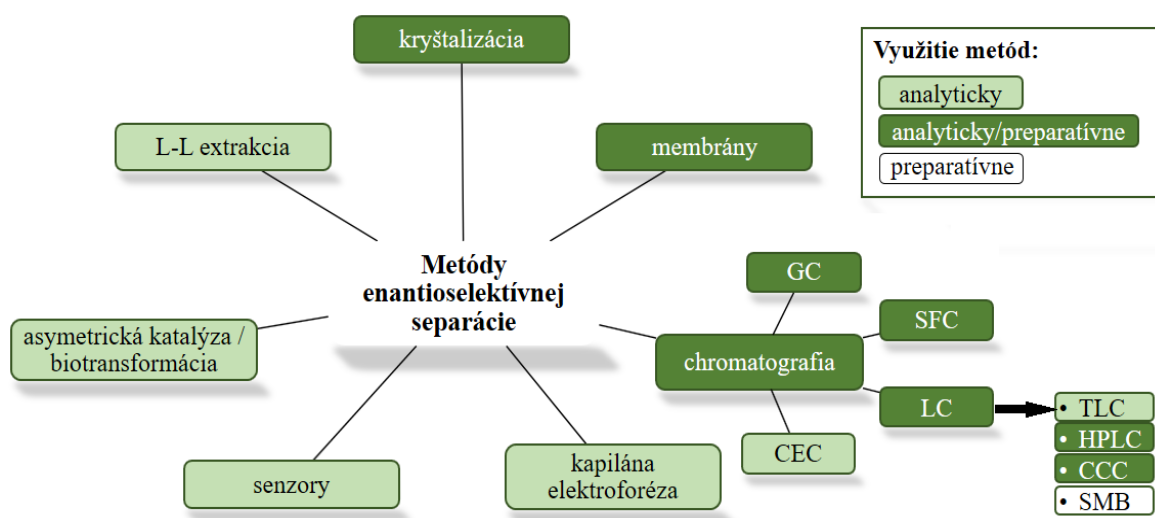


**Obr. 4** stereoizomérny charakter liečiv schválených celosvetovo (1985–2004), prevzaté a upravené [3]

Okrem farmaceutického priemyslu je popis účinkov a vlastností, detekcia a separácia a použitie enantiomérov významnou súčasťou potravinového (ochucovadlá), kozmetického (parfémácia), elektrochemického, chemického a poľnohospodárskeho (agrochemikálie) priemyslu.[1, 2, 14]

### 2.1.3. Metódy separácie a detekcie enantiomérov

Potreba enantiomérovej separácie nás sprevádza ako pri syntéze, kde je produktom reakcie často zmes enantiomérov, tak aj pri získavaní látok semisynteticky, či z prírodných zdrojov. Príprava enantiočistého produktu so sebou prináša zvýšenie ceny syntézy a časovú náročnosť ako po stránke vývoja metódy, tak aj samotnej syntézy. Na druhej strane separácia racemickej zmesi znižuje výťažnosť reakcie v prípade, že je skutočne chcený len jeden z enantiomérov. Možnosťou ako tieto straty zmierniť je racemizácia a recyklácia nechceného enantioméru. Prehľad metód spolu s rozlíšením ich využitia ukazuje Obr. 5. Analytické metódy sú využívané k detekcii prítomnosti enantiomérov a/alebo ich množstva v zmesi. Preparatívne metódy umožňujú aj izoláciu produktu, v praxi je dôležité množstvo čistého enantioméru, ktoré dokážeme metódou získať.[2, 4]



Obr. 5 prehľad a využitie metód enantioselektívnej separácie; prevzaté a upravené [2]

#### 2.1.3.1. Kryštalizácia

Ide o metódu často využívanú v kombinácii s inou technikou (napr. SMB). Pretože kryštalizácia enantiomérov v odlišných kryštalografických sústavách nieje v prírode veľmi bežná, umocňuje sa transformáciou na soli za tvorby kryštalizujúcich diastereomérov. Kvôli zvýšeniu efektivity a zjednodušeniu procesu výberu vhodných činidiel pre kryštalizáciu žiadaného enantioméru, sa začali vytvárať sady obsahujúce zmesi rovnakých enantiomérov štruktúrne príbuzných kyselín, ktoré slúžia na rozlíšenie

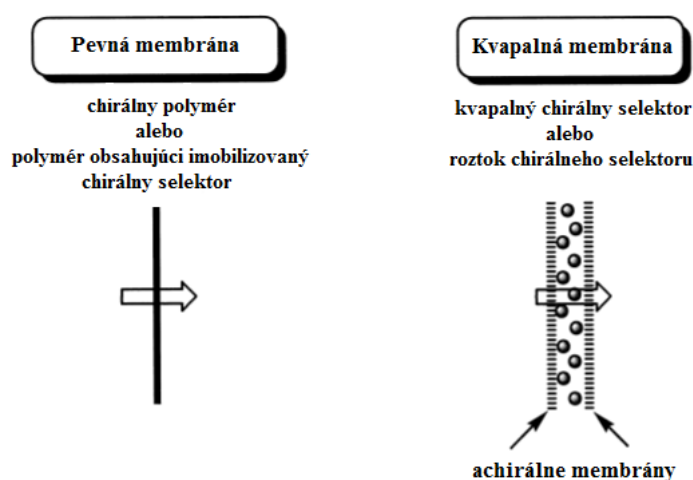
racemických zásad a naopak. Separáciu možno modifikovať aj pridaním chirálneho rozpúšťadla (väčšinou organický charakter, nevhodné pre polárne zlúčeniny) alebo zavedením kryštálu jedného z enantiomérov do roztoku.[2, 4]

### 2.1.3.2. Liquid-liquid extrakcia

Táto technika je výhodná vďaka nízkym nárokom na vybavenie. Pre chirálnu separáciu je nutné, aby distribúcia enantiomérov medzi oboma kvapalinami bola rovnaká a do jednej z kvapalných fáz bol pridaný selektor. Často využívaným selektorom je cyklodextrín. Vo fáze so selektorom dochádza k preferenčnej tvorbe komplexu s jedným z enantiomérov v dôsledku jeho priestorových vlastností a interakcií. Selektivita tejto reakcie udáva kvalitu chirálnej diskriminácie.[4, 16]

### 2.1.3.3. Membrány

Membrány (kvapalné alebo tuhé) umožňujú kontinuálnu separáciu, čo je výhodné najmä pre objemné separácie v priemysle. Membrána môže byť priamo chirálnym selektorom alebo obsahuje imobilizovaný chirálny selektor (pevná membrána). V prípade kvapalných membrán je tekutý chirálny selektor alebo jeho roztok ohraničený neselektívnou membránou, ktorá má len podpornú funkciu (Obr. 6).[2, 4]



Obr. 6 kvapalná a pevná enantioselektívna membrána; prevzaté a upravené [4]

### 2.1.3.4. Chromatografické metódy

**Kvapalinová chromatografia** (LC– liquid chromatography) zahŕňa metódy, pri ktorých je mobilnou fázou kvapalina a stacionárnou fázou pevná látka. LC môže byť prevádzaná nepriamo, pomocou chirálne čistého derivatizačného činidla, alebo priamo použitím chirálnej stacionárnej fázy (CSF), či mobilnej fázy (MF) s obsahom selektoru.

Pri nepriamej metóde dochádza reakciou s derivatizačným činidlom (enantiomérne čistá látka) k vzniku diastereomérov s odlišnými fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami, ktoré môžu byť ďalej rozdelené pomocou achirálného systému, kryštalizáciou alebo destiláciou. Nutnosťou je zaistenie vysokej čistoty derivatizačného činidla. Vo väčšine prípadov dochádza k tvorbe diastereomérnych amidov, karbamátov a derivátov močoviny. Medzi výhody tohoto postupu patrí možnosť zmeny v elučnom poradí analytov, lepšia detekcia u vybraných molekúl (aminokyseliny), nízka cena a dostupnosť achirálnych stacionárnych fáz. V súčasnosti je táto metóda potlačená do úzadia používaním CSF, kde odpadá riziko racemizácie, skracuje sa doba prípravy a nehrozí riziko vzniku viacerých (aj nežiadúcich) diastereomérnych produktov.

Pri priamej separácii je chirálny selektor súčasťou MF, základného roztoku elektrolytu alebo je imobilizovaný vo forme CSF. Selektor so separovaným analytom vytvára prechodné diastereomérne komplexy, pričom rozdielna interakcia jednotlivých enantiomérov vedie ku chirálnej diskriminácii. Pre vysvetlenie rozdielnej afinity k selektoru sa vďaka zrozumiteľnosti používa trojbodový model, podľa ktorého jeden z enantiomérov interaguje intenzívnejšie a/alebo do priestorového usporiadania zapadá lepšie. Použitie chirálneho aditíva v MF vedie k vyšším finančným nárokom na prevedenie separácie (kontinuálne privádzanie veľkého množstva často drahých aditív), problémy s detekciou, nízky počet teoretických priedhradok a asymetrické píky. [2, 8, 17, 18]

Metódy kvapalinovej chromatografie používané pre separáciu enantiomérov zahŕňajú protiprúdovú chromatografiu (countercurrent chromatography), chromatografiu na tenkej vrstve (thin layer chromatography), simulovanú protiprúdovú separáciu (simulating moving bed) a vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu (high pressure liquid chromatography).

**Chromatografia na tenkej vrstve (TLC)** je metóda použiteľná len v analytickom merítku, vývojová plocha je potiahnutá chirálnym selektorom, MF je zvyčajne tvorená zmesou organických kvapalín. Metódu možno využiť v predikcii vhodných chromatografických podmienok použiteľných v HPLC.

**Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)** je v súčasnosti metódou voľby. Používa najčastejšie chirálne stacionárne fáze, u ktorých analyt reaguje s chirálnym selektorom upevneným na silikagel, aminopropyl silikagel alebo polyméry. Jednotlivé enantioméry interagujú rôznou silou za tvorby prechodných komplexov, čo sa prejavuje na ich retencii. Výhodou je možnosť izolácie enantiomérov, určenia pomeru enantiomérov a nieje potrebná derivatizácia vzorky. Hlavnou nevýhodou je cena chirálnych stacionárnych fáz.

Chirálné rozlíšenie enantiomérov pomocou CSF závisí na jej schopnosti rozlične interagovať s jednotlivými enantiómami do takej miery, aby došlo k ich separácii. Mechanizmus predpokladá najmenej trojbodovú interakciu s analytom, z ktorých minimálne jedna je stereošpecifická. V závislosti na stacionárnej fázi a povahe enantiomérov sa na separácii podieľajú stérické vplyvy, tvorba inklúzných komplexov, vodíkové mostíky, dipól-dipól interakcie a  $\pi$ - $\pi$  interakcie. Porovnanie sily jednotlivých interakcií uvádza Tab. 1.[2, 17]

**Tab. 1** charakteristika molekulárnych interakcií podieľajúcich sa na chirálnej diskriminácii [19]

typ interakcie	sila interakcie	smer	dosah (d)
Coulumbove / elektrické sily	veľmi silná	A / R	stredný ( $1/d^2$ )
vodíkové väzby	veľmi silná	A	veľký
stérická zábrana	veľmi silná	R	veľmi malý
$\pi$ - $\pi$	silná	A / R	stredný
ion – dipól	silná	A	krátky
dipól – dipól	stredne silná	A	krátky ( $1/d^3$ )
dipól – indukovaný dipól	slabá	A	veľmi krátky
Londonove disperzné / van der Waalove sily	veľmi slabá	A	veľmi krátky ( $1/d^6$ )
Vysvetlivky: A- priťahlivý, R- repulzný/odpudivý, d- priemer			

**Protiprúdová chromatografia (CCC)** je systémom dvoch alebo viacerých nemiesiteľných kvapalín. Pôsobením odstredivej sily sa jedna z nich stáva stacionárnou fázou. Používa sa v analytickom aj preparatívnom merítku a chirálnu selektivitu možno dosiahnuť pridaním chirálneho selektoru k stacionárnej kvapalnej fázi.[4]

**Simulovaná protiprúdová chromatografia (SMB)** je metóda využívaná preparatívne vo farmaceutickom, petrochemickom a agrochemickom priemysle. Zabezpečuje separáciu látok vo väčších množstvách (>100 g), ale vyžaduje väčšiu počiatočnú investíciu. Skladá sa z cyklického systému tvoreného kolónami s adsorbentom a protiprúdovou separáciou. Enantioméry sa vďaka odlišnej afinite k stacionárnej fázi pohybujú v systéme rozličnou rýchlosťou (CSF– polysacharidy, polyakrylamidy, cykloextríny, selektory Pirklovho typu). Usporiadanie umožňuje kontinuálne

privádzanie zmesi a odoberanie produktu, čo je pre priemyselné využitie dôležitý faktor.[4, 13]

**Superkritická kvapalinová chromatografia (SFC)** využíva kvapalnú mobilnú fázu za teplôt a tlakov blížiacich sa alebo presahujúcich jej kritický bod. Čas analýzy sa skraca a znižuje sa spotreba rozpúšťadiel.[4]

**Plynová chromatografia (GC)** je technika separácie použiteľná pre dostatočne prchavé a zároveň stabilné racemáty, napr. inhalačné anestetiká. Nosný plyn je mobilnou fázou, selektorom je pevná stacionárna fáza, často modifikovaný cyklodextrín.[2, 4]

#### **2.1.3.5. Kapilárne elektroforéza (CE)**

CE je elektromigračná metóda využívaná v analytickom merítku, založená na pohybe nabitých (iontových) látok v elektrickom poli. Smer a rýchlosť migrácie častíc je závislá na ich náboji a pohyblivosti. Medzi jej výhody patrí krátky čas analýzy, malé objemy vzoriek (nl), detekcia sa prevádza na kapiláre a nie je nutná prítomnosť detekčnej cely, široký aplikačný potenciál, automatizácia a jednoduchý vývoj metódy. Chirálny selektor sa pridáva do roztoku základného elektrolytu a variácia podmienok umožňuje ľahko zmeniť elúciu enantiomérov. Vznikajúce komplexy enantiómér-selektor sa líšia stabilitou, nábojom a veľkosťou, čo sa odzrkadlí na ich pohyblivosti a dochádza k separácii. Ako selektory sa používajú cyklodextríny, crownethery, makrocyclické antibiotiká či polysacharidy.[1, 20]

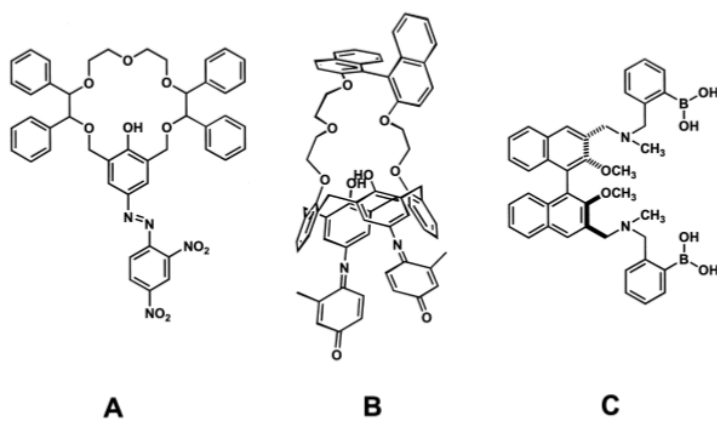
**Kapilárna elektrochromatografia (CEC)** sa považuje za hybridnú techniku, ktorá spája princípy separácie kapilárnej elektroforézy a vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Na rozdiel od HPLC prechádza analyt systémom na základe elektroosmózy (nie pod tlakom).[2]

#### **2.1.3.6. Asymetrická katalýza/ biotransformácia**

Dôležitosť tejto metódy rastie najmä v priemyselnom odvetví. Použitím samotného enzýmu, extraktu z bunky alebo celej bunky (najčastejšie mikroorganizmu) možno dosiahnuť preferenčnú produkciu alebo spracovanie len jedného z enantiomérov.[2]

#### **2.1.3.7. Senzory**

Využitie senzorov pre rozlíšenie jednotlivých enantiomérov je v súčasnej dobe rozvíjajúca sa metóda, ktorá by umožnila určiť enantiomérenú čistotu pomocou zmeny farby alebo fluorescencie. Príklady molekúl fungujúcich ako enantioselektívne senzory uvádza Obr. 7.[2]



**Obr. 7** enantioselektívne molekulové senzory; (A) chromogénny senzor rozlišujúci chirálne amíny (B) chromogénny senzor rozlišujúci enantioméry phenylglycinolu (C) fluorescenčný senzor selektívny pre monosacharidy [2]

Ďalšie metódy: enantioselektívna destilácia, optické metódy (polarimetria, elektrónový cirkulárny dichroizmus, vibračný cirkulárny dichroizmus), gélová elektroforéza. [2]

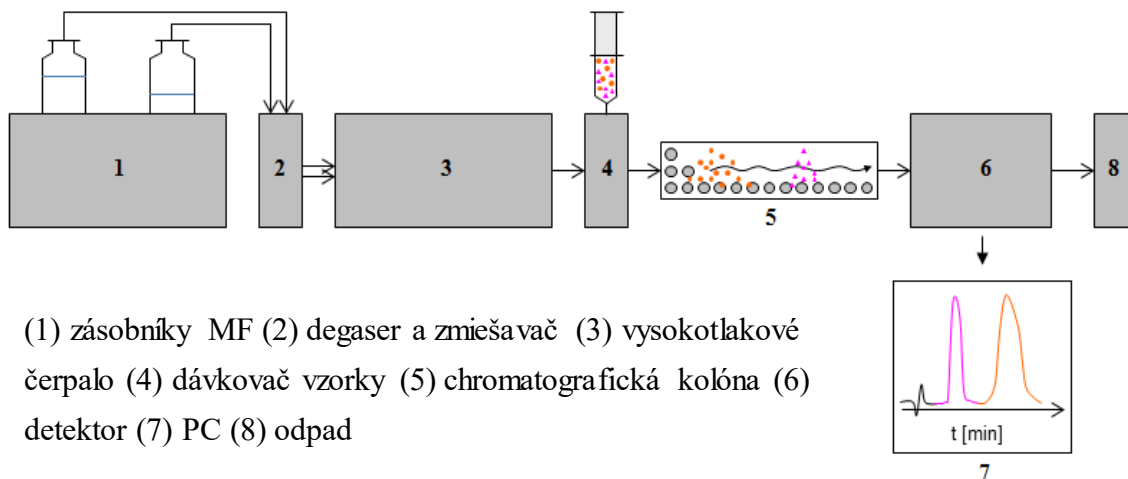


## 2.2. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

HPLC je široko využívanou separačnou metódou, ktorá je založená na ustáľovaní rovnováhy delených látok medzi mobilnou (kvapalina) a stacionárnou fázou (sorbent v kolóne). Separácia analytov a ich elúcia závisí na povahe mobilnej (MF) a stacionárnej fáze (SF). Látky s vyššou afinitou k stacionárnej fázi zotrúvajú dlhšie na kolóne a majú vyššiu distribučnú konštantu. Záznamom procesu je chromatogram, ktorý je závislosťou odozvy detektoru na čase.[8]

### 2.2.1. Inštrumentácia

Mobilná fáza je transportovaná zo zásobníkov (1) cez odplyňovač (degaser) (2) a zmiešavač MF do chromatografickej kolóny (5). Väčšina inštrumentácie je vyrobená z teflonu alebo nerezovej ocele pre dobré uzavretie a odolnosť voči vysokým tlakom vznikajúcim v systéme. Transport MF zabezpečujú vysokotlakové pumpy (3) (najčastejšie piestové). Dávkovanie vzorky na kolónu môže prebiehať automaticky (prevažuje) alebo manuálnymi smyčkovými dávkovačmi. Zmes MF a vzorky prechádza kolónou umiestnenou v termostatovanom priestore a detektorom (6). Signál je z detektora privádzaný a interpretovaný dátovou stanicou (počítač– PC) ako chromatogram (Obr.8). [1, 4, 7, 8]



Obr.8 schéma HPLC prevzatá a upravená [21]

### 2.2.2. Vybrané základné charakteristiky chromatografického procesu

Mrtvý čas  $t_0$  je retenčný čas analytu, ktorý nieje v kolóne nijak zadržávaný.

Retenčný čas  $t_R$  je doba od nástreku vzorky po maximum elučnej krivky.

Redukovaný retenčný čas  $t'_R$  je čas, ktorý strávi analyt v stacionárnej fázi, vid'. Obr 9.[8]

$$t'_R = t_R - t_0$$

Retenčný faktor  $k$  charakterizuje afinitu analytu k stacionárnej fázi. Vysoké hodnoty značia interakciu a zotrvanie analytu v SF.[22]

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

Distribučná konštanta  $K_D$  je pomerom rovnovážnej koncentrácie analytu v stacionárnej  $[A]_s$  a mobilnej fázi  $[A]_m$ . [8]

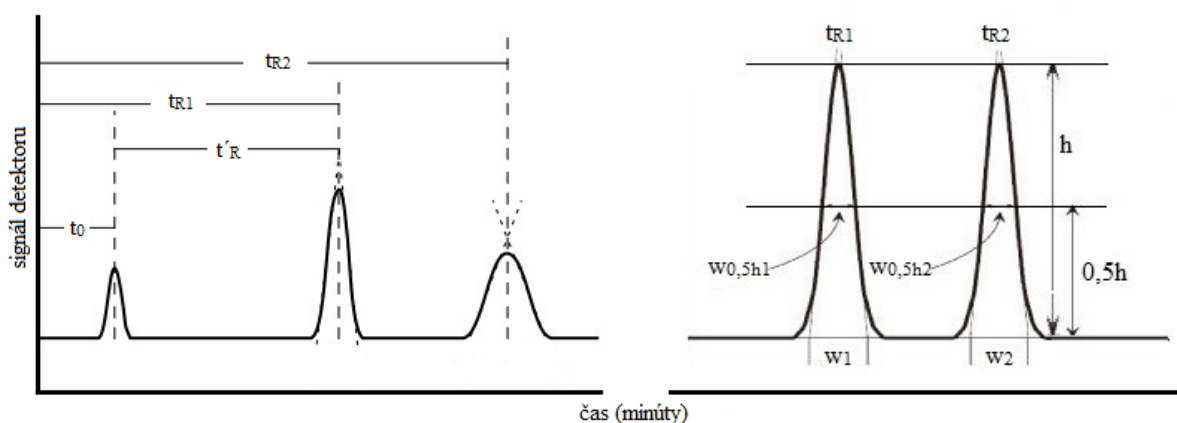
$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m}$$

Selektivita  $\alpha$  popisuje schopnosť systému rozlíšiť jednotlivé komponenty vzorky. Zvyčajne sa vyjadruje ako pomer retenčných faktorov ( $k_1$  a  $k_2$ ). [22]

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

Rozlíšenie  $R_s$  vyjadruje mieru separácie analyzovaných látok, úda sa ako podiel rozdielu retenčných časov ( $t_R$ ) a súčtu širok pík v polovici výšok ( $w_h$ ). Separácia by mala prebehnúť v prijateľnom čase a za vhodného rozlíšenia jednotlivých zložiek zmesi. Narozdiel od selektivity berie do úvahy aj účinnosť, ktorá je vyjadrená šírkou píku. Obr.10.[23]

$$R_{1,2} = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h1} + w_{h2})}$$



**Obr. 9** základné charakteristiky HPLC systému ( $t_0$ ,  $t_R$ ,  $t'_R$ ) prevzatý a upravený [24]

**Obr. 10** základné charakteristiky HPLC systému ( $w$ ,  $h$ ,  $t_R$ ) prevzatý a upravený [25]

### 2.3. Chirálna stacionárna fáza a chirálne selektory

Výber vhodného selektora pri vývoji metódy sa odráža od vlastností analyzovanej látky ako je rozpustnosť v rozličných kvapalinách, funkčné skupiny, prítomnosť objemného substituentu, schopnosť tvorby vodíkových mostíkov,  $\pi$ -interakcii a inklúzných komplexov. Dôležitú úlohu zohráva prítomnosť a rozloženie substituentov v blízkosti chirálneho centra, ktoré sú schopné interagovať s chirálnym selektorom. V prípade, že analyt takú skupinu nemá, je možná derivatizácia, kde prítomnosť ďalšieho substituenta zabezpečí ďalšie interakčné miesto pre chirálnu interakciu. Napriek možnosti odhadnúť vhodnosť kolóny pre analyt u stereoselektívnej separácie platí, že až pokus odhalí, či enantioseparácia prebehne.[1, 8, 17]

Základným mechanizmom umožňujúcim enantioselektívnu separáciu je tvorba diastereomérnych komplexov enantiomérov s chirálnym selektorom. Predpokladá sa preferenčná interakcia jedného z enantiomérov. Stručný prehľad najpoužívanejších CSF s jednotlivými typmi analytov, pre ktoré sú vhodné, módmi a interakciami, ktoré poskytujú zobrazuje Tab. 2.[4, 8, 17, 26]

**Tab. 2** prehľad najpoužívanejších stacionárnych fáz, druhy poskytovaných interakcií, podmienok pre enantioseparáciu a typy separovaných analytov

chirálny selektor	charakter analytu	hlavné typy interakcií analytu so selektorom	podmienky separácie
proteín	ionizovateľná skupina, aromatický kruh	hydrofóbne, elektrostatické	RP
cyklodextrín	planárne a aromatické skupiny	inklúzne komplexy, H-mostíky	RP, NP, PO
makrocyclický glykopeptid	kyslé, bazické, amfoterné a neutrálne, objemná skupina v blízkosti chirálneho centra	H-mostíky, dipól-dipól, stérické, hydrofóbne, $\pi$ - $\pi$ interakcie	RP, NP, PO
polysacharid	objemná skupina v blízkosti chirálneho centra,	H-mostíky, dipól-dipól, stérické, inklúzne komplexy, hydrofóbne, $\pi$ - $\pi$ interakcie	RP, NP
donor-akceptorový selektor (tzv. Pirklova)	aromatická skupina, tvorba H-mostíkov	dipól-dipól, H-mostíky, $\pi$ - $\pi$ interakcie	hlavne NP
crownéter	primárne amíny	inklúzna komplexácia, H-mostíky	vodné MF s nízkym pH
iontový menič	ionizovateľné skupiny v molekule	H-mostíky, $\pi$ - $\pi$ interakcie	RP, PO, NP

H-mostíky= vodíkové mostíky, NP= normálne-fázový mód, PO= polárne-organický mód, RP= reverzne-fázový mód

### 2.3.1. Proteínové stacionárne fáze

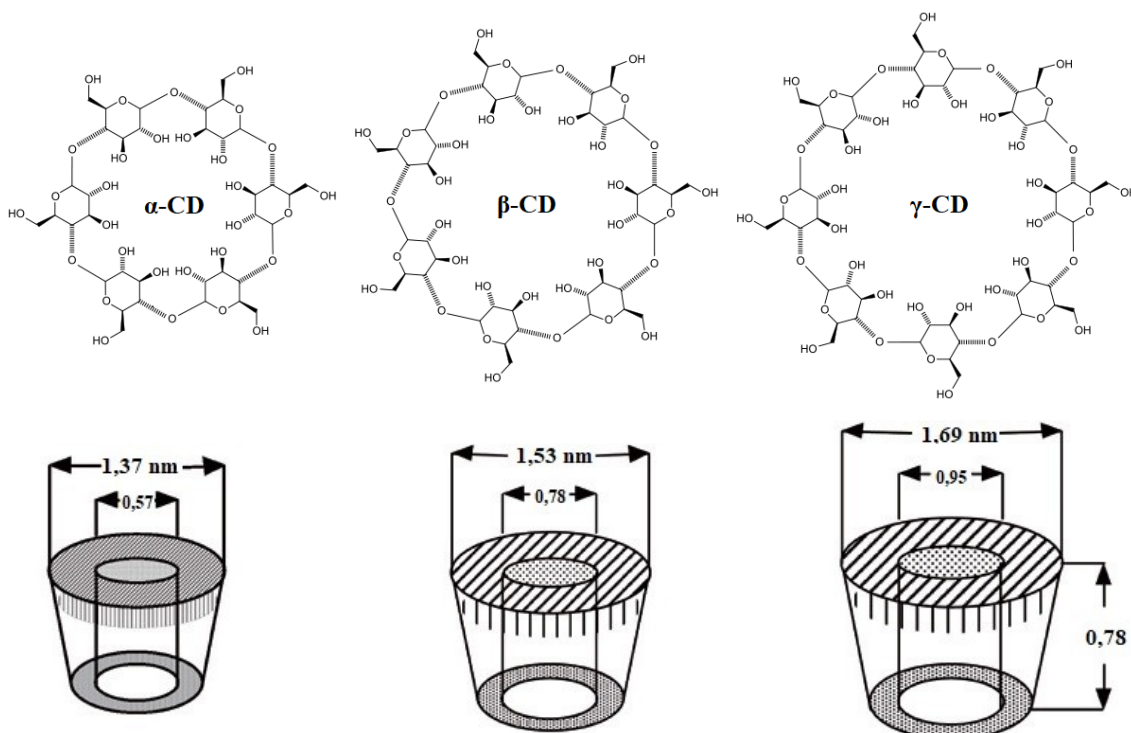
Proteíny v úlohe enantioselektívnej stacionárnej fáze umožňujú separáciu kyslých, bazických aj neutrálnych látok. Obmedzením v ich širšom použití je citlivosť na teplotu a vyššiu koncentráciu organickej zložky mobilnej fázy (denaturácia). Prevažné používanie vodných a vodne-organických MF urobilo z proteínových SF kolóny voľby pre tkanivá a telné tekutiny. Najpoužívanejšími sú: hovädzí sérový albumín (BSA), ľudský sérový albumín (HSA) a  $\alpha_1$ -kyslý glykoproteín (AGP), ďalej ovomucoid (OVM) a celohydroláza 1 (CBH 1). CBH 1 umožňuje separáciu najmä bazických molekúl a najvyužívanejšími v enantioseparácii sú AGP a OVM. Významným modifikátorom retencie je pH, ktorým je možné ovplyvniť ako náboj, tak čiastočne aj konformáciu proteínu. Ďalšia modifikácia je možná typom pufru, aditívami (alkylamíny, hydrofóbne karboxylové kyseliny, atď.) a obsahom organickej zložky. Interakcie s molekulami prebiehajú najmä prostredníctvom hydrofóbných a elektrostatických interakcií.[17, 27]

### 2.3.2. Cyklodextríny

Stacionárna fáza je tvorená cyklickými oligosacharidmi, ktoré sú produktom rozkladu škrobu prostredníctvom cyklodextrín glycozyltransferázy rôznych baktérií. Cyklus sa skladá z 6-8 glukozových zvyškov spojených  $\alpha$ -(1,4)glykozidickými väzbami. Ich spojením vzniká dutý kužel, ktorého vnútorná kavita je lipofilná a hydrofilný vonkajší okraj lemujú sekundárne hydroxylové skupiny. Výsledkom tohoto usporiadania je schopnosť tvorby inklúzných komplexov analytu a cyklodextrínu (CD), ktorá prebieha najmä v prítomnosti vody alebo zmesi vody a polárneho rozpúšťadla. Dôležitým faktorom je výber vhodnej veľkosti CD vzhľadom na veľkosť analytu. Zatiaľ čo alfa-cyklodextrín ( $\alpha$ -CD) slúži pre separáciu malých molekúl (maximálne 6-členný cyklus), najpoužívanejší beta-cyklodextrín ( $\beta$ -CD) sa uplatňuje u molekúl približne veľkosti naftalénu a gama-cyklodextrín ( $\gamma$ -CD) pre analyty obsahujúce 3 a viac aromatických kruhov. Ďalšie interakcie zahŕňajú van der Waalove a hydrofóbne sily, vodíkové väzby a lipofilné interakcie. V závislosti na derivatizácii sekundárnych hydroxylových skupín CD možno získať rozdielnu chirálnu diskrimináciu a meniť ich rozpustnosť. Cyklus je vo vode menej rozpustý ako porovnateľný lineárny dextrín, čo je výsledok silných väzieb medzi molekulami v kryštalickom stave. Substitúciou hydroxylových skupín je vysoká energia kryštálu narušená a rozpustnosť sa spočiatku (do substitúcie približne polovice hydroxylových skupín) znižuje, hoci je substituent lipofilný. Obr. 11 zobrazuje veľkosť a štruktúru jednotlivých CD využívaných v enantioseparácii. Výhodou je možnosť použiť CSF v normálnom, reverznom aj polárne-organickom móde. Ich široké uplatnenie v chirálnej diskriminácii je výsledkom

dobrej rozpustnosti, dostupnosti, existencie viacerých veľkostí a množstva derivátov, nízkej toxicity a nízkej absorpcie.[1, 8, 17, 18, 20, 28]

Okrem enantioseparácie sa CDs vo farmaceutickom priemysle využívajú aj pre zlepšenie perorálnej biodostupnosti liečiv skupiny II (nízka rozpustnosť, vysoká permeabilita), avšak u liečiv I (vysoká rozpustnosť, vysoká permeabilita) a III skupiny (vysoká rozpustnosť, nízka permeabilita) môže byť naopak dostupnosť narušená. V potravinovom priemysle sa CDs využívajú na redukciu nepríjemných pachov a chutí, v kozmetike sa uplatnili ako stabilizátory chemicky labilných látok, na zníženie lokálneho dráždenia a aj pre minimalizáciu nepríjemných vôní.[28]



Obr. 11 štruktúra a veľkosť jednotlivých typov CD [29,30]

### 2.3.3. Cyklofruktany

Selektor je tvorený  $\beta(2 \rightarrow 1)$  D-fruktofuranozovými jednotkami usporiadanými v cykle. Sú produktom cykloinulo-oligosacharidovej fruktanotransferázy rozkladajúcej inulín. Využívajú sa prevažne deriváty, napríklad čiastočná derivatizácia alifatických alebo aromatických karbamátov vedie k vzniku dobrého selektora primárnych amínov.[18]

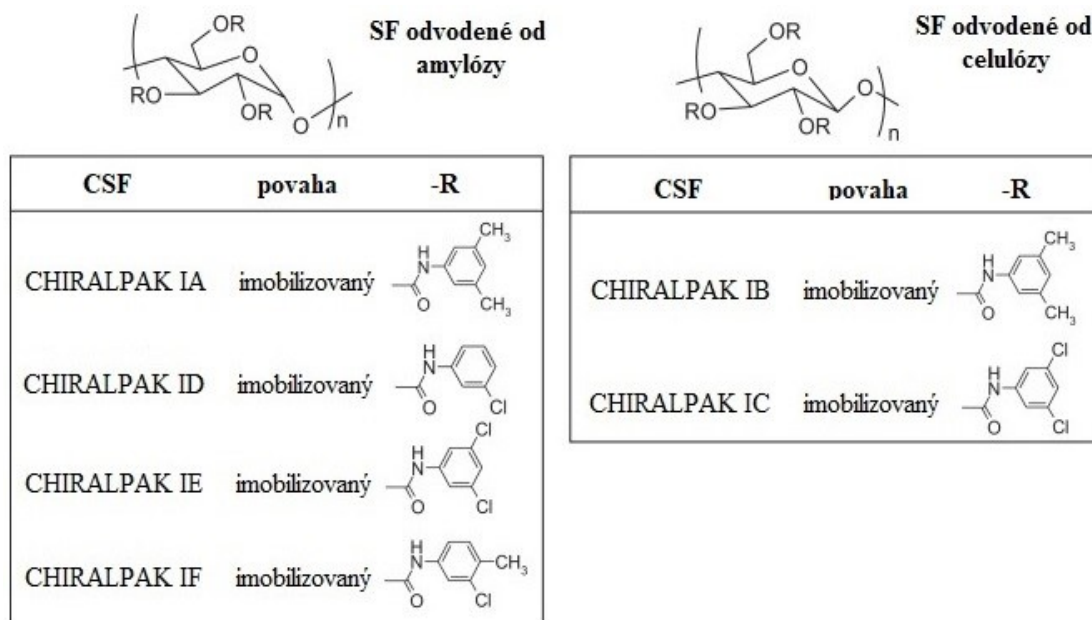
### 2.3.4. Makrocyclické glykopeptidy

Chirálnym selektorom makrocyclických fáz je glykopeptidové antibiotikum kovalentne naviazané na silikagel, konkrétne vankomycín, teikoplanín, ristocetín A alebo aglykon teikoplanínu. Vysoká pravdepodobnosť tvorby diastereomérnych komplexov je daná

štruktúrou a prítomnosťou množstva funkčných skupín. Vankomycín poskytuje 18 chirálnych centier, teikoplanín až 23. Heptapeptidový aglykon tvoriaci jadro a poprepájané aromatické zvyšky vytvárajú košík s menšími preliačninami poskytujúcimi priestor pre inklúziu enantioméru a následnú interakciu. Vzhľadom na širokú škálu funkčných skupín, ionizovateľných skupín a chirálnych centier sa na separácii podieľajú vodíkové väzby, hydrofóbne interakcie, sterické a  $\pi$ - $\pi$  interakcie. Využiteľné sú v reverznom, normálnom aj polárne-organickom móde. Selektivita je ovplyvňovaná zložením a pH MF, teplotou, typom a koncentráciou organického modifikátora. [4, 8, 17, 18]

### 2.3.5. Polysacharidy

Napriek optickej aktivite a asymetrickej štruktúre amyulózy a celulózy sa samostatne ako chirálne selektory neuplatnili, a to najmä kvôli nízkej selektivite. V dôsledku rozdielnej konformácie je amylóza popisovaná ako enantioselektívnejšia a reverzný mód ako obecné výhodnejší. V praxi sa využívajú ich deriváty (Obr. 12), najmä karbamáty (3,5-dimetylfenylkarbamát). Široké možnosti derivatizácie urobili z polysacharidov jedny z najvšestrannejších a najpoužívanejších chirálnych selektorov. Väzba selektora na sorbent kolóny (silikagel) môže byť kovalentná alebo sú deriváty na nosič nanosené (coating). Coating SF prináša obmedzenia pri výbere MF, z dôvodu rozpúšťania naadsorbovaného selektora.[4, 8, 18]



**Obr. 12** polysacharidové CSF s obchodnými názvami, prevzaté a upravené [31]

### 2.3.6. Donor-akceptorové stacionárne fáze

Sú nazývané ako Pirklove alebo brush-type fáze a sú výsledkom systematického štúdia chiralít, chirálneho rozlíšenia a princípu reciprocít (pokiaľ je chirálna látka A schopná separovať enantioméry látky B, potom je aj látka B schopná enantioselektívne separovať zmes enantiomérov látky A). Selektorom je chirálna, neutrálna, zvyčajne syntetická nízkomolekulárna látka. Efektivita separácie klesá pri použití reverzného alebo polárne-organického módu, a to kvôli dôležitosti neiontových elektrostatických interakcií a tvorbe vodíkových mostíkov. Elučné poradie enantiomérov môže byť zamenené voľbou enantioméru tvoriaceho selektor SF.[17, 18]

### 2.3.7. Iontové meniče

SF je tvorená ionizovateľným selektorom, rovnako musí byť separovaná chirálna látka ionizovateľná. Sú považované za podskupinu donor-akceptorových (Pirkových) fáz. Kationtové SF sú založené na aminosulfonových kyselinách, aniontové na derivátoch alkaloidov chinovníka, zwitteriontové SF sú vhodné pre separáciu kyselín, zásad a zmesí zwitteriontov. Vplyv na selektivitu a retenciu má pH (RP mód), pomer kyselina/báza (PO mód), druh a množstvo organického rozpúšťadla (RP a PO mód).[17, 18]

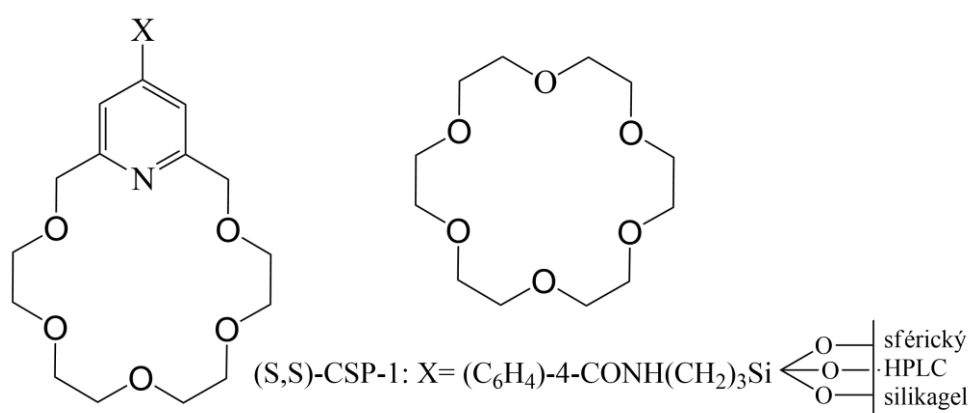
### 2.3.8. Syntetické polyméry a molekulárne imprintované polyméry

Chirálny selektory možno získať radikálnou polymerizáciou chirálnym monomérom alebo sparteínom-katalyzovanou aniontovou polymerizáciou za vzniku helikálnych polymérov. V závislosti od postupu môže polymerizácia prebiehať priamo na silikagelovej častici ("grafting from") alebo je možné pripravený polymér následne pripievať k nosiču ("grafting on"). Chirálny rozlíšenie je výsledkom sterických faktorov,  $\pi$ - $\pi$  interakcií aj smeru zatočenia makromolekuly.[18]

Molekulárne imprintované polyméry sú výsledkom polymerizácie v prítomnosti predlohy molekuly. Po extrahovaní predlohy je získaný selektor s kavitami, ktorý interaguje s konkrétnym analytom alebo skupinou štruktúrne podobných látok. V prípade racemátu je enantiomér použitý ako predloha vždy viac zadržovaný. Na chirálnej diskriminácii sa podieľa priestorové usporiadanie interagujúcich skupín. Elučné poradie je už vopred stanovené. Použitie je možné ako v HPLC, tak aj CEC s častým výskytom nízkej efektivity, tailingu pík a nízkou kapacitou. Ďalším využitím je ich zabudovanie do pôvodne neselektívnej membrány ako selektora.[2, 18]

### 2.3.9. Crownétery

SF je tvorená makrocyclickým polyéterom obsahujúcim etylenoxidové mostíky (Obr. 13), ktorých počet určuje veľkosť kavity crownéteru. Enantioselektivitu získavajú tieto fáze zavedením chirálnej molekuly do ich štruktúry. Využívajú sa najmä pre separáciu molekúl obsahujúcich voľnú primárnu aminoskupinu, čo si vyžaduje dostatočnú protonizáciu rozpúšťadla (nízke pH 1-3,5). Tá umožní vzniknutým amónnym iontom inklúziu a následnú tvorbu komplexu prostredníctvom vodíkových mostíkov s molekulou kyslíka crownéteru. Kyslé pH chráni pred interakciou so silanolovými skupinami. Tieto podmienky však obmedzujú ich širšie využitie v enantioseparácii a uplatnenie si našli najmä v chirálnej diskriminácii protonovaných primárnych amínov.[8, 17, 18]



Obr. 13 základná štruktúra crownéteru a príklad enantioselektívnej modifikácie [32]

### 2.3.10. Ďalšie chirálne selektory

**Aptaméry** sú vysoko enantiošpecifické selektory. Aptamér interaguje s jedným z enantiomérov za tvorby tesného komplexu, zatiaľ čo druhý nevytvára tak intenzívny kontakt so selektorom. Na stereoselektivitu a tvorbu komplexu sa podieľajú vodíkové mostíky, elektrostatické interakcie, hydrofóbne interakcie,  $\pi$ - $\pi$  interakcie. Ako selektory boli otestované v systéme HPLC, CEC, CE a micelárnej elektrokinetickej chromatografii.[18]

**Kalixarény** sú syntetické molekuly, ktorých štruktúra je tvorená jednotkami fenolu spojenými metylenovými skupinami. Modifikáciou pôvodne achirálny štruktúry (zavedenie molekúl aminokyselín, alkaloidov chinovníka, cyklodextrínov...) vzniká priestor pre rôznu interakciu enantiomérov. V závislosti na substitúcii sa na separácii podieľajú iontové interakcie,  $\pi$ - $\pi$  interakcie a ďalšie. Pôvodná štruktúra vytvára svojím tvarom priestor pre inklúziu a hydrofóbnu interakciu. Využitie je možné v HPLC, CEC



aj GC. Molekuly odvodené od štruktúr kalixarénu zavedením chromofórov majú potenciál aj ako enantioselektívne senzory.[2, 18]

**Chirálné micely** sú monoménné chirálne surfaktanty v koncentrácii presahujúcej minimálnu micelárnu koncentráciu vo vodnom prostredí. V klasickej forme a aj vo forme polymérov sú pseudostacionárnymi fázami v micelárnej elektrokinetickej chromatografii.[18]

**Chirálné iontové kvapaliny** sú soli, ktoré sú pri izbovej teplote kvapalinami. Využitie našli v spektroskopických technikách, ale aj ako základné elektrolyty v CE, prídavky do MF v HPLC a stacionárne fáze v GC a HPLC.[18]

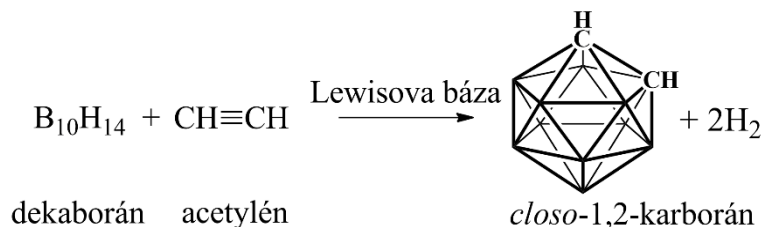
## 2.4. Bórové klastre

Bórové klastre (BCs) sú chemicky jedinečné anorganické látky, ktorých priestorový skelet je tvorený atómami bóru a vodíka. Boli pripravené synteticky a svojimi vlastnosťami sa nachádzajú na pomedzí anorganických a organických látok. Nositeľmi špecifických vlastností sú typické väzby, v ktorých tri atómy zdieľajú len 2 elektróny, čo vedie k vzniku zdieľaného mraku elektrónov, delokalizovanému negatívne naboju (pseudoaromatický charakter) a preferenčnej tvorbe trojdimenzionálnych štruktúr narozdiel od uhlíka, ktorý uprednostňuje tvorbu reťazcov. Typickými vlastnosťami je vysoká symetria štruktúr, tepelná a metabolická odolnosť, vysoká lipofilita a delokalizovaný negatívny náboj skeletu. Tvorba derivátov je možná exo- aj endoskeletálnou substitúciou s možnosťou modifikácie ich vlastností. [33, 36, 38, 44]

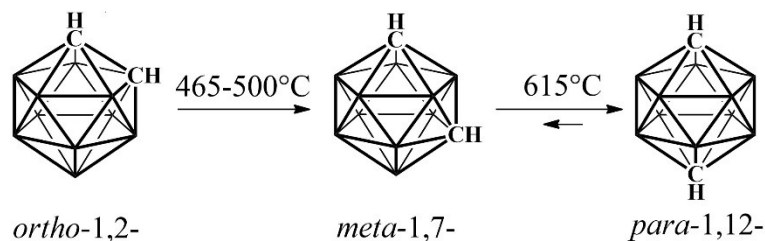
### 2.4.1. Syntéza

Trojdimenzionálna štruktúra BCs je tvorená mnohostenom, ktorého skelet sa skladá z atómov bóru a vodíka. Pre jasnosť a prehľadnosť štruktúr uvádzaných v práci vynechávam vodíky naviazané na atómoch bóru. Karbaborány/ karborány sú podskupinou bórových klastrov, ktoré obsahujú vo svojej štruktúre jeden alebo viac uhlíkových atómov. Metalokarborány obsahujú vo svojej skelete navyše atóm kovu.[33, 34]

Syntéza prvého karbaboránu (*closo*-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>12</sub>) prebehla v roku 1963 reakciou dekaboránu s acetylénom v prítomnosti slabej Lewisovej báze za vzniku *ortho*-1,2-karbaboránu (Obr. 14). Tepelnou izomerizáciou v inertnej atmosfére možno získať *meta*-1,7- (400-500°C) a *para*-1,12-deriváty (600-700°C) (Obr. 15). Ďalšie zvyšovanie teploty môže mať za následok rozpad molekuly.[34, 35, 36] Mechanizmus izomerizácie jednotlivých foriem pôsobením tepla vysvetľuje najuspokojivejšie Johnson et al.[37] Reakčným prostredím je toluén alebo acetonitril. V súčasnosti sú jednotlivé izoméry komerčne dostupné a v praxi sú uprednostňované pred použitím dekaboránu kvôli jeho výbušnosti, toxicite a nízkej výtlačnosti reakcie s acetylénom (40-60%).[35, 38]



Obr. 14 reakcia prvej syntézy *closo*-karboránu [36]



**Obr. 15** izomerizácia *o*-, *m*-, *p*-closo-karbaboránu [36]

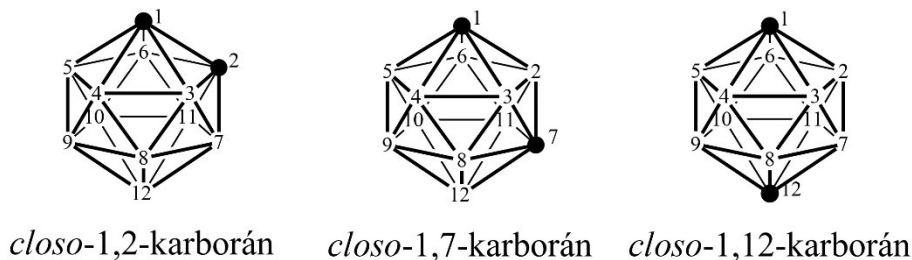
V závislosti na počte vrcholov a priestorovom usporiadaní rozoznávame 5 typov klastrov: *closo*-, *nido*-, *arachno*-, *hypho*- a *conjuncto*-borany.[39] Deriváty klastrov možno získať deboronačnými reakciami, kedy dochádza k odstráneniu jedného z najelektrofilnejších vrcholov a reakciami na uhlíku alebo bóre, pri ktorých sú zavádzané substituenty. Deboronizáciou *closo*-karbaboránu (12 vrcholov) použitím silnej Lewisovej zásady (napríklad alkoxidu) vzniká *nido*-klastor s 11 vrcholmi (Obr.16). Ďalšou možnosťou je náhrada atómu bóru skeletu iným atómom (C, N, Si, P, Se, kovy, atď.).[34, 35]



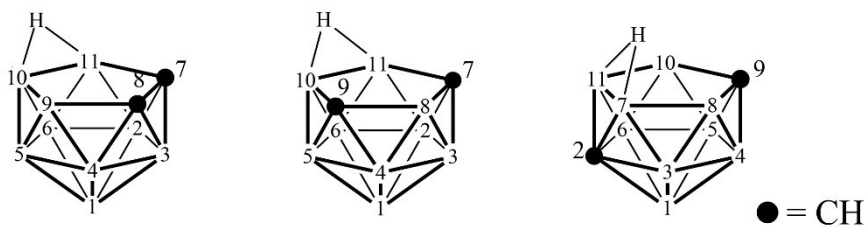
**Obr. 16** najbežnejšie typy priestorového usporiadania: *closo*- (“closed“) a od neho odvodené *nido*- (“nest“) a *arachno*- (“spider web“) [40]

#### 2.4.2. Názvoslovie

Základnou štruktúrou karboránov je *closo*-klastor, u ktorého číslovanie začína vrcholovým atómom s najnižším počtom väzieb, pokračuje v smere hodinových ručičiek so snahou dať prítomnému atómu uhlíka najnižšie možné číslo. Jednotlivé izoméry *closo*-karboránu a *nido*-karboránu aj s číslovaním uvádzajú Obr. 17 a Obr. 18, u ďalších derivátov sa pri tvorbe názvu postupuje obdobne.[41]



**Obr. 17** číslovanie a názvoslovie štruktúr izomérov *closo*-karbaboránu [41]



*nido*-7,8-karborán *nido*-7,9-karborán *nido*-2,9-karborán

**Obr. 18** číslovanie a názvoslovie štruktúr izomérov *nido*-karboránu [41]

### 2.4.3. Vlastnosti

Základná stavebná jednotka, bór, sa nachádza v 13.skupine 2.perióde s elektrónovou konfiguráciou  $1s^22s^22p^1$  a v zlúčeninám má najčastejšie oxidačný stupeň 3. Narozdiel od uhlíka nemá tendenciu vytvárať reťazce, ale pre prekonanie elektrónovej deficiencie (3 elektróny na 4 väzobných orbitáloch) vytvára väzby s tromi až šiestimi ďalšími atómami (prevažne s bórmí), za vzniku trojuholníkových zoskupení alebo komplexnejších trojdimenzionálnych klastrov (mnohostenov) priestorovo aromatického charakteru. Práve elektroneficientné tricentrické väzby sú zdrojom odlišných vlastností týchto štruktúr od bežných anorganických a organických molekúl.[36, 39, 41, 42, 43]

Veľkosťou je *closo*-klaster v priestore porovnateľný s rotujúcim fenylovým jadrom alebo adamantanom. Veľkosť je 70-80 Å, narozdiel od fenylu poskytuje väčší povrch pre kontakt s hydrofóbnym cieľom a vyššiu lipofilitu.[41]

Typický je veľmi kyslý charakter klastrov, porovnateľný s najsilnejšími anorganickými kyselinami.[44] Vodíky CH skupiny sú kyslejšie ako vodíky na bóre a ľahko dochádza k deprotonizácii za vzniku nukleofilov. Kyslosť vodíka na uhlíku závisí od druhu izoméru. Platí, že klesá v poradí *ortho*-1,2-, *meta*-1,7-, *para*-1,12-karborán s hodnotami  $pK_a$  22,0, 25,6 a 26,8. Rozdiel v kyslosti izomérnych skupín vzniká v dôsledku rozdielnej elektronegativity uhlíka a bóru (2,55 pre uhlík a 2,04 pre bór podľa Paulinga).[35, 36]

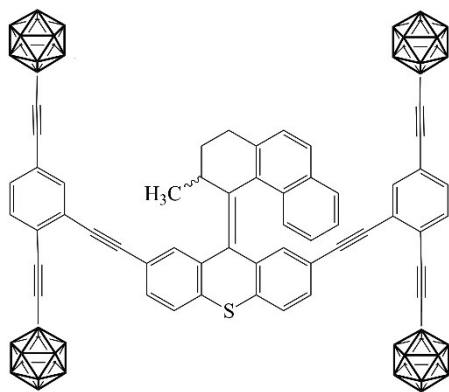
Extrémna hydrofobicita klastrov je zapríčinená prítomnosťou hydridových vodíkov (B-H), ktoré nie sú schopné vytvárať vodíkové väzby s molekulami vody, čo je dôsledok elektrónovej deficiencie. Vplyv na dipólový moment, a teda aj lipofilitu, má poloha uhlíkov, kedy najlipofilnejší a zároveň najstabilnejší je *closo*-1,12-karborán s nulovým dipólovým momentom. Voľné vodíky -CH skupiny zase hydrofobicitu znižujú svojou kyslosťou. Substitúciou klastra môže byť modifikovaná jeho hydrofobicita (zatiaľ čo pri substitúcii na uhlíku je hydrofobicita vyššia v porovnaní s adamantanom, pri substitúcii na bóre je nižšia).[35, 41, 45] Klaster má aj v aprotických rozpúšťadlách tendenciu uvoľniť  $H^+$  za vzniku aniontu, ktorý je z reakčného aj stereochemického

hl'adiska zaujímavejší. Pokiaľ obsahuje v molekule bazickú skupinu a po zavedení do roztoku sa odtrhne  $H^+$ , stáva sa zwitteriontom.[43, 44]

Chiralita bórových klastroch je dôsledkom sterickej asymetrie. Endo- a/ alebo exoskeletálna substitúcia narušuje symetriu klastra natoľko, že dochádza k vzniku dvoch oddeliteľných stereoizomérov. Klasické centrum chiralít v podobe atómu so štyrmi rôznymi substituentmi nie je podmienkou chiralít klastra.[39, 44]

Toxikologický profil zlúčenín obsahujúcich bór je zmiešaný, doposiaľ bolo identifikované minimálne jedno bór obsahujúce antibiotikum– boromycin. Je známe toxické pôsobenie zlúčenín obsahujúcich bór u článkonožcov, ale u vyšších živočíchov nebolo toto pôsobenie popísané. Aj z toho dôvodu sú používané ako herbicidy a insekticidy. Povaha BCs a ich derivátov z hľadiska toxikológie nebola doposiaľ komplexne študovaná. Získané výsledky zatiaľ ukazujú na nízku toxicitu k cicavčím bunkám, narozdiel od mikroorganizmov.[46] V prípade testovania nových lipidových nosičov bóru pre bórovú neutrónovú záchytnú terapiu (BNCT) sa cytotoxicita prejavila na bunkovej kultúre, *in vivo* sa objavilo krvácanie v oblasti tumoru, ktoré však bolo pripisované deštrukcii ciev amfifilným negatívne nabitým lipidom. Toxicita sa na iných orgánoch neprejavila.[47]

#### 2.4.4. Využitie



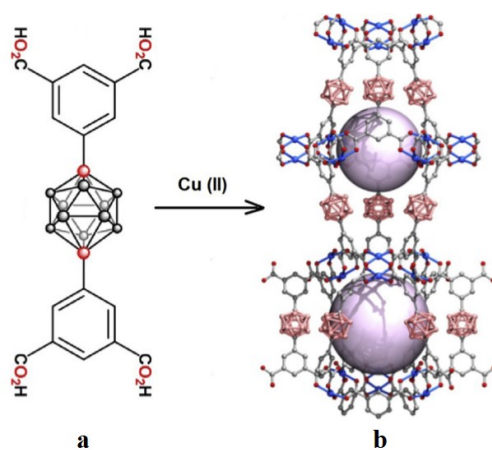
Na základe tvaru, vysokej symetrie skeletu, foto- a metabolickej stability možno klastre využiť pri tvorbe nanoprostriedkov (Obr. 19 vľavo) určených pre kontrolovaný transport, kde by môžu nahradiť fullerény. Využitie fullerénov brzdí ich fotoaktivita, problematická rozpustnosť, a tým pádom aj ťažké čistenie získaného produktu.[32, 34]

**Obr. 19** štruktúra nanoprostriedku využívajúca *closo*-klastre [34]

Metalokarborány (konkrétne komplex  $Ni^{III}/Ni^{IV}$  bis(karbolidu)) sa vďaka nekorozívnym vlastnostiam, rýchlym redoxným prechodom a možnosti modifikácie potenciálu redoxného páru stávajú zaujímavými pre použitie v Grätzelových článkoch (dye-sensitized solar cells/ farbivom sensitizované solárne články). Klastre a ich deriváty možno použiť ako povrch pre polymerizačné reakcie, katalýzu chemických reakcií a enantioselektívnu katalýzu. Pri chemických reakciách je využívaná predovšetkým rigidná štruktúra klastra a jeho odolnosť voči vysokým teplotám. Substituovaný

*para*-karborán sa využíva ako spojka pri tvorbe vysokoporéznych kovovo-organických štruktúr (metal-organic frameworks) Obr. 20. Uplatnenie našli aj ako luminiscenčné materiály, kedy sa zavedením karboránového klastra do komplexov používaných pri tvorbe organických svetlo-emitujúcich diód (organic light emitting diodes) stali súčasťou tzv. OLED televízorov, displejov a osvetľovacej techniky.[34] Priestorová geometria a symetria, elektrónové vlastnosti a delokalizácia väzieb, termálna stabilita, absorbcia UV okolo 200 nm a pomerne ľahké zavádzanie funkčných substituentov robí z bórových klastrov kandidátov pre použitie v príprave kvapalných kryštálov.[48]

BCs a deriváty sú testované ako súčasti magneziových batérií, diagnostiká a rádiomarkre, extrakčné činidlá pri odstraňovaní vysokoradioaktívneho odpadu. Umožňujú syntézu polymérov so zvýšenou tepelnou stabilitou (karboranylpolystyrén) a prípravu SF pre plynovú chromatografiu.[33, 34, 44, 49]



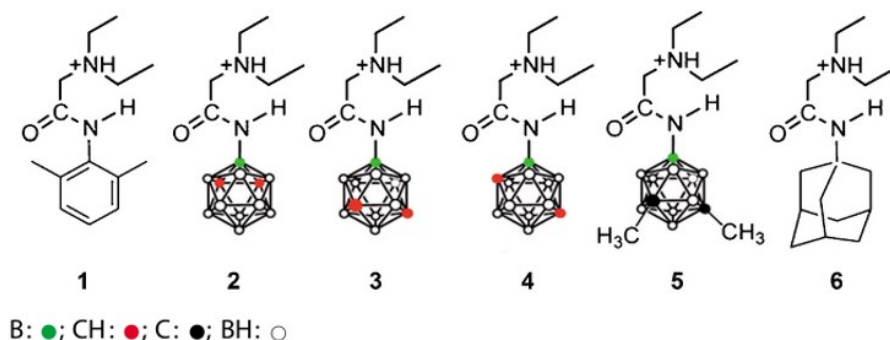
**Obr. 20** a) *para*-karboránová podjednotka b) kovovo-organická kostra NU-135[34]

Veľmi rôznorodým farmaceutickým využitím bórových klastrov je ich zavedenie do molekuly liečiva v úlohe farmakoforu. Tvorba analógov liečiv s využitím klastrov spočíva prevažne v zámene fenyly (aspirín, protizápalovo pôsobiace látky, trimetoprim, fenylalanin) alebo heterocyklu (thalidomid, kyselina listová) v molekule liečiva. Vznikajúci analóg vykazuje zmeny v priestorovom objeme molekuly, zvyšuje sa rigidita štruktúry, vďaka ktorej je možné lepšie kontrolovať orientáciu funkčných skupín. Prehľbuje sa hydrofóbny charakter, tým aj afinita k lipofilnej oblasti receptoru a pri interakcii s cieľovým miestom sa môže uplatniť aj špecifické rozloženie náboja. Prechod bunkovými membránami je uľahčený a dochádza k zvýšeniu stability voči degradačným pochodom v tele. Naviazanie klastra k molekule liečiva prebieha takmer výlučne prostredníctvom uhlíka, bór je pre tento účel využívaný len výnimočne.[35, 41]

Krátko po syntéze prvého klastra bol karborán inkorporovaný do štruktúry aminokyselín, nukleových kyselín a sacharidov. Jednou z prvých biomolekúl pripravených pre použitie

v BNCT bol *closo*-L-1,2-karboranylalanín. BNCT je radiačná metóda využívaná najmä v terapii glioblastoma multiforme. Izotopy  $^{10}\text{B}$  sú privádzané preferenčne do buniek novotvaru, kde interagujú a absorbujú tok neutrónov za vzniku nestabilného izotopu  $^{11}\text{B}$ . Ten sa rozpadá a uvoľňuje  $^7\text{Li}$  a  $\alpha$ -časticu. Ich ionizačný vplyv dosahuje približne polomer bunky ( $<10\ \mu\text{m}$ ), takže okolné tkanivá ostávajú nepoškodené. Kľúčové je dosiahnutie dostatočnej koncentrácie bóru v ožarovanom mieste, na čo je možné s výhodou využiť bórový klaster.[41, 50] Napriek počiatočným neúspechom sú aj naďalej pripravované a testované vhodné klastrové štruktúry pre použitie v BNCT a v terapii nádorových ochorení všeobecne. Príkladmi sú klastre obsahujúce delokalizované lipofilné kationy zasahujúce mitochondrie nádorových buniek [51], štruktúry kombinujúce BNCT a chemoterapiu (doxorubicin) privádzajúci komplex na miesto pôsobenia polymérnymi nanočasticami [52], molekuly ciele na nádorové bunky magneticky [53], deriváty nukleosidov a ďalšie.[54]

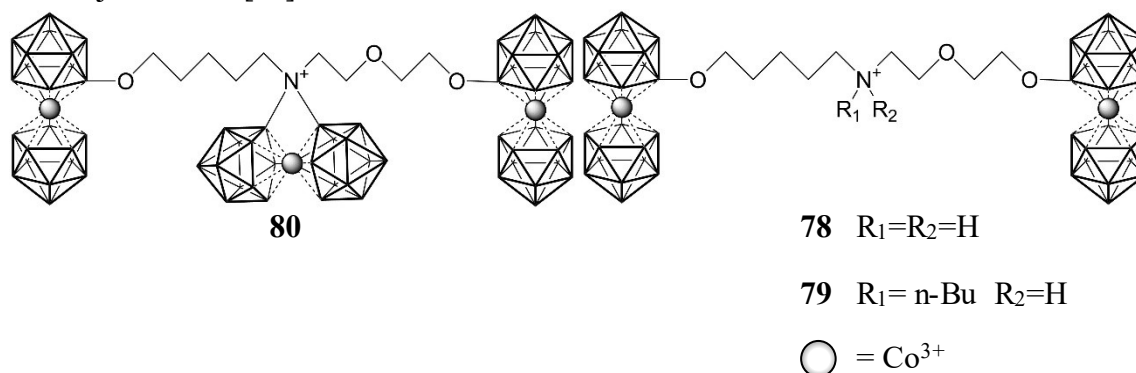
V roku 2015 bola pripravená a otestovaná séria derivátov lokálnych anestetik (tzv. boronikainy, zobrazené na Obr. 21) odvodených od lidokainu (1) zámennou fenylovej časti molekuly za *o*-, *m*-, *p*-izoméry karboránu (2-4), adamantan (6) a dimethylsubstituovaný *m*-karborán (5). Analgetické vlastnosti boli porovnávané s lidokainom použitím hot plate testu na zvieracom modeli. Všetky analógy lidokainu mali analgetickú aktivitu, štruktúry 2 a 5 vykazovali dlhší efekt (zrejme dôsledok menšej dilatácie ciev v porovnaní s lidokainom), analgetická účinnosť klesala v poradí 2=5>4>1>3>6. Rozdiel medzi 2 a 5 bol zanedbateľný.[55]



**Obr.21** lidokain (1) a jeho analógy, prevzaté a upravené [55]

Substituované metalokarborány sa javia ako selektívne a kompetitívne inhibitory HIV proteáz, zahŕňajúce aj formy, ktoré sú na súčasnú liečbu rezistentné. Tieto štruktúry využívajú delokalizovaný negatívny náboj a hydrofobicitu klastra pre kontakt s aktívnym miestom enzýmu. Vodíky hydridového charakteru vytvárajú väzbu s proteínom a flexibilný uhlíkovodíkový reťazec uľahčuje správne zapasovanie molekuly do kavity

enzýmu. Tri *in vitro* najúspešnejšie molekuly nasyntetizované a otestované v Prahe zobrazuje Obr. 22.[41]



**Obr. 22** inhibitory HIV proteáz, prevzaté a upravené [56]

Náhradou kruhov C a D u 17- $\beta$ -estradiolu možno dosiahnuť až 10 $\times$  vyššiu aktivitu, zavedením *nido*-karboránu do molekuly tamoxifenu bola mnohonásobne zvýšená jeho metabolická stabilita (boroxifen). U adamantanu dochádza zamenou štruktúry za klastor k prehĺbeniu hydrofóbných vlastností štruktúry.[38]

Nedávno sa objavila práca popisujúca využitie izostérnej zámény adamantanu v molekule N-(1-adamantyl)-3-aminobenzamidu za jednoduchšie polycykly a klastre (*closo*-1,2- a *nido*-1,2-karborány). Zámenou adamantanu za plochejšie polycykly došlo k zníženiu aktivity. Výsledky kopírovali predpoklad, že objemnejšia substitúcia pôsobí pozitívne na antagonistickú aktivitu molekuly a analóg obsahujúci *closo*-klastor vykazoval najvyššiu aktivitu. Jedná sa o prvú prácu, v ktorej boli popísané štruktúry obsahujúce karborán s aktivitou v centrálnej nervovej sústave, konkrétne antidepresívnu aktivitou (antagonista purinergného receptora).[57]

## 2.4.5. Analýza

### 2.4.5.1. Kapilárna elektroforéza

CE sa javí ako metóda vhodná pre detekciu a chirálnu separáciu bórových klastrov. Práca prebieha s nabitými analytmi a nízkymi koncentráciami stanovovaných látok. Pri achirálnnej separácii pomocou CE bola zistená tendencia klastru tvoriť iontové páry s kationtom pridaným do MF ako súčasť pufru. Ako najoptimálnejší chirálny selektor sa javí  $\beta$ -CD.[40, 43, 44, 58] U  $\alpha$ -CD bola chirálna diskriminácia aniontov obmedzená veľkosťou kavity, vhodný bol najmä pre negatívne nabité klastre s malými *exo*-skeletálnymi substituentmi naviazanými na uhlík, u  $\gamma$ -CD nebol analyt detekovaný.[39]



#### 2.4.5.2. Chromatografický systém

Separácia neutrálnych klastrov býva problematická z dôvodu ich vysokej reaktivity vo vodnom a protickom prostredí.[59] Napriek tejto skutočnosti sa podarilo separovať niekoľko desiatok neutrálnych molekúl, v niektorých prípadoch bolo získané rozlíšenie dostatočné pre použitie v semipreparatívnej separácii. Neutrálne *clos*o-metalokarborány s 11-12 vrcholmi boli úspešne separované použitím  $\beta$ -CD a derivátov (napr. acetylovaný  $\beta$ -CD, hydroxypropyl-  $\beta$ -CD).  $\gamma$ -CD bol prvýkrát úspešne použitý pre enantioseparáciu v prípade čiastočne až kompletne metylom substituovaného metalokarboránu. Štruktúry metalokarboránov s otvoreným skeletom (*nido*-, *arachno*-) neboli chirálne separované. Dôležitú úlohu v chirálnej diskriminácii zrejme zohráva prítomnosť *exo*-skeletálnej substitúcie.[39]

Zwitterionty boli separované použitím polysacharidových stacionárnych kolón v reverznom aj polárne organickom móde. Zwitterionty, ktorých štruktúra je premostená atómom síry boli separované častejšie, než je to v prípade analytov premostených substituovaným dusíkom. Zároveň bol pozorovaný vplyv typu a priestorového rozmiestnenia substituentov na premostujúcom atóme.[42] Rovnako CSF na bázi CD (natívneho alebo derivatizovaného) umožnili použitím HPLC opakovane separovať rôzne zwitterionty.[39]

Doposiaľ sa však nepodarilo vytvoriť spoľahlivý chromatografický systém, v ktorom by bola možná elúcia a chirálna separácia negatívne nabitých karboránových alebo metalokarboránových klastrov. Publikované výsledky uvádzajú ich separáciu len zriedkavo, napr. u karboránových aniontov rigidnej štruktúry, ktoré sú premostené atómom síry alebo kyslíka. Mnohé pokusy o ich separáciu pomocou iontovo-výmennej kvapalinovej chromatografie s použitím  $\beta$ -CD ako enantioselektoru skončili neúspechom napriek tomu, že v CE viedla aplikácia podobných podmienok k enantioseparácii.[39] Rovnako polysacharidové SF zatiaľ neposkytli vhodné podmienky pre chirálnu diskrimináciu aniontov. Elúcia aniontov v NP móde bola pozorovaná sporadicky, rovnako ako náznaky chirálnej separácie. Použitie PO módu na polysacharidových kolónach viedol k elúcii aniontov na rozdiel od NP módu, avšak prevažne bez dostatočnej retencie pre enantioseparáciu.[42]

### 3. Ciele práce

Cieľom tejto práce bolo objasniť nezrovnalosť medzi doposiaľ získanými výsledkami chirálnej separácie bórových klastrov použitím kapilárnej elektroforézy a vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Na základe získaných výsledkov je kapilárna elektroforéza využívajúca  $\beta$ -cyklodextrín ako chirálny selektor schopná separovať negatívne nabité bórové klastre, avšak v HPLC sa za týchto podmienok enantioseparácia doposiaľ nepodarila.

Následne sme sa zamerali na testovanie ďalších chirálnych selektorov a podmienok pre enantioseparáciu, najmä modifikáciou zloženia mobilnej fázy a teploty.

## 4. Experimentálna časť

### Prístroje:

kvapalinový chromatograf LC 20 A Prominence (Schimadzu, Kyoto, Japonko):

- odplyňovač, typ DGU 20 A3
- pumpa, typ LC 20 AD- A
- pumpa, typ LC 20 AD- B
- autosampler, typ SIL- 20 AC
- riadiaca jednotka, typ CBM- 20 A
- detektor, typ SPD- M20A
- kolónový priestor, typ CTO- 20AC
- software- LC Solution Version 1.22 SP1

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

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

ultrazvuková kúpeľ (Ecoson, Praha, Česká republika)

spektrofotometer (UV-2401, Shimadzu, Japonsko)

### Pomôcky:

laboratórne sklo (odmerné válce, pipety, kadičky, atď.), mikropipety, vialky

### Chromatografické kolóny:

LiChroCART Chiradex, 250x4 mm, veľkosť častíc 5  $\mu\text{m}$

YMC CHIRAL  $\beta$ -CD BR, 250  $\times$  4,6 mm, veľkosť častíc 5  $\mu\text{m}$

CHIRALPAK AGP, 100  $\times$  4 mm, veľkosť častíc 5  $\mu\text{m}$

CHIRALPAK QN-AX, 150  $\times$  4 mm, veľkosť častíc 5  $\mu\text{m}$ , endcapped

CHIRALPAK QN-H2, 150  $\times$  4 mm, veľkosť častíc 5  $\mu\text{m}$ , endcapped

CHIRALCEL OD-R, 250  $\times$  4,6 mm, veľkosť častíc 10  $\mu\text{m}$

ZirChrom®-CelluloZe, 250  $\times$  4,6 mm, veľkosť častíc 5  $\mu\text{m}$

Astec Chirobiotic T LS, 250  $\times$  2,1 mm, veľkosť častíc 5  $\mu\text{m}$

LiChroCART Supersphere 100 RP-18, 250  $\times$  4,6mm, veľkosť častíc 4  $\mu\text{m}$ , endcapped

**Príprava vzoriek** prebehla rozpustením adekvátneho množstva pevnej vzorky za vzniku 2mM roztoku. V závislosti od použitého módu boli vzorky pripravené v čisto

metanolovom roztoku alebo boli nariadené destilovanou vodou za vzniku 50% metanolového roztoku. Prehľad použitých vzoriek s označením, systematickým názvom, štruktúrnym vzorcom a spektrom uvádza Tab. 3. Vzorky boli uchovávané v chladničke a ich spektrum bolo zaznamenávané v rozsahu 190– 350 nm. Vzorky pochádzajú od RNDr. Bohumíra Grünera, CSc. z Ústavu anorganickej chémie Akadémie vied Českej republiky.

**Nástrekovaný objem** vzorky sa pohyboval v rozsahu 5-15  $\mu\text{m}$ .

**Mobilná fáza** bola v priebehu experimentov pripravovaná rôznymi postupmi v závislosti od jej povahy. Jednoduchá MF zložená z jedného až dvoch rozpúšťadiel bola zmiešavaná priamo prístrojom v pomere odpovedajúcom potrebám experimentu. V prípade mobilnej fáze obsahujúcich pufr bola najskôr pripravená pufracia zložka rozpustením alebo zmiešaním príslušných chemikálií v potrebnom množstve. Hodnota pH bola následne skontrolovaná a upravená použitím acidimetru.

Mobilná fáza bola pred zmiesaním s organickou zložkou vákuovo prefiltrovaná a následne odplynená pomocou ultrazvukového kúpeľu.

Príprava fosfátového pufru prebiehala podľa návodu [17].

**Prietok** používaný v experimentoch bol zvyčajne 0,8 ml/ min s výnimkou kolóny Astec Chirobiotic T LS, kde bol použitý prietok 0,3 ml/ min, CHIRALCEL OD-R a CHIRALPAK AGP s prietokom 0,5 ml/ min.

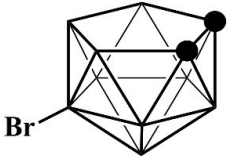
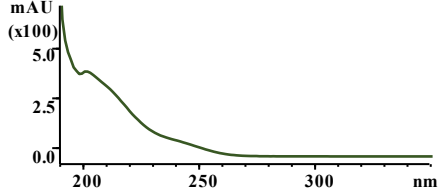
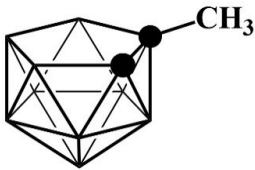
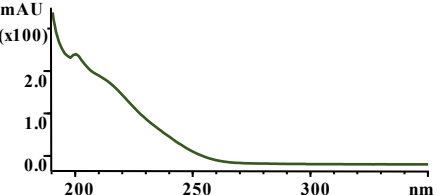
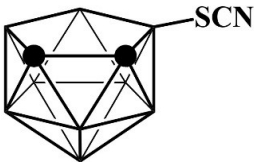
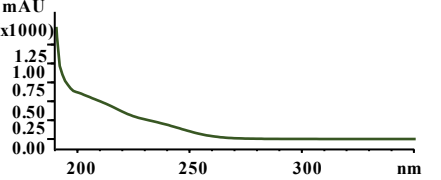
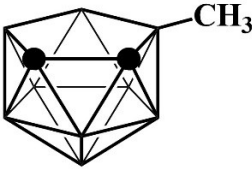
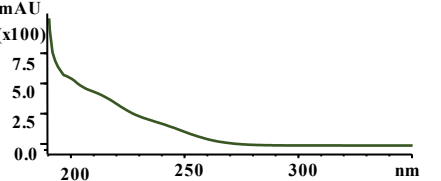
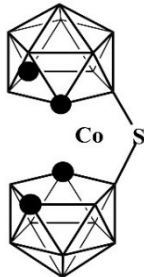
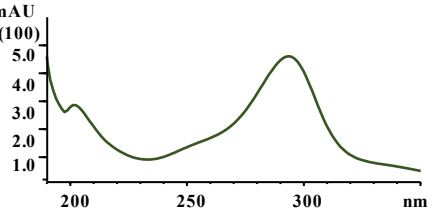

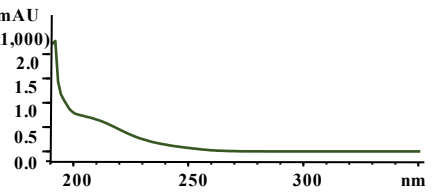
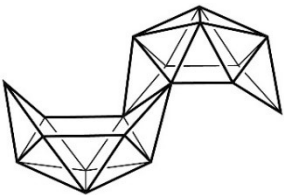
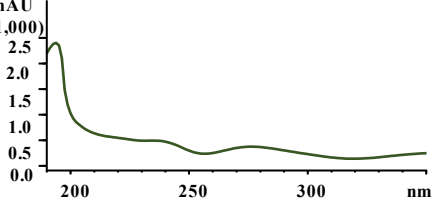
#### **Chemikálie:**

acetonitril, dietylamín, edetan disodný, fenobarbital, propan-2-ol, kyselina mravenčia, kyselina octová, kyselina trifluoroctová, metanol, morfolin, mravenčan amónny, octan amónny, tetrabutylamónium chlorid, trietylamín Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

2-(N-morfolino)etansulfonová kyselina, 2-amino-2-(hydroxymetyl)propan-1,3-diol, dihydrogénfosforečnan sodný, hydrogénfosforečnan sodný, chlorid horečnatý, chlorid vápenatý, chloristan sodný, kyselina fosforečná LachNer (Neratovice, Česká republika)  
etanol Merck (Praha, Česká republika)

hydroxid sodný, chlorid sodný Penta (Chrudim, Česká republika)

**Tab. 3** zoznam vzoriek s ich spektrom, systematickým a štruktúrnym vzorcom

označenie vzorky a systematický názov	štruktúrny vzorec	spektrum
<p><b>E1</b> [5-Br-7,8-<i>nido</i>-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>11</sub>]<sup>-</sup></p>		
<p><b>E2</b> [7-CH<sub>3</sub>-7,8-<i>nido</i>-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>11</sub>]<sup>-</sup></p>		
<p><b>E5</b> [9-NCS-7,8-<i>nido</i>-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>11</sub>]<sup>-</sup></p>		
<p><b>E6</b> [9-CH<sub>3</sub>S-7,8-<i>nido</i>-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>11</sub>]<sup>-</sup></p>		
<p><b>F9</b> [6,6'-μ-S-(1,7-<i>closo</i>-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-2,2'-Co]<sup>-</sup></p>		
<p><b>ZW</b> [9-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S-7,8-<i>nido</i>-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup></p>		
<p><b>B<sub>18</sub>H<sub>22</sub></b> [B<sub>18</sub>H<sub>21</sub>]<sup>-</sup></p>		

● = CH

## 5. Výsledky a diskusia

### 5.1. Chirálny selektor: $\beta$ -cyklodextrín

Prvým a najtestovanejším enantiosektorom bol  $\beta$ -cyklodextrín kovalentne naviazaný na silikagel. Hlavným dôvodom bola úloha zistiť, či je vhodným chirálnym selektorom pre klastre aj v HPLC, keďže v CE sa javil ako schopný enantioseparácie [40, 43, 44, 58]. Počiatočné experimenty, u ktorých sme využívali veľmi jednoduchú MF obsahujúcu 35-100% metanolu (MeOH) a 100% MeOH s prídavkom 0,1% kyseliny octovej (AA) nevedli k elúcii a detekcii vzorky. Až zámena MeOH za acetonitril (ACN) s vyššou elučnou silou nám umožnila detekovať vzorku F9 v podobe veľmi širokého píku. Rovnaké podmienky sme otestovali aj na ďalších dvoch achirálnych kolónach, avšak s rovnakým výsledkom, čo ukázalo, že silná retencia nesúvisí s chirálnym selektorom, ale obecné s vlastnosťami použitej kolóny. Pre overenie funkčnosti kolón sme používali prevažne fenobarbital. Výber látky sa riadil aplikačnými materiálmi k  $\beta$ -CD kolóne, podľa ktorého sú barbituráty na kolóne zadržované a separované. Pretože bol test funkčnosti chirálnej aj achirálnych kolón bezproblémový, mohli sme predpokladať silnú retenciu analytov na SF.

Prvé vzorky sa nám na  $\beta$ -CD kolóne podarilo detekovať až po pridaní pufru do MF obsahujúcej MeOH a ACN (3:1, v:v) v zložení 2-(N-morfolino)etansulfonová kyselina (MES) a 2-amino-2-(hydroxymetyl)propan-1,3-diol (TRIS), 20 mM, pH 7,0. Zloženie anorganického zložky MF sa odvíjalo od výsledkov publikovaných v CE [44] a kopírovalo tak zloženie elektrolytu. Pretože pri použití MeOH ako MF bola retencia vzoriek prívysoká a samotný ACN svojou vysokou elučnou silou maril enantioseparáciu, bola ich kombinácia logickým krokom zabezpečujúcim akceptovateľnú retenciu bez straty separácie.

Miernym znížením pH tejto MF na hodnotu 6,5 došlo k významnému zvýšeniu retencie. Vplyv väčšieho rozsahu pH sme preto následne overovali pomocou fosfátového pufru, ktorý umožňuje otestovanie značného rozsahu hodnôt pH bez zásadných zmien v zložení. Použili sme rozsah pH 5,8-7,4 so zistením, že s klesajúcim pH sa zvyšuje retencia všetkých testovaných vzoriek (Tab. 4). Získané výsledky sú v rozpore s veľmi kyslým charakterom našich analytov, u ktorých je zmena protonizácie s poklesom pH veľmi nepravdepodobná, a preto sme museli uvažovať o ďalších možných príčinách. Ako najpravdepodobnejší sa javil vplyv prítomnosti kationtov, s ktorými naše silné kyseliny tvorili iontový pár.

**Tab. 4** vplyv zmeny pH fosfátového pufru na retenciu vzoriek na kolóne LiChroCART Chiradex- chirálny selektor  $\beta$ -CD v MF MeOH:ACN (3:1, v:v)-pufor (3:1, v:v)

pH 10mM fosfátového pufru		7,4	7,0	6,6	6,2	5,8	5,8 c(Na) 50 mM
E1	t <sub>R1</sub> (min)	3,62	3,83	4,70	6,18	8,05	8,56
	k <sub>1</sub>	0,17	0,25	0,54	1,01	1,64	1,83
E2	t <sub>R1</sub> (min)	3,58	3,81	4,73	5,84	6,88	8,29
	k <sub>1</sub>	0,16	0,24	0,54	0,90	1,26	1,74
E5	t <sub>R1</sub> (min)	4,94	5,60	7,45	10,19	11,78	15,63
	k <sub>1</sub>	0,60	0,83	1,44	2,32	2,87	4,16
E6	t <sub>R1</sub> (min)	3,67	3,96	4,94	6,17	7,24	8,62
	k <sub>1</sub>	0,19	0,29	0,61	1,01	1,38	1,85
F9	t <sub>R1</sub> (min)	3,77	4,21	4,87	6,87	9,12	9,74
	k <sub>1</sub>	0,22	0,37	0,59	1,07	1,64	2,05
ZW	t <sub>R1</sub> (min)	3,87	4,25	5,40	6,87	9,12	9,74
	k <sub>1</sub>	0,25	0,39	0,76	1,24	2,00	2,22
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	t <sub>R1</sub> (min)	7,29	14,38	n	15,18	19,38	52,42
	k <sub>1</sub>	1,36	3,69	n	3,95	5,36	16,32

k<sub>1</sub>-retenčný faktor 1. píku, n- vzorka nebola analyzovaná

Pre overenie vplyvu bazickej zložky pufru boli porovnané 20 mM pufovacie systémy: samotný MES, MES-NaOH, MES-TRIS, MES-morfolin v MF MeOH:ACN (3:1, v:v): pufovací systém (9:1, v:v). V testovaných podmienkach bolo pH upravené na hodnotu 7 (okrem použitia samotného MES, kde bolo pH približne 4). Pri použití samotného MES- u bez prítomnosti zásady, ktorá by so vzorkami tvorila iontový pár, nebola pozorovaná elúcia žiadnej zo vzoriek v testovanom čase (Tab. 5). U ostatných pufovacích systémov obsahujúcich zásadu boli detekované všetky vzorky s retenciou aj rozlíšením klesajúcim v poradí: morfolin, TRIS, NaOH. Bola dosiahnutá separácia takmer na základnú líniu u vzorky F9 a náznak separácie u vzoriek E2 a E6 (Tab. 5). Zmeny v retenciách pripisujeme druhu bazickej zložky, jej lipofilite a priestorovému objemu.

**Tab. 5** vplyv rozdielnych bazických súčastí pufru MF na elúciu a enantioseparáciu vzoriek na kolóne LiChroCART Chiradex- chirálny selektor  $\beta$ -CD

vzorka	$t_{R1}$ (min)	$t_{R2}$ (min)	$k_1$	$R_s$	$\alpha$
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-MES pH 3,94, 20mM (9:1, v:v)</i>					
E2	>130	-	-	-	-
F9	>50	-	-	-	-
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-MES-TRIS pH 7, 20mM (9:1, v:v)</i>					
E1	24,58	-	8,39	-	-
E2	25,28	25,82	8,66	0,08	1,02
E5	44,12	-	15,86	-	-
E6	28,68	29,47	9,96	1,30	1,03
F9	21,56	23,19	7,24	1,55	1,09
ZW	29,86	-	10,41	-	-
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	n	n	n	n	n
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-MES-NaOH pH 7, 20mM (9:1, v:v)</i>					
E1	13,04	-	2,89	-	-
E2	16,3	16,72	3,86	0,22	1,03
E5	24,73	-	6,38	-	-
E6	18,22	18,68	4,44	0,51	1,03
F9	9,24	9,88	1,76	1,10	1,11
ZW	18,79	-	4,61	-	-
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	35,64	-	9,64	-	-
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-MES-morfolin pH 7, 20mM (9:1, v:v)</i>					
E1	35,19	-	10,35	-	-
E2	39,65	40,75	11,79	0,70	1,03
E5	55,75	-	16,98	-	-
E6	41,45	42,65	12,37	0,84	1,03
F9	34,43	36,90	10,11	1,64	1,08
ZW	42,29	-	12,64	-	-
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	n	n	n	n	n

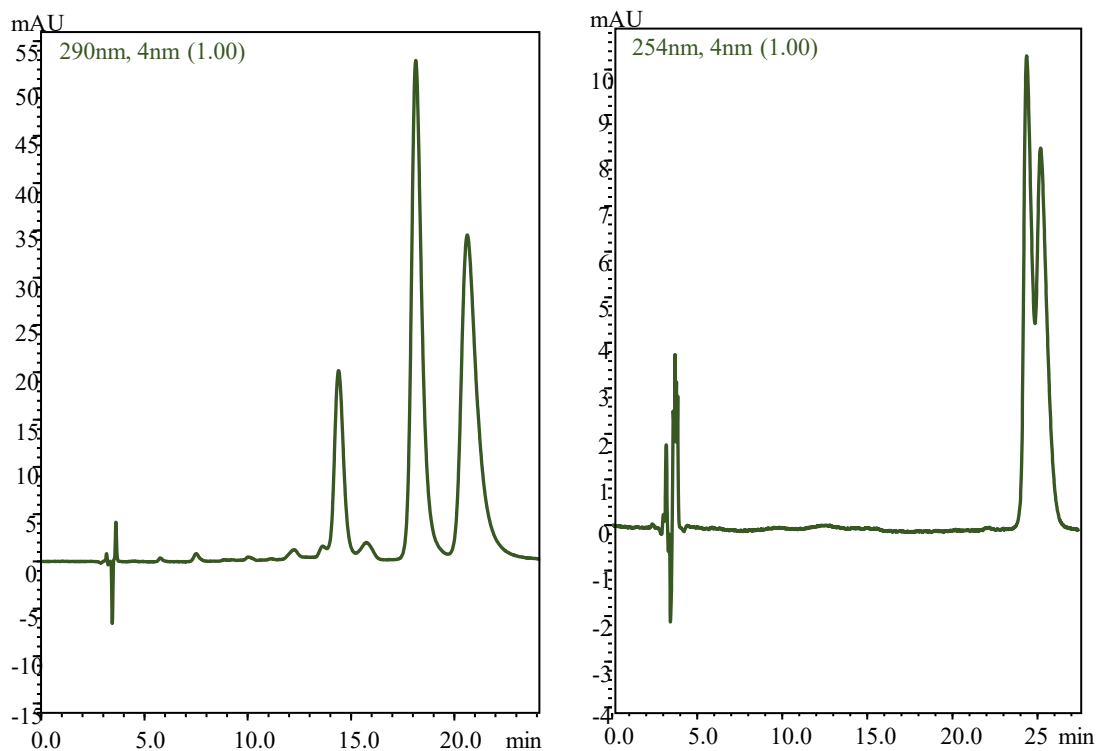
n- vzorka nebola analyzovaná



Pre potvrdenie našej teórie sme v ďalších pokusoch do MF MeOH:ACN (3:1, v:v) vo vodnom prostredí rozpustili rôzne soli (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, tetrabutylamonium chlorid– TbACl) tak, aby bola výsledná koncentrácia kationtu 50 mM. pH MF sa vo všetkých prípadoch pohybovalo okolo hodnoty 5. Najvyššiu retenciu mali vzorky v systéme s organickým, lipofilnejším a priestorovo objemným TbACl, najlepšie rozlíšenie bolo získané u horčika (Obr. 23) (Tab. 6).

**Tab. 6** vplyv rozdielnych kationtov na elúciu a enantioseparáciu vybraných vzoriek na kolóne LiChroCART Chiradex- chirálny selektor β-CD

vzorka	t <sub>R1</sub> (min)	t <sub>R2</sub> (min)	k <sub>1</sub>	R <sub>s</sub>	α
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-vodný roztok 50mM Na (NaCl) (9:1, v:v) pH 5,68</i>					
E1	18,18	-	4,79	-	-
E2	19,37	19,92	5,15	0,59	1,04
F9	15,72	16,97	3,99	1,50	1,10
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-vodný roztok 50mM Ca (CaCl<sub>2</sub>) (9:1, v:v) pH 5,12</i>					
E1	29,01	-	8,64	-	-
E2	29,49	30,49	8,80	0,79	1,04
F9	21,38	24,76	6,10	2,57	1,18
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-vodný roztok 50mM Mg (MgCl<sub>2</sub>) (9:1, v:v) pH 5,13</i>					
E1	24,17	-	7,21	-	-
E2	24,36	25,19	7,28	1,17	1,04
F9	18,13	20,63	5,16	2,22	1,16
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-vodný roztok 50mM TbABr (9:1, v:v) pH 4,75</i>					
E1	36,07	-	10,56	-	-
E2	33,78	34,89	9,823	0,81	1,04
F9	25,71	28,83	7,24	2,06	1,14

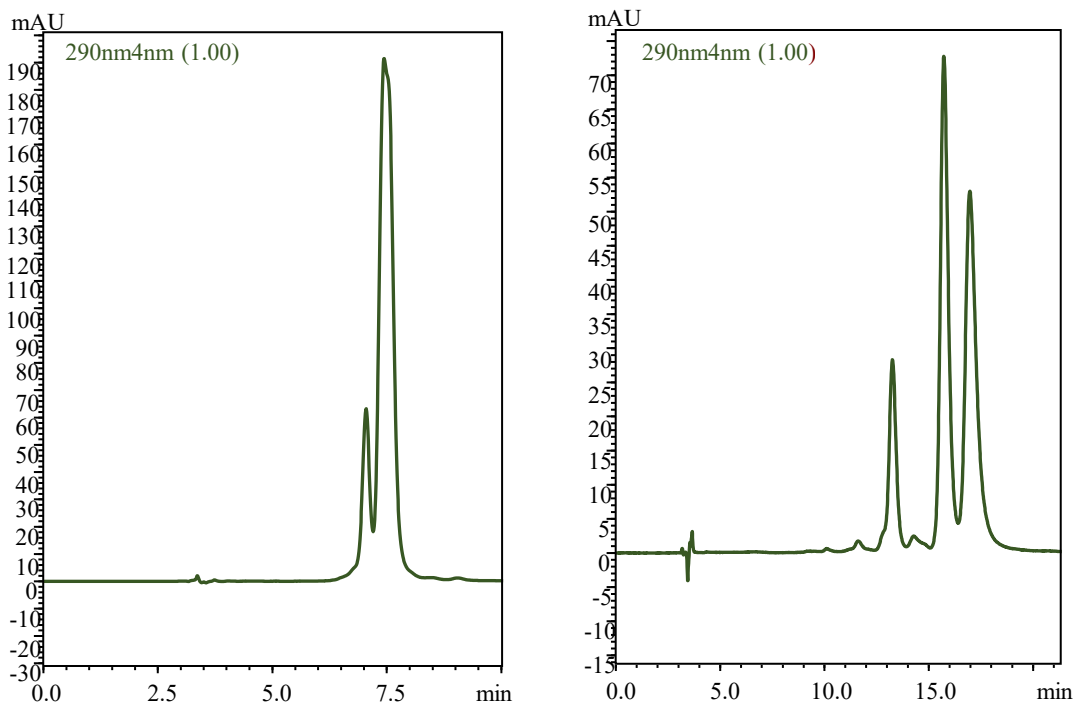


**Obr. 23** chromatogramy látok F9 (vľavo) s  $R_s=2,22$  a E2 (vpravo) s  $R_s=1,17$   
 MeOH:ACN (3:1, v/v)-50 mM  $Mg^{2+}$  (9:1, v/v)

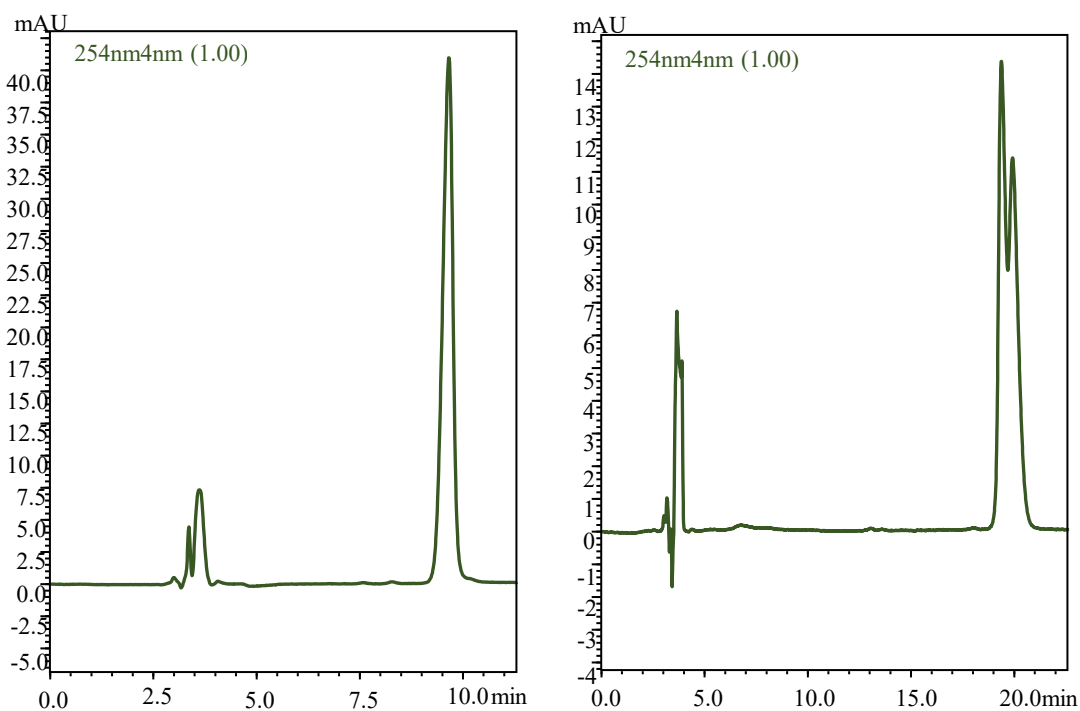
Zámenou metanolu v MF za etanol (EtOH) sa retencia znížila za cenu straty rozlíšenia stereoizomérov vid'. Tab. 7 nasledovaná chromatogramami (Obr. 24 a Obr. 25) porovnávajúcimi vzorky E2 a F9 v jednotlivých MF.

**Tab.7** vplyv zámeny MeOH za EtOH na elúciu a enantioseparáciu vybraných vzoriek na kolóne LiChroCART Chiradex- chirálny selektor  $\beta$ -CD

vzorka	$t_{R1}$ (min)	$t_{R2}$ (min)	$k_1$	$R_s$	$\alpha$
<i>EtOH:ACN (3:1, v:v)-vodný roztok 50mM Na (NaCl) (9:1, v:v) pH 5,68</i>					
E1	9,50	-	2,18	-	-
E2	9,65	-	2,23	-	-
F9	7,43	-	1,49	-	-
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-vodný roztok 50mM Na (NaCl) (9:1, v:v) pH 5,68</i>					
E1	18,18	-	4,79	-	-
E2	19,37	19,92	5,15	0,59	1,04
F9	15,72	16,97	3,99	1,50	1,10



**Obr. 24** chromatogramy vzorky F9, vľavo MF: EtOH:ACN (3:1, v:v)-vodný roztok 50 mM Na (9:1, v:v), vpravo MF: MeOH:ACN (3:1, v:v)-vodný roztok 50 mM Na (9:1, v:v)



**Obr. 25** chromatogramy vzorky E2, vľavo MF: EtOH:ACN (3:1, v:v)-vodný roztok 50 mM Na (9:1, v:v), vpravo MF: MeOH:ACN (3:1, v:v)-vodný roztok 50 mM Na (9:1, v:v)

Okrem sledovania vplyvu rôznych kationtov sme menili prídavok sodíka (5, 20 a 50 mM) v mobilných fázach s kyselinou octovou alebo fosforečnou o pH 3,2 a zložením MeOH:ACN (3:1, v:v)-kyselina (9:1, v:v). V porovnaní s predchádzajúcimi experimentmi, kde mala MF kyslý charakter (vyššie uvádzané podmienky s 20mM MES o pH 3,94 (Tab. 5) a podmienky s 20mM AA o pH 3,23 (bez elúcie viac ako 60 min), u ktorých nebola pozorovaná elúcia analytu, boli látky za prítomnosti kationtu v MF detekované v retenčných časoch cca 60 minút (kyselina octová) a cca 13 minút (kyselina fosforečná) vid'. Tab. 8.

V oboch prípadoch bolo výsledkom znižovanie retencie klastrov s narastajúcim obsahom sodíka. Kratšie časy sme sledovali u kyseliny fosforečnej (upravenej na požadovanú hodnotu dihydrogénfosforečnanom sodným), ktorá má vyšší negatívny náboj, a teda dochádzalo k väčšiemu odpudzovaniu medzi klastrom a fosforečnanom, ktorý sa adsorbuje na povrch SF (Tab. 8). Vyššie uvedené experimenty nám potvrdili potrebu prítomnosti kationtu, s ktorým by analyty tvorili iontový pár. Očividné je, že záleží na druhu použitého kationtu, jeho koncentrácii a aj na kyslej zložke, s ktorou do MF prichádza.

**Tab. 8** porovnanie zmeny kyslej zložky MF na elúciu a enantioseparáciu testovaných vzoriek na kolóne LiChroCART Chiradex– chirálny selektor  $\beta$ -CD

vzorka	$t_{R1}$ (min)	$t_{R2}$ (min)	$k_1$	$R_s$	$\alpha$
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-kyselina octová s 20 mM Na, pH 3,21 (9:1, v:v)</i>					
E1	63,98	-	20,11	-	-
E2	68,76	71,23	21,69	0,84	1,04
F9	53,71	59,91	16,72	2,22	1,12
<i>MeOH:ACN (3:1, v:v)-kyselina fosforečná s 20 mM Na, pH 3,21 (9:1, v:v)</i>					
E1	13,44	-	3,42	-	-
E2	13,45	13,68	3,42	0,21	1,02
F9	11,59	12,2	2,81	1,01	1,07

Okrem už spomenutých prídavkov solí k MF sme na  $\beta$ -CD kolóne študovali aj vplyv chloristanu sodného, od ktorého sme očakávali dodanie sodíka do MF a zvýšenie hydrofóbných interakcií vďaka chaotropickému efektu chloristanu sodného. Otestovali sme rôzne kombinácie MF líšiace sa organickou zložkou (MeOH, ACN, propan-2-ol (IPA), ich kombinácii) a koncentráciou organickej zložky. Napriek tomu sme v porovnaní s predchádzajúcimi soľami nedosiahli chirálnu separáciu u iných, než u už separovaných

vzoriek E6 a F9, u vzorky E2 sme pozorovali pík s rozšíreným vrcholom naznačujúci tendenciu k oddeleniu jednotlivých enantiomérov. Všetky analyty boli detekované s výrazným zlepšením rozlíšenia u vzorky F9 v porovnaní s doposiaľ získanými výsledkami. Najlepšie podmienky (s ohľadom na chirálnu separáciu) sme získali použitím 75% MeOH s 0,5 M chloristanu sodného s koncentráciou sodíka 82 mM (Tab. 9).

**Tab. 9** najvýhodnejšie podmienky pre enantioseparáciu s použitím NaClO<sub>4</sub> ako súčasti MF na kolóne LiChroCART Chiradex– chirálny selektor β-CD

vzorka	t <sub>R1</sub> (min)	t <sub>R2</sub> (min)	k <sub>1</sub>	R <sub>s</sub>	α
<i>75% MeOH a 0,5 M chloristan sodný, c(Na)=82mM, pH 5,8</i>					
E1	14,95	-	3,59	-	-
E2	13,68	-	3,2	-	-
E5	27,08	-	7,31	-	-
E6	12,88	13,38	2,95	0,44	1,05
F9	19,07	39,3	4,85	10,13	2,28
ZW	18,35	-	4,63	-	-
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	>40	-	-	-	-

Použitím PO módu na β-CD kolóne sme rovnako ako v prípade použitia RP módu dosiahli minimálne náznak separácie u vzoriek E2, E6 a F9. Obmenou MeOH za ACN sa znížila retencia a stratila enantioseparácia. Pri použití zmesi MeOH:ACN v pomere 3:1 (v:v) bola retencia v porovnaní so samotným MeOH skrátaná približne o tretinu so zhoršením rozlíšenia. V pokusoch boli použité rôzne pomery dietylaminu (DEA), trietylaminu (TEA), kyseliny octovej (AA) a trifluoroctovej (TFA). Zvýšením pomeru v prospech zásady sa znížila retencia vzoriek, optimálne podmienky vzhľadom na chirálnu separáciu a retenciu boli získané kombináciou MF obsahujúcej MeOH TEA:AA (0,1%, 1:1) (Tab. 10).

**Tab.10** najvýhodnejšie podmienky PO módu pre chirálnu diskrimináciu na kolóne LiChroCART Chiradex– chirálny selektor  $\beta$ -CD

vzorka	$t_{R1}$ (min)	$t_{R2}$ (min)	$k_1$	$R_s$	$\alpha$
<i>MeOH TEA:AA (0,1%, 1:1)</i>					
E1	54,54	-	15,56	-	-
E2	61,07	64,188	17,55	0,98	1,05
E5	49,59	-	14,06	-	-
E6	43,85	45,67	12,32	0,78	1,04
F9	24,08	25,22	5,25	0,92	1,05
ZW	64,88	-	18,7	-	-
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	45,43	-	12,8	-	-

Na základe doterajších zistení o lipofilite, stálom negatívnom náboji a tendencii k tvorbe iontových párov vznikol predpoklad, že v použitých kolónach sa dlhodobo nachádza pozitívny náboj, na ktorý sa analyty viažu, a preto sa nám v úvodných podmienkach bez prítomnosti kationtu v MF nepodarilo vzorky eluovať. Pre potvrdenie alebo vyvrátenie tejto teórie bola použitá séria premývaní kolón a pokusov zosumarizovaných v Tab. 11. V prvom kroku bola kolóna s  $\beta$ -CD premytá kyslou MF (MeOH-20mM AA (1:9, v:v) ) a 50% MeOH pre odstránenie nečistôt (napr. organické zásady z predchádzajúcich experimentov). Opätovne boli otestované počiatkové podmienky s MF obsahujúcou len 100% MeOH, pri ktorých nebola elúcia analytov pozorovaná. Nasledovalo premývanie kolóny 50% MeOH s pridaním 10 mM edetanu disodného (EDTA-Na<sub>2</sub>), ktorého cieľom bolo vysýtenie pozitívnych nábojov v kolóne pred samotným nástrekom vzorky. Experiment pokračoval nástrekom analytov s použitím MF zloženej z 80% MeOH s EDTA-Na<sub>2</sub> (1,25 mM) a pH 4,48. Koncentrácia sodíka bola výpočtom stanovená na 0,15 mM, čo je množstvo, u ktorého nepredpokladáme význa mný zásah do elúcie analytu. Podarilo sa nám detekovať všetky vzorky s chirálnou separáciou vzorky F9 a náznakom chirálnej separácie u E2 a E6. Potom nasledovalo premývanie kolóny 80% MeOH (120 minút), aby sme vyplavili naviazaný edetan a mohli zopakovali nástrek bez pridaného protiiontu. Sledovali sme približne desať násobné predĺženie retenčného času u vzorky F9, vzorku E2 sme v priebehu 120 minút neeluovali. Fakt, že sa nám podarilo detekovať vzorku F9 (1. pík približne v 87. minúte v porovnaní s 8. minútov u prechádzajúcich podmienok) pripisujeme zostatku edetanu v kolóne. Pre potvrdenie, že ani prítomnosť minimálneho množstva sodíka (0,15 mM) nemohlo mať vplyv na elúciu sme do MF s 80% MeOH pridali sodík (NaCl) v koncentracii 0,17 mM.

Tento predpoklad sa potvrdil a prítomnosť sodíka vo forme EDTA-Na<sub>2</sub> nemalo na pokus vplyv. Sériu testov potvrdila prítomnosť pozitívneho náboja na kolóne, ktorého pôvod môže byť v silikageli typu A, ktorý od výroby obsahuje zvyšky kovov (napr. Fe, Al, Ni, Zn, K, Ca, Mg, atď.). U kolóny LiChroCART Supersphere 100 RP-18 sa nám sice nepodarilo zistiť pôvod silikagelu v sprievodných dokumentoch ani u výrobcu, ale po premytí kolóny 20 mM kyselinou octovou s MeOH (9:1) sme použitím MF s 80-100 % MeOH detekovali vzorky eluované z kolóny v mŕtvom čase. Predpokladáme preto prítomnosť bazických látok alebo kovov, ktoré sa nám premývaním zmesou s kyselinou podarilo vymyť. Po prenesení rovnakých podmienok na kolónu LiChroCART LiChrosphere obsahujúcu s istotou silikagel typu B opúšťali všetky vzorky kolónu bez interakcie, v mŕtvom čase.

**Tab. 11** výsledky a experimentálne podmienky na kolóne LiChroCART Chiradex–chirálny selektor β-CD s prídavkom EDTA-Na<sub>2</sub>

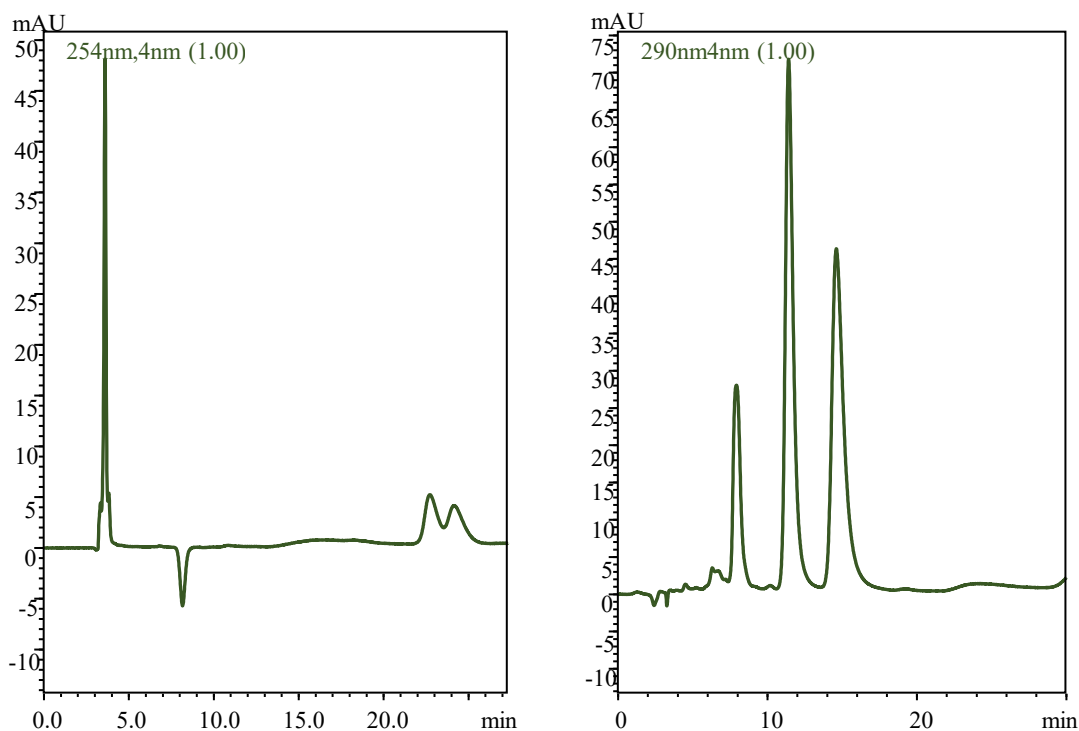
vzorka	t <sub>R1</sub> (min)	t <sub>R2</sub> (min)	k <sub>1</sub>	R <sub>s</sub>
<b>1. premytie kolóny 20mM AA : MeOH (9:1, v:v)</b>				
<b>2. premytie kolóny 50% MeOH (30 minút)</b>				
<i>mobilná fáza: 100% MeOH</i>				
E1	>60	-	-	-
E2	>40	-	-	-
F9	>20	-	-	-
<b>3. premytie kolóny 10mM roztokom EDTA-Na<sub>2</sub> (80 minút)</b>				
<b>4. premytie kolóny 50% MeOH (30minút)</b>				
<i>mobilná fáza: 80% MeOH + 1,25mM EDTA-Na<sub>2</sub>, c(Na)= 0,16 mM</i>				
E1	13,21	-	2,96	-
E2	13,35	14,03	3,0	0,68
E5	19,87	-	4,96	-
E6	12,46	12,91	2,74	0,25
F9	7,8	9,36	1,34	1,46
ZW	18,04	-	4,41	-
B18H22	54,68	-	15,4	-
<b>5. premytie kolóny 80% MeOH (120 minút)</b>				
<i>mobilná fáza: 80% MeOH</i>				
E2	>120	-	-	-
F9	87,5	108,26	25,48	1,97

Vplyv teploty na retenčný faktor bol u všetkých analytov jednoznačný a so stúpajúcou teplotou klesal. Vplyv na rozlíšenie sa u vzoriek líšil a dosiahol maximum pri rozličnej teplote (Tab. 12). Obr. 26 zobrazuje chromatogramy vzoriek F9 a E2 s najlepším dosiahnutým rozlíšením.

**Tab. 12** vplyv teploty na rozlíšenie a a retenčný faktor v MF 75% MeOH a 1,25mM EDTA-Na<sub>2</sub> na kolóne LiChroCART Chiradex– chirálny selektor β-CD

teplota (°C)		11	18	25	32	40
E1	t <sub>R1</sub> (min)	35,9	27,8	21,9	17,1	13,4
	k <sub>1</sub>	9,6	7,3	6	4,3	3,2
	R <sub>s</sub>	-	-	-	-	-
E2	t <sub>R1</sub> (min)	36,6	29,1	22,7	17,1	13,2
	k <sub>1</sub>	10,4	7,7	6,0	4,2	3,1
	R <sub>s</sub>	1,08	0,9	1,2	0,82	0,71
E5	t <sub>R1</sub> (min)	55,0	43,1	34,6	26,2	20,2
	k <sub>1</sub>	15,3	11,9	9,6	7,1	5,3
	R <sub>s</sub>	-	-	-	-	-
E6	t <sub>R1</sub> (min)	28,2	22,5	18,1	14,2	11,5
	k <sub>1</sub>	7,3	5,7	4,6	3,4	2,6
	R <sub>s</sub>	0,09	0,07	0,37	0,3	0,13
F9	t <sub>R1</sub> (min)	27,0	21,7	17,6	14,1	11,4
	k <sub>1</sub>	7,0	5,5	4,4	3,3	2,5
	R <sub>s</sub>	1,7	2,0	3,2	4,0	2,7
ZW	t <sub>R1</sub> (min)	47,9	35,6	27,2	20,2	15,2
	k <sub>1</sub>	13,2	9,7	7,3	5,2	3,7
	R <sub>s</sub>	-	-	-	-	-





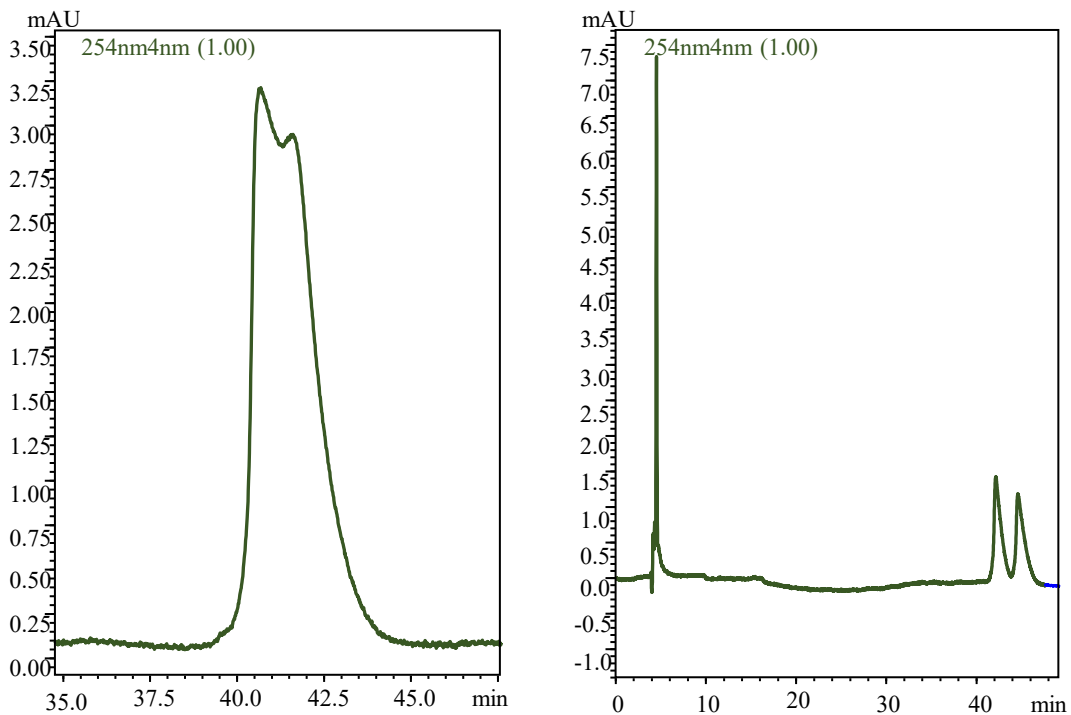
**Obr. 26** chromatogramy vzoriek E2 pri 25°C s  $R_s=1,2$  (vľavo) a F9 pri 32°C s  $R_s= 4,0$  (vpravo) v MF 75% MeOH a 1,25mM EDTA- $\text{Na}_2$

## 5.2. Chirálny selektor: bromovaný $\beta$ -cyklodextrín

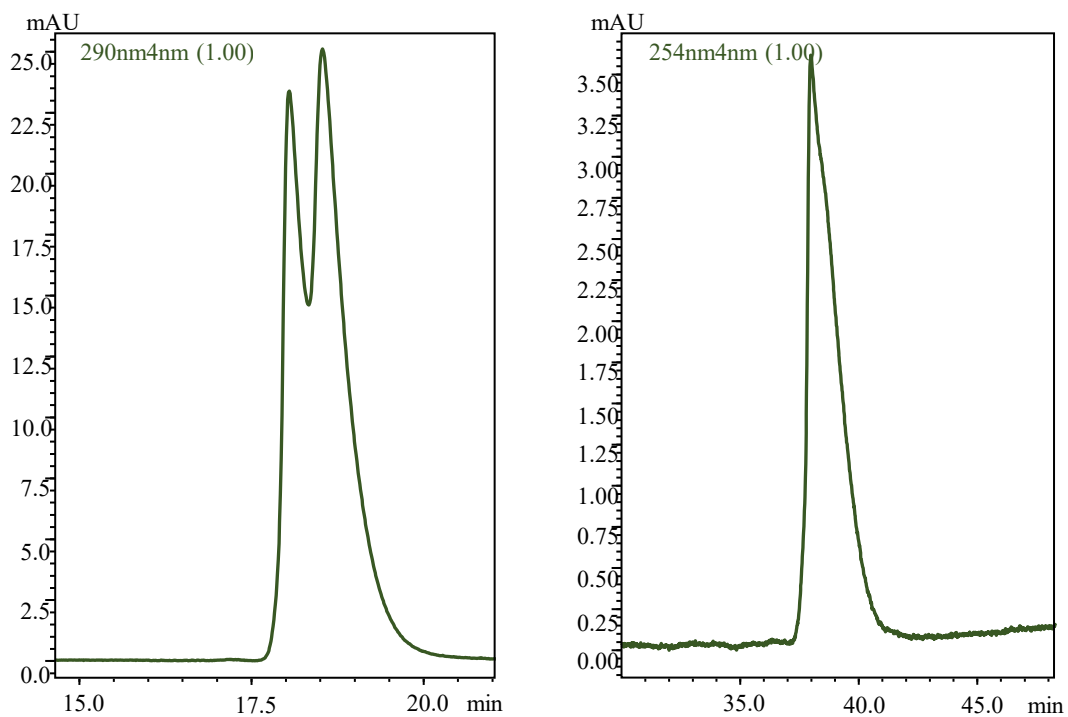
K dispozícii sme mali aj kolónu s bromovaným derivátom  $\beta$ -CD. Tento enantioselektor možno označiť za najvyužiteľnejší pre našu skupinu analytov zo všetkých testovaných, pretože pri nastavení podmienok PO módu zloženého z MeOH AA-TEA (0,1%, 1:1) sme okrem vzorky F9 dosiahli separáciu alebo náznak enantioseparácie u všetkých vzoriek, čo sa na inej kolóne nepodarilo. Kompletnú enantioseparáciu všetkých analytov sme nedosiahli, u vzorky E1 sa náznak separácie prejavil v rozšírení vrcholu píku alebo náznakom dvoch píkov v oblasti vrcholu. Pre lepšie rozlíšenie by boli nutné ďalšie obmeny zloženia MF. Výmenou trietylamínu za dietylamín sa retencia zvýšila bez zlepšenia rozlíšenia. Okrem PO módu bol testovaný aj RP mód. Dá sa predpokladať, že zvýšenie lipofility okraju kavít bromom umocnilo lipofilnú interakciu a tvorbu inklúzneho komplexu s cyklodextrínom. U inak bezproblémovo sa deliacej vzorky F9 sme pozorovali náznak chirálnej separácie len v RP podmienkach 70% MeOH s 0,5 M chloristanom sodným. Opätovne sa nám potvrdil pozitívny vplyv MeOH na enantioseparáciu v porovnaní s inými organickými rozpúšťadlami. Prehľad vybraných podmienok uvádza Tab. 13 nasledovaná chromatogramami Obr. 27 a Obr. 28.

**Tab. 13** vybrané experimentálne podmienky na kolóne YMC CHIRAL  $\beta$ -CD BR–  
chirálny selektor bromovaný  $\beta$ -CD

vzorka	t <sub>R1</sub> (min)	t <sub>R2</sub> (min)	k <sub>1</sub>	R <sub>s</sub>	$\alpha$
<i>100% MeOH- AA:TEA (0,1%, 1:1)</i>					
E1	40,27	-	8,64	-	-
E2	42,14	44,59	9,08	1,62	1,06
E5	31,57	32,15	6,55	0,22	1,02
E6	32,89	34,45	6,87	1,4	1,05
F9	17,01	-	3,07	-	-
ZW	40,67	41,61	8,73	0,06	1,03
B18H22	18,04		3,317	0,59	-
<i>100% MeOH- AA-DEA (0,1%, 1:1)</i>					
E1	44,17	-	9,24	-	-
E2	52,03	55,38	11,03	1,6	1,07
E5	34,79	35,36	7,04	0,03	1,02
E6	37,30	38,89	7,62	1,19	1,05
F9	19,48	-	3,5	-	-
ZW	49,24	-	10,38	-	-
B18H22	20,95	21,55	3,84	0,67	1,04
<i>70% MeOH a 50mM sodíka (NaCl)</i>					
E1	47,99	-	10,12	-	-
E2	54,29	57,79	11,58	1,01	1,07
E5	>80	-	-	-	-
E6	43,79	46,69	9,15	1,25	1,07
F9	36,49	-	7,46	-	-
ZW	57,45	-	12,31	-	-
B18H22	>150	-	-	-	-



**Obr. 27** vzorka ZW vľavo s  $R_s=0,06$  a vzorka E2 vpravo s  $R_s=1,62$   
 MF: 100% MeOH AA:TEA (0,1%, 1:1)



**Obr. 28** vzorka B<sub>18</sub>H<sub>22</sub> vľavo s  $R_s=0,59$  a vzorka E1  
 MF: 100% MeOH AA:TEA (0,1%, 1:1)

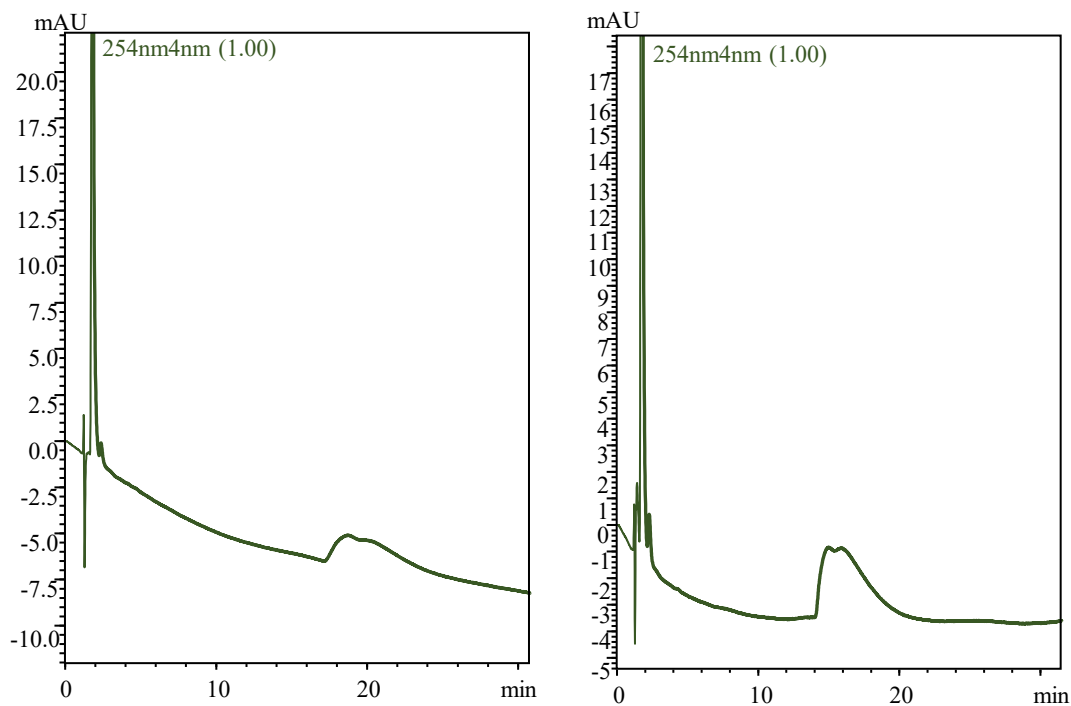
### 5.3. Chirálny selektor: $\alpha_1$ -kyslý glykoproteín

Ďalšou testovanou kolónou bola CHIRALPAK AGP, ktorá ako chirálny selektor obsahuje  $\alpha_1$ -kyslý glykoproteín s izoelektrickým bodom 2,7.[60] Chirálny glykoproteín svojou povahou umožňuje ovplyvňovať náboj povrchu pomocou zmien pH MF, čo sme mali v úmysle využiť pre interakciu s kyslými analytmi a predpokladali sme vhodné podmienky aj pre enantioseparáciu zwitteriontu. Testované podmienky zahŕňali obmenu organickej zložky MF (ACN, MeOH a IPA) v koncentráciach 5-15 % vzhľadom na citlivosť proteínu k organickým kvapalinám. ACN a isopropylalkohol ako súčasti MF skrátili retenciu za cenu straty náznaku separácie. Bol pozorovaný náznak separácie u E2, E6 a ZW minimálne v jednom použitom systéme. Rozsah pH použitého fosfátového pufru bol od 3,2 do 7,0. Znižovanie pH fosfátového pufru (MF s obsahom 10% MeOH, pH 7,0 až 5,8) viedlo k zvyšovaniu retencie až veľmi silnej retencie analytov, ktoré nebolo možné rluovať v čase kratšom než 140 minút. Optimálne pH, pri ktorom sme pozorovali náznak chirálnej separácie ZW a E2 bolo 5,8. Pridaním NaClO<sub>4</sub> k MF 10% MeOH s fosfátovým pufrom o pH 5,8 sa znížila retencia analytov na kolóne s miernym zlepšením rozlíšenia a tvaru pík (Tab. 14 a nasledujúce chromatogramy Obr. 29–31). Zmeny retencie pri posune v pH by mohli byť výsledkom zmien proteínu a vo všetkých prípadoch bol k dispozícii protiiont pre interakciu s negatívne nabitou vzorkou.

**Tab. 14** vybrané výsledky testovaných podmienok na kolóne CHIRALPAK AGP–chirálny selektor  $\alpha_1$ -kyslý glykoproteín

vzorka	t <sub>R1</sub> (min)	t <sub>R2</sub> (min)	k <sub>1</sub>	R <sub>s</sub>	$\alpha$
<i>10% MeOH a 50mM sodíku (NaCl) pH 5,84</i>					
E1	23,85	-	18,66	-	-
E2	14,10	-	10,75	0,06	-
E6	15,89	-	12,24	-	-
ZW	17,81	20,07	13,84	0,26	-
<i>10% MeOH, fosfátový pH 7,0</i>					
E1	12,74	-	9,8	-	-
E2	8,2	-	5,95	-	-
E5	>50	-	-	-	-
E6	8,47	-	6,18	-	-
F9	>120	-	-	-	-
ZW	10,32	-	7,75	-	-

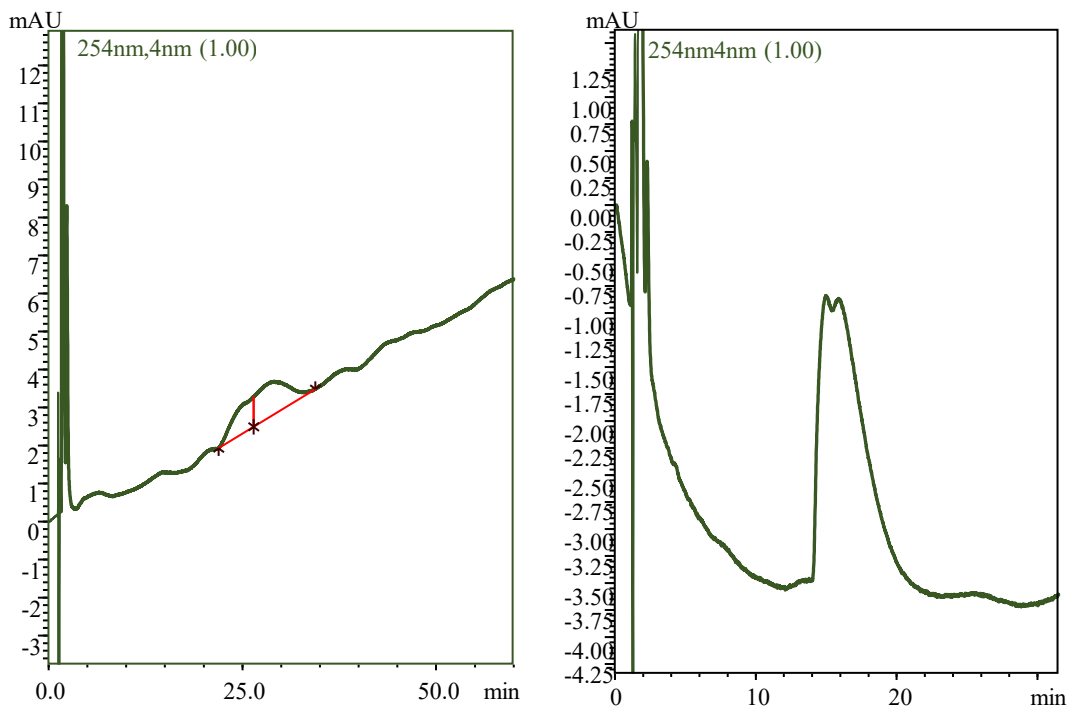
vzorka	$t_{R1}$ (min)	$t_{R2}$ (min)	$k_1$	$R_s$	$\alpha$
<i>10% MeOH, fosfátový pufoř pH 5,8</i>					
E1	32,1	-	25,16	-	-
E2	18,82	20,17	14,34	0,10	1,08
E6	22,06	-	16,98	-	-
ZW	24,96	27,96	19,34	0,11	1,13
<i>10% MeOH, fosfátový pufoř pH 5,8 a 0,3 M NaClO<sub>4</sub></i>					
E1	24,65	-	21,47	-	-
E2	14,99	15,92	12,67	0,03	1,07
E6	16,24	-	13,81	-	-
ZW	18,08	20,92	15,48	0,56	1,17
<i>10% MeOH, pufoř k.fosforečná a dihydrogénfosforečnan pH 5,0</i>					
E1	66,29	-	59,48	-	-
E2	38,71	41,13	34,32	0,06	1,06
E6	42,38	-	37,66	-	-
ZW	44,89	-	39,96	-	-
<i>10% MeOH, pufoř k.fosforečná a dihydrogén fosforečnan pH 3,2</i>					
E1	>140	-	-	-	-
E2	>140	-	-	-	-



**Obr. 29** vzorka E2

vľavo MF 10% MeOH s fosfátovým pušrom, pH 5,8

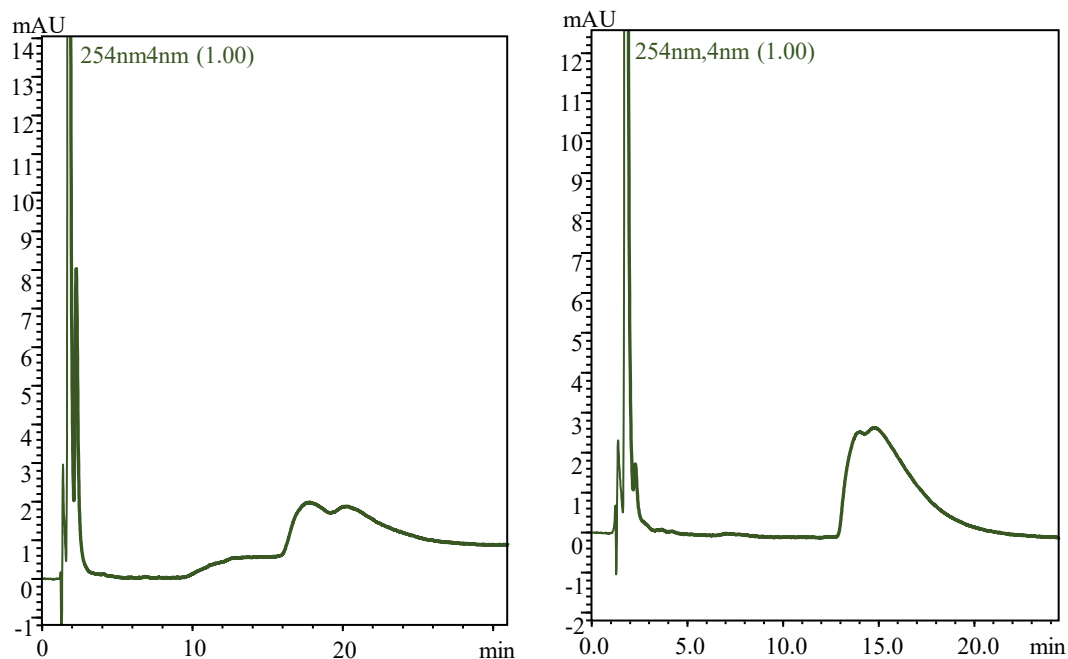
vpravo 10% MeOH s fosfátovým pušrom a NaClO<sub>4</sub>, pH 5,8



**Obr. 30.** vzorka ZW

vľavo 10% MeOH s fosfátovým pušrom, pH 5,8

vpravo 10% MeOH s fosfátovým pušrom a NaClO<sub>4</sub>, pH 5,8



**Obr. 31** chromatogramy látok ZW (vľavo) a E2 (vpravo)  
10% MeOH a 50mM Na (NaCl)

#### 5.4. Chirálny selektor: tris(3,5-dimetylfenylkarbamát) celulózy

Selektorom už v minulosti otestovaným pre chirálne klastre je tris(3,5-dimetylfenylkarbamát) celulózy.[42] Rovnako sme testovali experimentálne podmienky, za ktorých by mohla byť dosiahnutá chirálna diskriminácia. Zmenami pH ani obmenami zloženia a kombináciami organickej zložky sa nám nepodarilo v RP móde dosiahnuť enantioseparáciu. Jej mierny náznak sa objavil len u vzoriek F9 a ZW. Chloristan sodný (1 M) bol použitý ako zdroj protiiontu a na základe doporučenia výrobcu. K dispozícii sme mali kolónu s rovnakým chirálnym selektorom, avšak naviazaným na sorbente z oxidu zirkoničitého. Ani táto kolóna neposkytla vlastnosti umožňujúce oddeliť jednotlivé stereoizoméry. Náznak separácie v podobe naštiepnutého alebo rozšíreného vrcholu poskytol PO mód u vzoriek E1, E6 a ZW. Použité podmienky pozostávali predvážne z PO módu s obmenami použitého pomeru kyseliny a zásady. Použitie RP módu s protiiontom a s rôznymi koncentraciami organickej zložky umožnil elúciu vzoriek bez enantioseparácie.

#### 5.5. Chirálny selektor: o-9-(terc-butylkarbamoyl)chinín

Kolónou umožňujúcou separáciu len bezuhlíkovej vzorky B<sub>18</sub>H<sub>22</sub> CHIRALPAK QN-AX obsahujúca o-9-(terc-butylkarbamoyl)chinín immobilizovaný na silikagel (8S, 9R). Chirálny selektor poskytuje priestor pre slabú iontovú výmenu, avšak pre naše kyslé

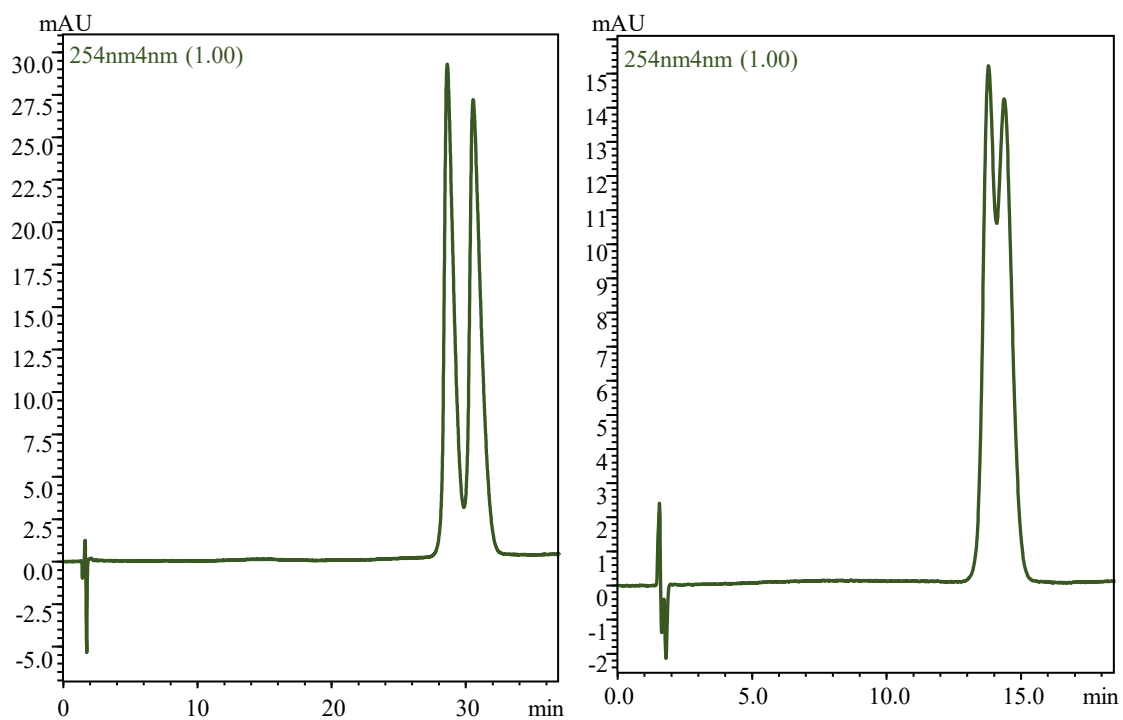
analyty (s výnimkou B<sub>18</sub>H<sub>22</sub>) sa ako chirálny selektor v použitých podmienkach nezdal vhodný a pozorovali sme elúciu vzoriek bez enantioseparácie. Testované podmienky obsahovali PO mód s obmenami organickej zložky (MeOH, ACN, EtOH) a AA, TEA, octanom amónnym (AcNH<sub>4</sub>), mravenčanom amónnym (FA-NH<sub>4</sub>) a kyselinou mravenčou (FA) v kombináciach aj samostatne. Použitím MF s MeOH a 0,1M AcNH<sub>4</sub> sme so skrátením retencie stratili enantioseparáciu u vzorky B<sub>18</sub>H<sub>22</sub>. Opätovne bol pozorovaný pozitívny vplyv prítomnosti MeOH v MF na chirálnu separáciu (R<sub>s</sub>=1,317) v porovnaní s EtOH (R<sub>s</sub>=0,487) (Tab. 15 a Obr.32) alebo v zmesi MeOH s ACN 1:1 (R=0,354) vid'. Tab. 15. Použitím TEA ako zásaditej zložky došlo k niekoľkonásobnému nárastu retencie v porovnaní s AcNH<sub>4</sub>. Zloženie optimálnej MF s najvyšším dosiahnutým rozlíšením pre vzorku B<sub>18</sub>H<sub>22</sub> bolo: MeOH:AA:AcNH<sub>4</sub> (98:2:0,25 v/v/w).

Kolóna CHIRALPAK QN-H2 bola využitá len pre jedny vybrané podmienky (MF: MeOH:AA:AcNH<sub>4</sub> (98:2:0,5 v/v/w)), kedy náznak separácie nebol pozorovaný u žiadnej zo vzoriek.

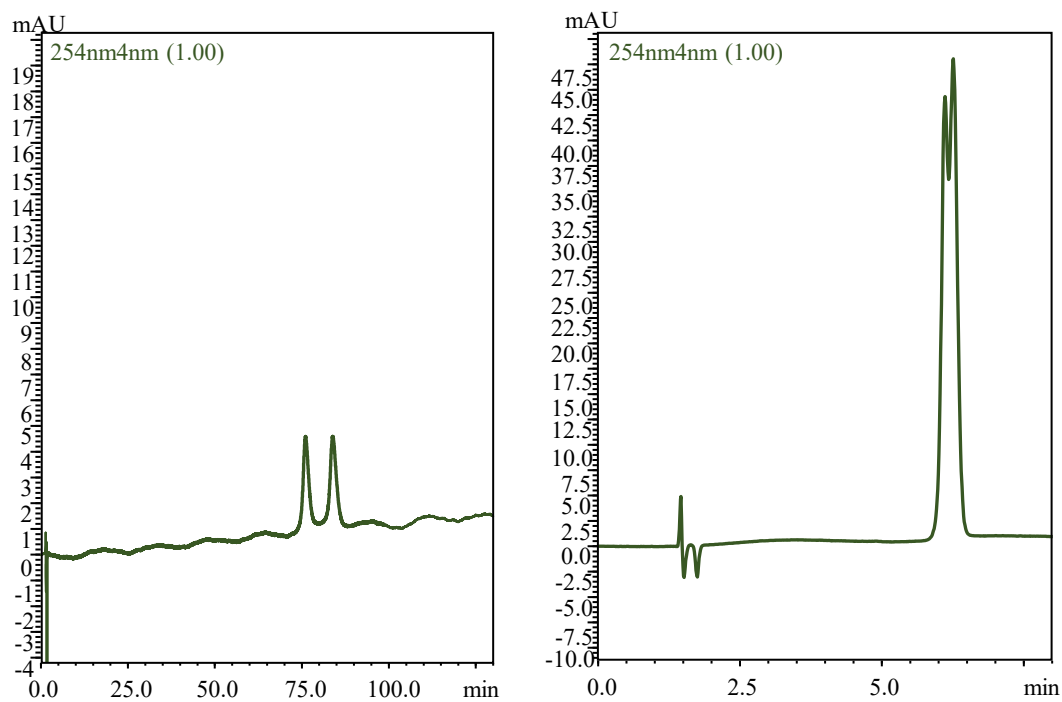
**Tab.15** vplyv jednotlivých MF na elúciu a enantioseparáciu vzorky B<sub>18</sub>H<sub>22</sub>, na chirálnej kolóne CHIRALPAK QN-AX, chirálny selektor: o-9-(terc-butylykarbamoyl)chinín

vzorka	t <sub>R1</sub> (min)	t <sub>R2</sub> (min)	k <sub>1</sub>	R <sub>s</sub>	α
<i>MeOH:AA:AcNH<sub>4</sub> (98 : 2 : 0,5 v/v/w)</i>					
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	28,61	30,54	19,43	1,32	1,07
<i>EtOH:AA:AcNH<sub>4</sub> (98 : 2 : 0,5 v/v/w)</i>					
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	13,79	14,37	8,54	0,49	1,05
<i>MeOH:AA:AcNH<sub>4</sub> (98 : 2 : 0,25 v/v/w)</i>					
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	35,43	37,40	24,51	1,4	1,06
<i>MeOH:ACN:AA:AcNH<sub>4</sub> (49 : 49 : 2 : 0,5 v/v/v/w)</i>					
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	6,11	6,25	3,22	0,35	1,03
<i>MeOH:FA:FA-NH<sub>4</sub> (98:2:0,25 v/v/w)</i>					
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	50,73	56,01	35,23	0,8	-
<i>EtOH:AA:AcNH<sub>4</sub> (98:2:0,5 v/v/w)</i>					
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	13,79	14,37	8,5	0,49	-
<i>MeOH:FA:TEA (98:2:0,25 v/v/v)</i>					
B <sub>18</sub> H <sub>22</sub>	76,1	83,83	50,6	0,82	-





**Obr. 32** chromatogramy vzorky B<sub>18</sub>H<sub>22</sub>  
 vľavo MeOH:AA:AcNH<sub>4</sub> (98 : 2 : 0,5 v/v/w), R<sub>s</sub>=1,32  
 vpravo EtOH:AA:AcNH<sub>4</sub> (98:2:0,5 v/v/w), R<sub>s</sub>=0,49



**Obr. 33** chromatogramy vzorky B<sub>18</sub>H<sub>22</sub>  
 vľavo MeOH:AA:TEA (98:2:0,25) s R<sub>s</sub>= 0,823  
 vpravo MeOH:ACN:AA:AcNH<sub>4</sub> (49:49:2:0,5) s R<sub>s</sub>= 0,354

## 5.6. Chirálny selektor: teikoplanín

U poslednej stereoselektívnej kolóny Chirobiotic T LS tvorenej makrocyclickým glykopeptidom (teikoplanínom) sme v testovaných podmienkach sledovali len minimálnu interakciu so selektorom, prevažovala elúcia v mŕtvom čase.. Doposiaľ enantioseparačne výhodný PO mód v prípade tejto kolóny viedol k elúcii vzoriek v mŕtvom čase. RP mód s rôzne obmieňaným obsahom organickej zložky (10–80 % MeOH) a prídavkom protiiontu v podobe chloristanu sodného nestačil na zadržanie analytov na kolóne a ich stereoselektívnu separáciu napriek prítomnosti 23 chirálnych centier a rôznych výdutín a preliačín SF.

## 6. Záver

Prvou a hlavnou úlohou mojej diplomovej práce bolo objasniť nezrovnalosť doposiaľ publikovaných výsledkov, kedy v kapilárnej elektroforéze sa cyklodextrín ukázal ako vhodný selektor antiontových klastrov, zatiaľ čo vo vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii k rozlíšeniu enantiomérov jeho pomocou nedošlo. Podarilo sa nám potvrdiť, že rovnako ako v kapilárnej elektroforéze, tak aj vo vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii je  $\beta$ -cyklodextrín možné v princípe použiť v úlohe chirálneho selektora bórových klastrov a ich derivátov.

Otestovali sme rôznorodé chirálne aj achirálné chromatografické kolóny s cieľom lepšie pochopiť správanie klastrov v systéme. Achirálné systémy nám slúžili prevažne na určenie správania v jednoduchšom systéme, teda vzťahu medzi klastrami a sorbentom kolóny, pre určenie rozsah vplyvu lipofility, stérických vplyvov a prídavkov pufru.

Využitím chirálnych selektorov (proteíny, polysacharidy, cyklodextrín, modifikovaný cyklodextrín, makrocyclické glykopeptidy, deriváty chinínu), sorbentov (silikagel typu A, silikagel typu B, oxid zirkoničitý), teplôt, prietokov, zložení mobilných fází, módov (PO a RP) a pufov sme zistili, že pôvodný predpoklad, že na retenciu a separáciu klastrov má vplyv pH vďaka zmene ionizácie nebol správny. Vďaka svojmu veľmi kyslému charakteru mali vzorky bórových klastrov tendenciu tvoriť iontový pár s kationtami obsiahnutými v mobilnej fázi alebo dokonca so zvyškami kovov sorbentu (predovšetkým silikagel typu A). Retencia a úspech separácie závisel od druhu prítomného kationtu a jeho koncentrácie. Organické kationty všeobecne výrazne predlžovali retenciu, neznamenalo to však lepšie rozlíšenie. Zmenami teploty sme nezískali jasnú závislosť s rozlíšením, retencia so znižovaním teploty stúpala.

V použitých chirálnych podmienkach sme dosiahli aspoň čiastočnú separáciu u každej z testovaných vzoriek okrem vzorky E1, u ktorej sme pozorovali len rozšírenie vrcholu píku.

## 7. Zoznam citovanej literatúry

- [1] Yashima, E., et al. Differentiation of Enantiomers I, *Top. Curr. Chem.*, **2013**, vol. 340. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 72.
- [2] Maier, N. M., et al., Separation of enantiomers: Needs, challenges, perspectives. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 906.1, 3-33.
- [3] Murakami, H. From racemates to single enantiomers- Chiral synthetic drugs over the last 20 years. *Top. Curr. Chem.*, **2006**, vol. 269, 273–299.
- [4] Subramanian, G. (Eds) *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, 2. vyd. WILEY-VCH Verlag, Weinheim 2001. ISBN 978-3-527-31509-3
- [5] Morris, D. G. *Stereochemistry*. 1. vyd. Wiley-RSC, Cambridge 2001. ISBN 978-0-85404-602-7
- [6] Nguyen, L. A., et al. Chiral Drugs: An Overview. *Int. J. Biomed. Sci.*, **2006**, vol. 2, 85–100.
- [7] Smith, S. W. Chiral toxicology: It's the same thing only different. *Toxicol. Sci.*, **2009**, vol. 110, 4–30.
- [8] Nováková, L. et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi, 1. díl*, 1.vyd. Europrint a.s., Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
- [9] Agranat, I., et al. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2002**, vol. 1, 753–768.
- [10] Mansfield, P., et al. Single-enantiomer drugs: Elegant science, disappointing effects. *Clin. Pharmacokinet.*, **2004**, vol. 43, 287–290.
- [11] Nunez, M. C., et al. Rapid development of chiral drugs in the pharmaceutical industry. *New Dev. Med. Chem.*, **2010**, 95–113.
- [12] Gellad, W. F., et al. Assessing the chiral switch: Approval and use of single-enantiomer drugs, 2001 to 2011. *Am. J. Manag. Care*, **2014**, vol. 20.3, 90–97.
- [13] Van Arnum, P. Advances in asymmetric synthesis. *Pharm. Technol.*, **2007**, 9, vol. 31, 58.
- [14] Shafaati, A. Chiral Drugs: Current Status of the Industry and the Market. *Iran. J. Pharm. Res.*, **2007**, vol. 6.2, 73–74.
- [15] *Top pharma products by global sales 2015* [on-line], [cit.: 2017-07-23].  
Dostupné z: <<https://www.statista.com/statistics/258022/top-10-pharmaceutical->

products-by-global-sales-2011/>.

- [16] Holbach, A., et al. Enantioseparation of chiral aromatic acids in process intensified liquid-liquid extraction columns. *AIChE J.*, **2015**, vol. 61.1, 266–276.
- [17] Snyder, L. R. et al. *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey **2010**. ISBN 978-0-470-16754-0
- [18] Scriba, G. K. E. Chiral recognition mechanisms in analytical separation sciences. *Chromatographia*, **2012**, vol. 75, 815–838.
- [19] Berthod, A. Chiral recognition mechanisms. *Anal. Chem.*, **2006**, vol. 78.7, 2093-2099.
- [20] Li, L., et al. A comprehensive study of the enantioseparation of chiral drugs by cyclodextrin using capillary electrophoresis combined with theoretical approaches. *Talanta*, **2015**, vol. 142, 28–34.
- [21] *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* [on-line], [cit.: 2017-03-27]. Dostupné z: <<http://www.mpip-mainz.mpg.de/3250439/HPLC>>.
- [22] Kazakevich, Y.; LoBrutto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey **2006**. ISBN 978-0-471-68162-5
- [23] *Český lékopis 2002*. Grada Publishing, spol. s.r.o., Praha 2003.
- [24] Resolution Calculation as per EP. [on-line], [cit.: 2017-07-24]. Dostupné z: <<http://stabilitystudies.blogspot.sk/2012/09/resolution-calculation-as-per-ep.html>>.
- [25] *About Resolution, Part 1* [on-line]. SHIMADZU (Shimadzu Corporation), [cit.: 2017-07-24]. Dostupné z: <<http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/resol-1.html>>.
- [26] Pirkle, W. H.; Pochapsky, T. C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatography separation of enantiomers. *Chem. Rev.*, **1989**, vol. 89.2, 347–362.
- [27] Lämmerhofer, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **2010**, vol. 1217.6, 814–856.
- [28] Loftsson, T.; Duchene, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.*, **2007**, vol. 329, 1–11.
- [29] Deckner, G. *Molecular Encapsulation Using Cyclodextrin* [on-line],

- [cit.: 2017-03-24]. Dostupné z: <<https://knowledge.ulprospector.com/499/pcc-molecular-encapsulation-cyclodextrin/>>.
- [30] Beesley, T., Majors, R. E. The State of the Art in Chiral Capillary Gas Chromatography. *LC-GC Eur.*, **2012**, vol. 25, no. 5, pp. 232–243,.
- [31] Lee, J., *et al.* On the method development of immobilized polysaccharide chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using an extended range of modifiers. *J. Chromatogr. A*, **2014**, vol. 1374, 238–246.
- [32] Lévai, S., *et al.* Studies of a pyridino-crown ether-based chiral stationary phase on the enantioseparation of biogenic chiral aralkylamines and  $\alpha$ -amino acid esters by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2015**, vol. 115, 192–195.
- [33] Soriano-Ursúa, M., *et al.* Boron-containing compounds: chemico-biological properties and expanding medicinal potential in prevention, diagnosis and therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2014**, vol. 24, 485–500.
- [34] Zhu, Y.; Hosmane, N. S. Advanced carboraneous materials. *J. Organomet. Chem.*, **2016**, 1–7.
- [35] Valliant, J. F., *et al.* The medicinal chemistry of carboranes. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, vol. 232, 173–230.
- [36] Scholz, M.; Hey-Hawkins, E. Carbaboranes as Pharmacophores: Properties, Synthesis, and Application Strategies. *Chem. Rev.*, **2011**, vol. 111, 7035–7062.
- [37] Johnson, B. F. G., *et al.* A new mechanism for the rearrangement of the icosahedral carboranes. *Inorganica Chim. Acta*, **1993**, vol. 211, 17–21.
- [38] Scholz, M., *et al.*, Carbaboranes as pharmacophores: Similarities and differences between aspirin and asborin. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, vol. 46, 1131–1139.
- [39] Horáková, H., *et al.* Emerging subject for chiral separation science: Cluster boron compounds. *Chirality*, **2011**, vol. 23, 307–319.
- [40] Vespalec, R., *et al.* Electrophoretic investigation of the boron cluster anion [7-(2'-pyridyl)-nido-7,8-dicarbaundecaborate]– and its protonated zwitterionic product. *J. Sep. Sci.*, **2007**, vol. 30, no. 16, 2733–2741.
- [41] Issa, F., *et al.* Boron in Drug Discovery: Carboranes as Unique Pharmacophores in Biologically Active Compounds. *Chem. Rev.*, **2011**, vol. 111, no. 9, 5701-5722.

- [42] Mangelings, D.; et al. Chiral separability of boron cluster species studied by screening approaches utilizing polysaccharide-based chiral stationary phases. *Biomed. Chromatogr.*, **2014**, vol. 28, no. 5, 694–707.
- [43] Horáková, H.; Vespalec, R. Chiral separability of hydrophobic boron cluster anions with native cyclodextrins in water–methanol background electrolytes. *Electrophoresis*, **2007**, vol. 28, no. 20, 3639–3649.
- [44] Slavíček, V., et al., Exploration of the electrophoretic behaviour of borane cluster anions and of the capability of capillary electrophoresis to separate them chirally. *J. Chromatogr. A*, **2003**, vol. 984, no. 1, 121–134.
- [45] Lesnikowski, Z. J. Boron units as pharmacophores - new applications and opportunities of boron cluster chemistry. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, **2007**, vol. 72, no. 12, 1646–1658.
- [46] Farfán-García, E. D., et al. Current data regarding the structure-toxicity relationship of boron-containing compounds. *Toxicol. Lett.*, **2016**, vol. 258, 115-125.
- [47] Schaffran, T., et al., Hemorrhage in mouse tumors induced by dodecaborate cluster lipids intended for boron neutron capture therapy. *Int. J. Nanomed.*, **2014**, vol. 9, no. 1, 3583–3590.
- [48] Ringstrand, B. Boron clusters as structural elements of novel liquid crystalline materials. *Liq. Cryst. Today*, **2013**, vol. 22, no. 2, 22–35.
- [49] Grüner, B., et al. Recent Progress in Extraction Agents Based on Cobalt Bis(Dicarbollides) for Partitioning of Radionuclides from High-Level Nuclear Waste. *Boron Sci.*, **2011**, 463–490.
- [50] Nedunchezian, K. Boron Neutron Capture Therapy - A Literature Review. *J. Clin. Diag. Res.*, **2016**, vol. 10, no. 12, ZE01-ZE04.
- [51] Gianpiero, C., et al. Boron-containing delocalised lipophilic cations for the selective targeting of cancer cells. *Med. Chem. Commun.*, **2017**, vol. 8, no. 1, 67-72.
- [52] Xiong, H., et al., Doxorubicin-Loaded Carborane-Conjugated Polymeric Nanoparticles as Delivery System for Combination Cancer Therapy. *Biomacromolecules*, **2015**, vol. 16, no. 12, 3980–3988.
- [53] Ay, A. N., et al. Carborane-layered double hydroxide nanohybrids for potential targeted-and magnetically targeted- BNCT applications. *Dalton Trans.*, **2017**,

vol. 46, no. 10, 3303-3310.

- [54] Tjarks, W. The use of boron clusters in the rational design of boronated nucleosides for neutron capture therapy of cancer. *J. Organomet. Chem.*, **2000**, vol. 614–615, 37–47.
- [55] Kracke, G. R., et al., Carborane-derived local anesthetics are isomer dependent. *ChemMedChem*, **2015**, vol. 10, no.1, 62–67.
- [56] Řezáčová, P., et al. Design of HIV protease inhibitors based on inorganic polyhedral metallocarboranes. *J. Med. Chem.*, **2009**, vol. 52, no. 22, 7132–7141.
- [57] Wilkinson, S. M.; et al. The First CNS-Active Carborane: A Novel P2X Receptor Antagonist with Antidepressant Activity. *ACS Chem. Neurosci.*, **2014**, vol. 5, no. 5, 335–339.
- [58] Valeri, A. L. Capillary electrophoresis of boron cluster compounds in aqueous and nonaqueous solvents. *Electrophoresis*, **2008**, vol. 29, no.8, 1658–1666.
- [59] Gruner, B.; Plzak, Z. High-performance liquid chromatographic separations of boron-cluster compounds. *J. Chromatogr. A*, **1997**, vol. 789, no. 1–2, 497–517.
- [60] Sigma Aldrich, Operating Guidelines for ChromTech CHIRAL-AGP, CHIRAL-HSA, and CHIRAL-CBH HPLC Columns About Protein-Based Chiral Stationary Phases (CSPs).