

HABILITAČNÍ PRÁCE

**Mechanismus separace a aplikační potenciál
chromatografických separačních systémů**

RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

2017

Obsah

Seznam použitých zkratk	3
Předmluva	4
1. Úvod do problematiky popisu mechanismu separace v chromatografických systémech	5
1.1 Chromatografické systémy	5
1.2 Charakterizace chromatografických separačních systémů	7
1.2.1 Model lineárních vztahů volných energií	8
2. Výsledky a diskuze	11
2.1 Studované separační systémy	11
2.1.1 Studium systémů HILIC	11
2.1.2 Charakterizace chirálních systémů	15
2.1.2.1 HPLC	15
2.1.2.2 SFC	21
3. Závěr	25
4. Seznam literatury	27
5. Publikace přiložené k této práci	30

Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
ANPC	vodná chromatografie na normálních fázích
CF	cyklofruktan
CF6, CF7	nativní cyklofruktan se 6 resp. 7 fruktofuranózovými jednotkami
CS	chirální selektor
CSF	chirální stacionární fáze
DMP CF7	dimethylfenyl cyklofruktan 7
GC	plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IP CF6	cyklofruktan 6 derivatizovaný izopropylovými skupinami
LFER	model lineárních vztahů volných energií
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
NP	normální mód
RN CF6	<i>R</i> -naftylethyl cyklofruktan 6
RP	reverzní mód
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie
TEA	triethylamin
TFA	kyselina trifluoroctová
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Předmluva

Předkládaná práce představuje soubor vybraných publikací zaměřených na studium mechanismu separace v chromatografických systémech, popis interakcí, které se uplatňují při retenčním a separačním procesu, a také na postupy při optimalizaci chromatografických podmínek pro konkrétní směsi látek a chirální analyty. Do této práce jsem vybrala 11 publikací zabývajících se touto problematikou. Důvodem pro řešení této problematiky je rozmanitost chromatografických systémů. Pochopení fyzikálně-chemických dějů, které probíhají v rámci chromatografického procesu, jednak umožňuje uskutečnit obecnější závěry, a také zjednodušuje výběr vhodného systému pro konkrétní účely.

Práce se skládá z několika částí. V úvodní části jsou popsány chromatografické systémy a některé modely a přístupy, které se používají k jejich charakterizaci. V další části jsou shrnuty naše příspěvky ke studiu mechanismu separace v různých chromatografických systémech, tj. hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, chirální vysokoúčinná kapalinová chromatografie a superkritická fluidní chromatografie s různými chirálními stacionárními fázemi a v různých separačních módech. Poslední část tvoří 11 původních publikací, které jsou v textu označeny římskými číslicemi.

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, ať už z vědeckého či reálného světa, kteří mají jakýkoliv podíl na této práci.

1. Úvod do problematiky popisu mechanismu separace v chromatografických systémech

1.1 Chromatografické systémy

Mezi nejčastěji používané chromatografické metody pro separace směsí chirálních i nechirálních analytů patří vysokoúčinná popřípadě ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, UHPLC), superkritická fluidní chromatografie (SFC) a plynová chromatografie (GC). Systém HPLC/UHPLC lze použít v různých separačních módech. Nejdéle známým je tzv. nevodný normální mód (NP), ve kterém se pro separace využívá polární stacionární fáze (SF) a nepolární mobilní fáze (MF). Mobilní fáze jsou nejčastěji tvořeny alifatickými uhlovodíky jako je hexan nebo heptan s přidávkem alkoholů (propan-2-ol, ethanol, methanol), které zvyšují polaritu MF a tím usnadňují eluci analytů z chromatografické kolony. V závislosti na separovaných látkách a použité stacionární fázi jsou do mobilní fáze také přidávána kyselá (např. trifluoroctová kyselina) či bazická (triethylamin, diethylamin apod.) aditiva, popřípadě kombinace obou aditiv. Pro achirální separace se nejčastěji využívají čistě silikagelové stacionární fáze. Nicméně v dnešní době jsou tyto separační systémy nahrazovány reverzním módem (RP) HPLC nebo hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií (HILIC). NP HPLC má ale významné zastoupení v oblasti chirálních separací. Pro tento mód existuje řada chirálních stacionárních fází (CSF), např. CSF na bázi makrocyclických antibiotik (teikoplanin, vankomycin apod.), polysacharidové CSF na bázi derivatizované celulózy a amylózy, oligosacharidové cykloextrinové a cyklofruktanové CSF [1].

Pro běžný NP systém, u kterého je retence dána adsorpcí analytu na povrch stacionární fáze byl odvozen vztah mezi retencí a molární frakcí složky MF s vyšší eluční silou (B) (rovnice 1) [2, 3]:

$$\log k = \log k_B - \frac{A_S}{n_B} \log N_B \quad (1)$$

kde kretenční faktor

k_Bretenční faktor analytu v mobilní fázi složené pouze ze složky B

A_Splocha na povrchu stacionární fáze obsazená molekulami analytu

n_Bplocha na povrchu stacionární fáze obsazená molekulami

rozpuštědla B

N_Bmolární frakce složky B v mobilní fázi

Dalším, velmi často používaným systémem je reverzní mód kapalinové chromatografie. Tento systém má obrácenou polaritu stacionární a mobilní fáze a tudíž i eluční pořadí analytů ve srovnání s NP. Typická mobilní fáze pro RP mód je směs organického modifikátoru (methanol, acetonitril, ethanol, propan-2-ol) a vodné složky (voda nebo vodný pufr). Pro achirální separace se velmi často používají stacionární fáze s oktylovými či oktadecylovými skupinami vázanými na vhodném nosiči. Pro chirální separace je možné použít většinu chirálních selektorů jako pro separace v NP HPLC. V závislosti na použitém módu se na mechanismu separace podílejí různé interakce. Pro „ideální“ RP systém se předpokládá, že se uplatňuje pouze rozdělování analytu mezi dvě fáze [3]. Pro použití binární mobilní fáze byl odvozen vztah vyjadřující nelineární závislost logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku φ složky mobilní fáze s vyšší eluční silou (rovnice 2) [4]:

$$\log k = A\varphi^2 + B\varphi + C \quad (2)$$

kde A, B, C jsou konstanty.

V roce 1990 A. J. Alpert zavedl název hydrofilní interakční kapalinová chromatografie pro separační systém, který je tvořený polární stacionární fází a relativně nepolární mobilní fází, která obsahuje vodnou složku jako silnější eluční činidlo [5]. Pro tento systém se též používá termín „vodná chromatografie na normálních fázích“ (ANPC) [6, 7]. Stacionární fáze jsou nejčastěji tvořeny buď čistým silikagelem [8], nebo silikagelem derivatizovaným různými polárními skupinami (amidové, diolové, sulfoalkylbetainové apod.) [9, 10] nebo molekulami (např. cyklofruktan, cyklodextrin) [11, 12]. Mobilní fáze je tvořena organickým modifikátorem, nejčastěji acetonitrilem (minimálně 60-70 objemových %) a vodnou složkou, tj. vodou nebo vodnými pufrů (minimálně 5 objemových %). Mechanismus separace v HILIC je komplexní a zatím není zcela objasněn. Studium jeho popisu se zabývá řada výzkumných skupin [např. 9, 12-16]. Během separace se uplatňuje jednak adsorpce na povrch stacionární fáze (jako u NP) a jednak rozdělování analytu (jako u RP) mezi vodnou vrstvu částečně sorbovanou na povrch stacionární fáze a mobilní fázi [3, 17]. Tyto dílčí procesy lze popsat rovnicemi 1 a 2. Pro detailnější popis interakcí, které se uplatňují v separačním systému, je však zapotřebí použít jiné přístupy. Jedním z vhodných přístupů popisu interakcí v různých, zejména chromatografických systémech je model lineárních vztahů volných energií (LFER) [např. 18-20]. Tento model bude podrobně popsán dále.

V posledních letech se dostává do popředí separačních metod superkritická fluidní chromatografie. Nárůst používání této metody je spojen s produkcí spolehlivější a robustnější

instrumentace [21]. Hlavní složkou mobilní fáze je superkritická tekutina, zejména se používá superkritický CO₂, jehož hodnoty kritické teploty ($T_C=304,12$ K) a kritického tlaku ($p_C=73,74$ bar) lze dosáhnout technologicky nenáročnými postupy [22]. Výhodou těchto tekutin je, že mají viskozitu a difúzní koeficienty podobné plynům, zatímco jejich solvatační schopnosti a hustota jsou podobné kapalinám [23]. Uvádí se, že polarita CO₂ je srovnatelná s polaritou *n*-hexanu, který se často používá jako majoritní složka mobilní fáze v NP HPLC. Eluční síla mobilní fáze se zvyšuje přidávkem organického modifikátoru, nejčastěji se používají různé alkoholy nebo acetonitril [24, 25]. K ovlivnění selektivity a tvaru píků se do MF přidávají kyselá a/nebo bazická aditiva, která také ovlivňují disociaci/protonizaci analytů a funkčních skupin stacionárních fází. Dalšími parametry, které mají významný vliv na separaci v SFC jsou teplota a zpětný tlak [26, 27]. Těmito parametry lze ovlivnit hustotu a viskozitu mobilní fáze a tím i její solvatační schopnosti. Většina kolon pro HPLC je použitelná i pro separace v SFC. Pro popis interakcí, které se uplatňují při retenčním a separačním procesu v SFC je vhodný model LFER [28-30].

1.2 Charakterizace chromatografických separačních systémů

V literatuře je možné najít velké množství různých modelů a metod pro popis stacionárních fází nebo separačních systémů [31, 20], nicméně žádný z nich není všeobecně akceptován z důvodu složitosti chromatografického systému a počtu parametrů, které ovlivňují retenci a separaci analytů/enantiomerů. Mezi používané metody lze zařadit spektroskopické metody (např. nukleární magnetická rezonance, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací), rentgenová difrakce, statistické metody (např. analýza hlavních komponent, faktorová analýza), určení fyzikálních vlastností stacionární fáze, molekulární modelování, termodynamická měření (van't Hoffovy závislosti) a chromatografické testy [20, 31, 32]. Chromatografické testovací metody jsou založeny na měření retenčních a separačních faktorů tzv. testovacích solutů, což jsou analyty s dobře definovanými vlastnostmi nebo se sleduje symetrie píků těchto analytů a separační účinnost [31]. Tyto postupy, mezi které patří např. Waltersův test, Engelhardtův test, Tanakův test, se využívají zejména pro zjištění silanolové aktivity, hydrofobicity, separační účinnosti, stérické selektivity apod. stacionárních fází. Pro popis vztahů mezi chemickou strukturou analytu a interakcemi, kterých se analyt v chromatografickém systému účastní, je třeba zahrnout celé spektrum fyzikálně-chemických interakcí, které ovlivňují retenci analytu v daném systému. K tomu lze použít modely, ve kterých se koreluje změny termodynamických veličin s retenčními daty. Mezi tyto modely

patří i model LFER, který jsme často využívali a bude podrobně vysvětlen v následující kapitole.

1.2.1 Model lineárních vztahů volných energií

Model lineárních vztahů volných energií patří mezi nejčastěji používané přístupy pro popis interakcí uplatňujících se v retenčním/separačním mechanismu. LFER vyjadřuje lineární závislost změny standardní Gibbsovy energie (ΔG^θ) na vlastnostech prostředí. Se změnou Gibbsovy energie dochází ke změně všech vlastností, které s ní souvisejí, v případě chromatografického procesu se jedná o změnu retenčního faktoru k . Přenos analytu z mobilní do stacionární fáze je spojen se změnou standardní Gibbsovy energie systému - viz rovnice 3.

$$\ln k = \frac{-\Delta G^\theta}{RT} + \ln \varphi \quad (3)$$

kde kretenční faktor
 ΔG^θzměna standardní Gibbsovy energie systému
 Runiverzální plynová konstanta
 Ttermodynamická teplota
 φfázový poměr

Model LFER, též nazývaný Abrahamův model (Abraham v 90. letech 20. století představil nové solvatační parametry (deskriptory) pro velký počet sloučenin [33, 34]), v separačních metodách koreluje retenci s vlastnostmi analytu. Základní LFER rovnice obsahuje pět interakčních parametrů - viz rovnice 4 [35-37].

$$\log k = aA + bB + eE + sS + vV + c \quad (4)$$

kde k retenční faktor

Velká písmena na pravé straně rovnice představují deskriptory analytů, které popisují jejich fyzikálně-chemické vlastnosti:

- A ...celková nebo efektivní acidita vodíkové vazby, interakce prostřednictvím vodíkové vazby
- B ...celková nebo efektivní bazicita vodíkové vazby, interakce prostřednictvím vodíkové vazby
- E ...rozsah molární refrakce, disperzní interakce
- S ...parametr dipolarity/polarizibility, elektrostatické interakce

V ...McGowanův charakteristický objem solutu, hydrofobní interakce, deskriptor zahrnuje disperzní a kohezivní interakce (schopnost tvorby kavity) analytu s chromatografickým systémem.

Regresní koeficienty a , b , e , s , v se získávají multidimenzionální lineární regresí a popisují rozdíly v dané fyzikální vlastnosti, tj. molekulární interakci mezi stacionární a mobilní fází. Pokud je hodnota regresního koeficientu kladná, pak je daná interakce preferována mezi analytem a SF. V případě záporné hodnoty regresního koeficientu je tato interakce silnější mezi analytem a MF a snižuje retenci. Člen c odpovídá změnám ve fázovém poměru systému a zahrnuje všechny vlivy na retenci, které nejsou zahrnuty v uvedených pěti regresních koeficientech [38].

Pro popis separačních systémů se stacionárními fázemi s nabitými skupinami byly do základní LFER rovnice přidány dva členy D^- a D^+ , které mají popisovat iontové interakce [20, 39, 40] - viz rovnice 5.

$$\log k = aA + bB + eE + sS + vV + d^- D^- + d^+ D^+ + c \quad (5)$$

Deskriptory D^- a D^+ popisují stupeň disociace a protonizace analytů - viz rovnice 6 a 7.

$$D^- = \frac{10^{(pH^* - pK^*)}}{1 + 10^{(pH^* - pK^*)}} \quad (6)$$

$$D^+ = \frac{10^{(pK^* - pH^*)}}{1 + 10^{(pK^* - pH^*)}} \quad (7)$$

kde pH^* „efektivní“ hodnota pH směsné mobilní fáze, tj. ${}_s pH$,

pK^* „efektivní“ hodnota disociační konstanty analytu ve vodno-organické mobilní fázi

Hodnota pH^* by měla být měřena v použité mobilní fázi pomocí elektrody kalibrované na organické resp. vodno-organické pufrů. Nicméně v praxi se pro zjednodušení používají hodnoty ${}_w pH$, tj. hodnota pH vodno-organické mobilní fáze měřená elektrodami kalibrovanými vodnými pufrů a disociační konstanty analytů ve vodě [40], což přispívá k chybě modelu. Tímto modelem je možné určitým způsobem popsat uplatnění iontových interakcí v separačním systému, ale stupeň ionizace nemusí svědčit o efektivním náboji analytů pro interakce s nabitými skupinami na stacionární fázi, např. kvůli sterickému efektu

[20]. Některé práce ukazují, že použití rovnice 5 vykazuje vyšší nejistotu výsledků než použití modelu pro neutrální látky (rovnice 4) [19, 41].

C. West a kol. modifikovali základní LFER rovnici pro popis interakcí uplatňujících se v chirálních systémech a aplikovali ji pro polysacharidové CSF v SFC - viz rovnice 8 [např. 42-44]. Do rovnice byly přidány 2 deskriptory, globularita (G) a flexibilita (F). Tyto deskriptory mají různé hodnoty pro jednotlivé enantiomery, zatímco hodnoty ostatních deskriptorů jsou pro enantiomery totožné. Deskriptor F charakterizuje flexibilitu molekuly, respektive frakci rotovatelných vazeb v molekule. Tento deskriptor byl přidán z důvodu, že flexibilní molekuly mají více konformerů a mohou tedy interagovat různým způsobem prostřednictvím intermolekulárních interakcí, což je důležité pro enantioseparace. Deskriptor G je vztažen k sterickému odporu molekuly k průniku do stacionární fáze. Pro malé molekuly popisuje lepší fit do kavity a tím umožnění několika interakcí najednou [42].

$$\log k = aA + bB + eE + sS + vV + fF + gG + c \quad (8)$$

Aplikace této modifikované rovnice přinesla pouze mírnou shodu s experimentálními daty a není obecně použitelná jako základní LFER rovnice (rovnice 4).

2. Výsledky a diskuze

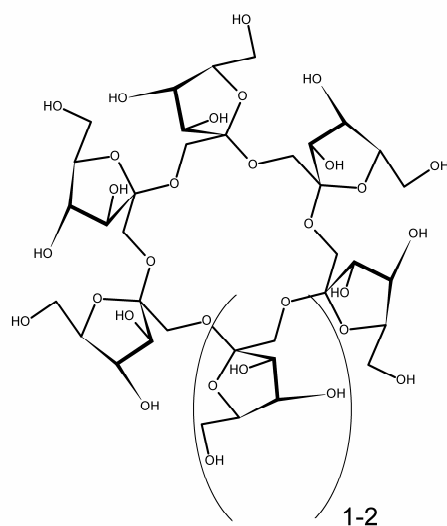
2.1 Studované separační systémy

Model LFER a další testy byly použity pro podrobnější popis separačních systémů HILIC, chirálních HPLC a SFC systémů. V těchto systémech byly také optimalizovány podmínky pro separace konkrétních analytů pro praktické uplatnění.

2.1.1 Studium systémů HILIC

HILIC se velmi osvědčila pro separace malých polárních a ionizovatelných látek, které mají nedostatečnou retenci v RP HPLC [45]. Modifikace silikagelu polárními skupinami nebo molekulami poskytuje další interakce, které mohou zlepšit separaci. Vliv navázání nativního cyklofruktanu (CF6) a derivatizovaného izopropylovými skupinami (IP CF6) na silikagelový nosič na interakce, které se uplatňují v HILIC byl testován modelem LFER a Waltersovým testem popisujícím silanolovou aktivitu a hydrofobicitu [I]. Rovnice 1 a 2 byly použity pro popis mechanismu, tj. uplatnění rozdělování a adsorpce během chromatografického procesu. V těchto systémech byl také sledován vliv typu stacionární fáze na separace směsí pentapeptidů a nonapeptidů.

Cyklofruktany jsou cyklické oligosacharidy, jejichž molekuly se skládají z šesti a více β -(2 \rightarrow 1) D-fruktofuranózových jednotek [46]. Struktura cyklofruktanu (CF) je znázorněna na Obr. 1. Každá tato jednotka obsahuje čtyři stereogenní centra a tři hydroxylové skupiny, které se využívají pro derivatizaci. Pro přípravu SF se nejvíce osvědčily CF se šesti (CF6) a sedmi (CF7) fruktofuranózovými jednotkami. Nativní cyklofruktany vykazují nízkou enantioselektivitu. Enantioselektivita se výrazně zvýší derivatizací vhodnými skupinami, např. *R*-naftylethyl, dimethylfenyl [47]. Molekula cyklofruktanu je polární a tudíž vhodná pro použití v HILIC.

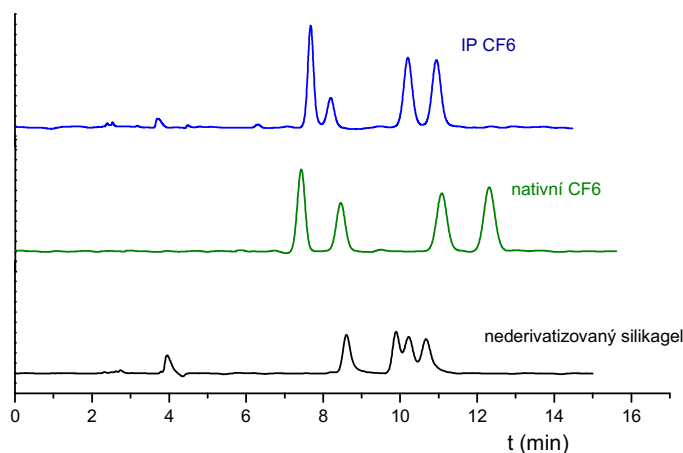


Obr. 1: Struktura cyklofruktanu.

Na základě testování vlivu složení mobilní fáze na separaci směsi penta- a nonapeptidů byly vybrány MF složené z acetonitrilu (ACN) a 20mM octanu amonného, pH 4,00 pro podrobnější charakterizaci. Vynesením závislostí, které popisují rovnice 1 a 2 bylo zjištěno, že na všech třech studovaných stacionárních fázích (tj. nederivatizovaná silikagelová, nativní cyklofruktanová a derivatizovaná cyklofruktanová izopropylóvými skupinami) se na mechanismu separace podílí jednak rozdělování analytu mezi vodnou vrstvu sorbovanou na povrch SF a mobilní fázi a také adsorpce peptidů na SF. Model LFER byl následně použit pro kvalitativní a kvantitativní určení interakcí, které se uplatňují v retenčním/separačním mechanismu. Tři MF ACN/20mM octan amonný, pH 4,00 80/20; 83/17 a 88/12 (v/v) byly vybrány pro charakterizaci těchto systémů. V systému s nederivatizovanou silikagelovou SF k retenci přispívá pouze jeden typ interakce a to interakce prostřednictvím vodíkové vazby vyjádřená regresním koeficientem b . Překvapivě složení MF nemá významný vliv na hodnotu tohoto koeficientu. Derivatizace silikagelu CF6 a IP CF6 přinesla další interakce ovlivňující retenci/separaci. Regresní koeficient s , popisující interakce dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól je statisticky významný na nativní CF6 při použití všech tří mobilních fází. Kladná hodnota tohoto koeficientu vyjadřuje, že tato interakce je silnější mezi analytem a SF než analytem a MF. Hodnota koeficientu s roste s klesajícím množstvím ACN v MF. Stejný trend byl pozorován v systémech s IP CF6, avšak hodnoty koeficientu s byly nižší. Derivatizace nativního CF6 izopropylóvými skupinami snižuje uplatnění těchto interakcí. Disperzní interakce (v RP nazýváno hydrofobicita) vyjádřené regresním koeficientem v jsou preferovány mezi analytem a MF, což je typické pro NP a HILIC. Vyšší absolutní hodnoty koeficientu v byly získány pro nativní CF6 SF. Pro systémy s oběma kolonami platí, že rozdíl v disperzních interakcích mezi SF a MF roste s rostoucím množstvím pufru v mobilní fázi.

Výsledky LFER jsou podpořeny shodou s Waltersovým testem, kdy nejvyšší „hydrofobicitu“ vykazuje nederivatizovaná silikagelová SF a nejnižší nativní CF6 SF.

Výsledky separací směsí penta- a nonapeptidů ukazují, že nejnižší selektivitu vykazuje nederivatizovaná silikagelová SF, zatímco nejvyšší selektivitu nativní CF6 SF (Obr. 2). Lze shrnout, že modifikace silikagelu CF a derivatizovaným CF představuje nové stacionární fáze vhodné pro HILIC se selektivitou pro biologicky aktivní látky.



Obr. 2: Chromatogram separace pentapeptidů. MF ACN/20mM octan amonný, pH 4,00 83/17 (v/v). Eluční pořadí: leucin enkefalinamid, [D-Ala²]-leucin enkefalin, leucin enkefalin, [Met⁵] enkefalin.

Stacionární fáze se stejnými funkčními skupinami, respektive selektory mohou poskytovat různou separační účinnost a selektivitu. Tyto rozdíly jsou dány např. druhem silikagelových částic nosiče, typem vazby funkční skupiny na nosič. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na studium těchto rozdílů u dvou amidových SF vhodných pro HILIC [II]. Pro tyto účely byly provedeny různé testy, tj. zjištění převládajícího retenčního mechanismu (rovnice I a II), testy selektivity pro methylovou, hydroxy a amino skupinu. Přestože jsou tyto selektory neutrální, iontové interakce se silikagelovým nosičem mohou ovlivňovat retenci zejména bazických analytů. Uplatnění iontových interakcí se silikagelovým nosičem bylo testováno použitím sady bazických analytů s různými pK_a hodnotami. Pro kvalitativní a kvantitativní porovnání interakcí byl aplikován model LFER. Teplota patří mezi parametry, které významně ovlivňují retenci, selektivitu a rozlišení v chromatografii. Vliv teploty na retenci byl studován za použití van't Hoffovy rovnice (viz rovnice 14).

Tato rovnice vychází ze dvou termodynamických rovnic (rovnice 9 a 10) [48]:

$$\Delta G^\ominus = \Delta H^\ominus - T\Delta S^\ominus \quad (9)$$

$$\Delta G^\ominus = -RT \ln K \quad (10)$$

kde ΔG^\ominus ...změna standardní Gibbsovy energie

ΔH^\ominus ...změna standardní entalpie přenosu

ΔS^\ominus ...změna standardní entropie přenosu

R ...univerzální plynová konstanta

T ...termodynamická teplota

K ...rovnovážná konstanta

Vyjádřením $\ln K$ a úpravou rovnic 9 a 10, získáme van't Hoffovu rovnici v následujícím tvaru (rovnice 11):

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\ominus}{RT} + \frac{\Delta S^\ominus}{R} \quad (11)$$

Pro $\ln K$ platí v chromatografii následující vztah:

$$\ln K = \ln k\beta \quad (12)$$

kde k ...retenční faktor

$$\beta \dots \text{fázový poměr: } \beta = \frac{V_M}{V_S} = \frac{1}{\varphi} \quad (13)$$

V_Mobjem mobilní fáze

V_Sobjem stacionární fáze

Dosažením součinu $k \cdot \frac{1}{\varphi}$ za K , získáme nejčastěji používanou formu van't Hoffovy rovnice

v chromatografii (rovnice 14):

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\ominus}{RT} + \frac{\Delta S^\ominus}{R} + \ln \varphi \quad (14)$$

kde kretenční faktor

φfázový poměr.

Ostatní parametry rovnice jsou popsány výše. Pro β i φ se používá v literatuře stejný termín fázový poměr.

Na základě vyjmenovaných testů byly prokázány rozdíly v interakčním chování a selektivitě dvou amidových kolon, tj. XBridge Amide a TSK gel Amide-80. Kolona TSK gel Amide-80 poskytuje silnější interakce prostřednictvím vodíkové vazby, a to jak ve schopnosti působit jako donor vodíku, tak i akceptor vodíku (vyšší hodnoty regresních koeficientů a i b).

Tyto výsledky byly potvrzeny separací směsí pentapeptidů a nukleových bazí. Vyšší retence všech těchto analytů vykazovala TSK gel Amide-80 kolona. Naopak, vyšší účinnost a selektivitu zejména pro pentapeptidy poskytuje kolona XBridge Amide. Za stejných chromatografických podmínek (MF ACN/20mM octan amonný, pH 4,00 85/15 (v/v)) došlo k separaci na základní linii směsi čtyř pentapeptidů ze skupiny enkefalinů pouze na koloně XBridge Amide. Zvýšením množství ACN v MF je možné dosáhnout separace na základní linii i na koloně TSK gel Amide-80, ale s výrazným zvýšením doby analýzy. Rozdíl v účinnosti je také částečně dán rozdílnou velikostí částic těchto kolon (3,5 μm pro XBridge Amide a 5 μm pro TSK gel Amide-80). Naopak selektivitu pro methylenovou skupinu (poměr retenčních faktorů uridinu a 5-methyluridinu) [49] popisující „hydrofobicitu“ mají obě kolony totožnou, což je potvrzeno i stejnou hodnotou regresního koeficientu v LFER rovnice. Obě kolony také vykazují stejnou selektivitu pro hydroxyskupinu (poměr retenčních faktorů uridinu a 2'-deoxyuridinu). Selektivita pro amino skupinu vyjádřená jako podíl retenčních faktorů aminokyseliny a jejího *N*-blokovaného analogu se liší pro jednotlivé kolony. Vyšší selektivita pro kolonu TSK-gel Amide 80 indikuje, že při daném pH 4,00 se na retenci na této koloně více uplatňují iontové interakce, což je ve shodě s vyšší hodnotou regresního koeficientu b LFER rovnice. Testování iontových interakcí sadou bazických látek, které se liší hodnotami disociačních konstant, podpořilo tyto výsledky. Selektivita vypočtená jako podíl retenčního faktoru plně nabitě báze a částečně nabitě báze je rozdílná pro testované kolony. Analyty, které jsou plně nabitě při pH 4,00 vykazují relativně vyšší retenci na koloně TSK-gel Amide 80. Těchto interakcí se účastní zejména nosič, na kterém je navázán amidový selektor. Studium teplotních závislostí ukázalo, že nedochází ke změně retenčního mechanismu v rozmezí teplot 10-40°C na obou kolonách. Na základě těchto výsledků je možné říct, že testované amidové kolony vykazují podobné, ale nikoliv stejné fyzikálně-chemické interakce.

2.1.2 Charakterizace chirálních systémů

2.1.2.1 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří mezi nejčastěji používané metody pro separace chirálních látek. V dnešní době existuje řada typů chirálních stacionárních fází, ale stále pokračuje i vývoj, zabývající se syntézou nových chirálních selektorů a nosičů a ukotvením selektorů na nosič. Snahou je vytvořit co nejuniverzálnější fáze pro celou škálu chirálních látek, odolné proti vysokým tlakům a použitelné v co nejširším rozsahu pH.

V této práci se budu podrobněji zabývat dvěma typy CSF - cyklofruktanovými a polysacharidovými. Cyklofruktanové CSF jsou relativně nové fáze, poprvé byly použity pro enantioseparace v HPLC v roce 2009 [47]. Polysacharidové CSF na bázi derivatizované celulózy a amylozy patří v dnešní době mezi nejčastěji používané fáze. Přestože základní LFER rovnice neobsahuje parametry popisující stereoselektivní interakce, umožňuje tento model objasnit interakce ovlivňující retenci analytů. Ze známé struktury enantiomerů a hodnot regresních koeficientů LFER rovnice lze získat určitou představu o enantioselektivitě daného separačního systému.

Derivatizované cyklofruktanové CSF našly uplatnění pro chirální separace řady enantiomerů [47, 50]. Tyto CSF jsou multimodální, tzn. je možné je použít ve všech separačních módech, ale vyšší selektivitu vykazují převážně v NP. Proto byly testovány tři cyklofruktanové chirální stacionární fáze modelem LFER v NP, který umožnil odhalit interakce, které ovlivňují retenci a separaci analytů. Konkrétně se jednalo o tyto selektory vázané na silikagelový nosič: izopropylovaný CF6 (IP CF6), *R*-naftylethyl CF6 (RN CF6) a dimethylfenyl CF7 (DMP CF7) [III, IV]. CF6 a CF7 značí, že molekula obsahuje šest respektive sedm fruktofuranózových jednotek. Pro testování byly použity dvě MF: hexan/propan-2-ol 80/20 (v/v) a hexan/propan-2-ol/kyselina trifluoroctová (TFA) 80/20/0,5 (v/v/v) vybrané na základě úspěšných chirálních separací binaftolu a jeho derivátů na RN CF6 CSF. LFER pak sloužil pro objasnění interakcí, které se podílí na retenčním/separačním mechanismu. Ve všech separačních systémech dosahuje regresní koeficient *b* nejvyšší kladné hodnoty, tzn., že všechny tři CSF mají vyšší schopnost působit jako donor vodíku pro vodíkovou vazbu než MF. Okyselením mobilní fáze TFA se hodnoty koeficientu *b* sníží, tedy sníží se rozdíl v dané interakci mezi CSF a MF. V rámci jednotlivých CSF roste schopnost této interakce v následujícím pořadí: IP CF6 \leq RN CF6 < DMP CF7. Nejvyšší schopnost působit jako donor vodíku pro vodíkovou vazbu DMP CF7 CSF je dána vyšším počtem fruktofuranózových jednotek a tedy větším počtem derivatizačních skupin, které mohou působit jako donor vodíku. Disperzní interakce („hydrofobicita“) jsou preferovány ve všech systémech v MF, čemuž odpovídá záporná hodnota regresního koeficientu *v*, což je typické pro NP. Nejnižší absolutní hodnota tohoto koeficientu byla získána v systému s DMP CF7, což značí nejnižší polaritu ve srovnání s ostatními CSF. Okyselení mobilní fáze vede ke zvýšení její polarity a rozdíl v hydrofobicitě mezi fázemi se sníží, což se projeví nižší hodnotou koeficientu *v*. Toto platí pro CSF tvořené šesti fruktofuranózovými jednotkami. V případě DMP CF7 hodnota regresního koeficientu *v* mírně vzroste, což je možné vysvětlit sorpcí složek MF na povrch SF a tím zvýšení její polarity. DMP CF7 má největší povrch, tak

se pravděpodobně tento efekt významněji projeví pouze na této CSF. Dalším parametrem, který zvyšuje retenci analytů na všech třech CSF je dipolarita/polarizibilita popsaná regresním koeficientem s . Polarizibilita derivatizačních skupin stoupá v pořadí izopropyl < dimethylfenyl < naftylethyl. Hodnota regresního koeficientu s stoupá v tomto pořadí při použití MF bez TFA. V případě použití mobilní fáze s TFA hodnota regresního koeficientu s nejvíce vzroste v systému s DMP CF7, což lze opět vysvětlit největším povrchem stacionární fáze a sorpcí TFA na CSF. Opačný trend byl získán pro RN CF6 CSF. Možným vysvětlením je nízká sorpce TFA na CSF v důsledku přítomnosti objemných derivatizačních skupin. Regresní koeficienty a (schopnost působit jako akceptor vodíku) a e (popisuje interakce prostřednictvím n - a π -elektronových párů) jsou statisticky nevýznamné pro všechny studované separační systémy, tedy tyto typy interakcí jsou srovnatelné v mobilní a stacionární fázi a významně neovlivňují retenci.

Stejně typy interakcí, ale v rozdílném měřítku se uplatňují na všech třech studovaných CF CSF. Na základě LFER výsledků lze předpokládat, že chirální analyty by měly obsahovat polarizovatelné skupiny a skupiny působící jako akceptor vodíku blízko chirálního centra pro úspěšnou enantioseparaci na těchto CSF v NP HPLC. Separované analyty by též měly vykazovat nižší hydrofobicitu, aby byly dostatečně zadržovány na stacionární fázi.

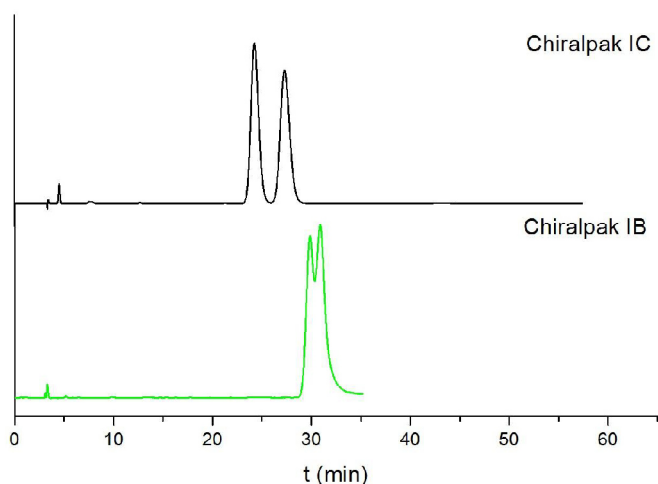
Jak již bylo zmíněno, polysacharidové CSF patří mezi nejčastěji používané fáze pro chirální separace v HPLC i SFC. Nativní polysacharidy vykazují poměrně nízkou enantioselektivitu. Proto se pro enantioseparace používají různé deriváty amylozy a celulózy. Derivatizace zvyšuje enantioselektivitu těchto selektorů, která závisí jednak na struktuře polymerního polysacharidového řetězce, tak i na druhu derivatizační skupiny [51]. Pro komerčně vyráběné polysacharidové CSF se používají dva typy kotvení chirálního selektoru (CS) na silikagelový nosič. Starším způsobem je tzv. pokrytí („coating“) silikagelového nosiče chirálním selektorem na základě fyzikálních interakcí. Takto připravená fáze může být použita buď v RP, nebo NP HPLC, nelze kombinovat módy na jedné koloně vzhledem k odlišnému vazebnému protokolu. Další nevýhodou je možnost použití pouze některých rozpouštědel jako složek MF. Rozpouštědla střední polarity, např. methyl *terc*-butyl ether, tetrahydrofuran, 1,4-dioxan nebo chlorovaná rozpouštědla mohou rozpouštět CS [52]. Novějším způsobem je příprava tzv. imobilizovaných CSF, kdy je CS navázán na silikagelový nosič kovalentní vazbou. Takto připravené polysacharidové fáze jsou multimodální, avšak byly používány zejména v NP HPLC, kde poskytovaly lepší výsledky. Pro separace enantiomerů z reálných vzorků, např. biologicky aktivních látek se však upřednostňuje RP z důvodu kompatibility s hmotnostní detekcí. Proto jsme se zaměřili na testování

enantioselektivního potenciálu čtyř imobilizovaných polysacharidových CSF právě v RP HPLC [V]. Byl testován vliv polysacharidového skeletu (amylóza *versus* celulóza) a derivatizačních skupin na enantioseparaci 30 strukturně odlišných enantiomerů, převážně chirálních léčiv za různých chromatografických podmínek. Testované kolony společně s chirálními selektory jsou uvedeny v Tabulce 1.

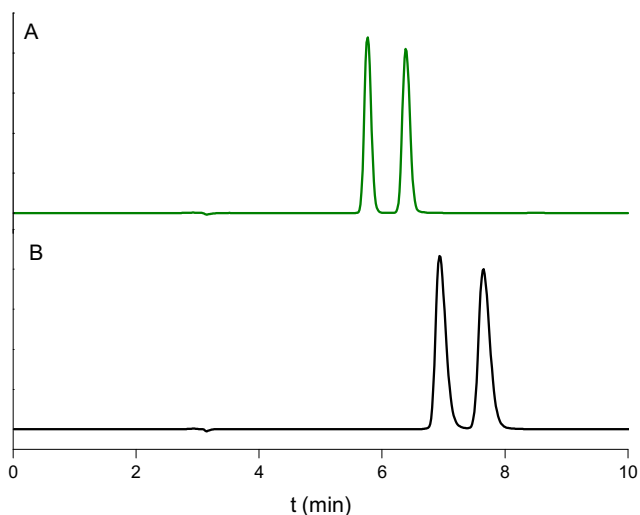
Tabulka 1: Testované polysacharidové kolony a jejich chirální selektory

Kolona	Chirální selektor
CHIRALPAK IA	<i>tris</i> (3,5-dimethylfenylkarbamát) amylózy
CHIRALPAK IB	<i>tris</i> (3,5-dimethylfenylkarbamát) celulózy
CHIRALPAK IC	<i>tris</i> (3,5-dichlorofenylkarbamát) celulózy
CHIRALPAK ID	<i>tris</i> (3-chlorofenylkarbamát) amylózy

Pro úspěšné chirální separace na těchto CSF je nutné, aby enantiomery byly nenabitě, protože tyto CS jsou neutrální a neposkytují iontové interakce [53]. Ionizace analytů tedy negativně ovlivňuje enantioseparace na těchto CSF. Proto byly použity různé složky MF o různém pH v závislosti na testovaných analytech (roztok kyseliny mravenčí, pH 2,1 pro kyselé analyty, 10mM octan amonný, pH 8,8 pro bazické analyty). Pro enantioseparace bazických analytů byl také testován přídavek chaotropní soli (100mM KPF₆) do MF, která tvoří iontový pár s danou bází, což vede k tomu, že molekula je navenek neutrální. Testované CSF vykazují komplementární enantioselektivitu, což je dáno především různou strukturou polysacharidového skeletu. Nicméně komplementární enantioselektivita byla zjištěna i v rámci CSF se stejným polysacharidovým skeletem lišícím se derivatizačními skupinami - viz Obr. 3. CSF na bázi derivatizované celulózy (CHIRALPAK IB kolona) je nejvhodnější pro enantioseparace bazických analytů, které obsahují sekundární amino skupinu, konkrétně léčiv ze skupiny β -blokátorů. Pro deriváty amfetaminu (analyty obsahující primární aminoskupinu) vykazuje nejvyšší enantioselektivitu CSF na bázi derivatizované amylózy, konkrétně kolona CHIRALPAK ID. CSF na bázi derivatizované amylózy (kolony CHIRALPAK IA a ID) obsahující dané strukturní prvky vhodné k interakci jsou nejvhodnější volbou pro enantioseparace analytů kyselé povahy (léčiva ze skupiny nesteroidních antiflogistik) a thiazidová diuretika. Ukázka enantioseparace analytů ze skupiny profenů na koloně CHIRALPAK IA je znázorněna na Obr. 4. Výsledky této práce mohou sloužit jako návod pro výběr vhodných RP HPLC podmínek pro enantioseparace celé škály strukturně odlišných analytů na imobilizovaných polysacharidových CSF.



Obr. 3: Chromatogramy enantioseparace bendroflumethiazidu. MF ACN/100mM KPF6 25/75 (v/v) pro kolonu Chiralpak IC, ACN/100mM KPF6 30/70 (v/v) pro kolonu Chiralpak IB.



Obr. 4: Chromatogramy enantioseparace flurbiprofenu (A) a karprofenu (B) na koloně CHIRALPAK IA. MF ACN/ roztok kyseliny mravenčí, pH 2,1 60/40 (v/v).

Protože imobilizované polysacharidové CSF jsou multimodální, v další práci jsme se zaměřili na zjištění a porovnání enantioselektivního potenciálu dvou kolon z této skupiny, CHIRALPAK IA a CHIRALPAK IB, v NP a RP HPLC [VI]. Tyto CSF obsahují stejnou derivatizační skupinu, *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát), ale liší se typem polysacharidového skeletu - amylóza *versus* celulóza. Mechanismus separace, tj. interakce, které se podílí na retenci a enantioseparaci, je odlišný pro oba testované módy. Set testovacích chirálních analytů obsahoval 31 strukturně odlišných léčiv. MF o různém složení, tj. hexan/propan-2-ol s přísady TFA nebo triethylaminu (TEA) v NP a ACN nebo methanol (MeOH)/vodná složka

(kyselina mravenčí, pH 2,1, 10mM octan amonný, pH 8,8 nebo 100mM KPF₆) v RP byly zvoleny na základě struktury testovaných analytů. Obecně lze říci, že NP je vhodnější pro separaci většiny testovaných léčiv bez ohledu na typ polysacharidové CSF. Nicméně, pro některé analyty (ibuprofen, butizid, 4-F-amfetamin) bylo dosaženo enantioseparace na koloně CHIRALPAK IA pouze v RP. Pro oba separační módy platí, že CSF na bázi derivatizované celulózy je vhodnější pro enantioseparace bazických léčiv, zatímco CSF na bázi derivatizované amylozy vykazuje vyšší enantioselektivitu pro kyselé analyty ze skupiny profenů. Na základě získaných výsledků byla na těchto CSF prokázána komplementární enantioselektivita. Výběr těchto dvou CSF s vhodnou optimalizací složení mobilní fáze v RP a NP poskytuje potřebnou enantioselektivitu pro celou škálu strukturně odlišných chirálních léčiv.

V rámci podrobné charakterizace polysacharidových CSF jsme se zaměřili také na zjištění a porovnání enantioselektivitu a interakčních možností v RP HPLC dvou CSF obsahujících shodný CS (*tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylozy), ale lišících se vazbou CS na silikagelový nosič [VII]. Kolona CHIRALPAK AD-RH obsahuje silikagel pokrytý CS pomocí fyzikálních interakcí („coated“), zatímco kolona CHIRALPAK IA má CS imobilizovaný na silikagel kovalentními vazbami. Sada 37 strukturně odlišných chirálních analytů, model LFER a testování iontových interakcí sadou silných nechirálních kyselin a bází byly použity pro charakterizaci rozdílů mezi těmito dvěma fázemi. MF obsahovaly ACN a vodnou složku: kyselinu mravenčí, pH 2,1 nebo 10mM octan amonný, pH 8,8 podle struktury separovaných enantiomerů. Ačkoliv obě CSF obsahují stejný CS, byly zjištěny velké rozdíly v enantioselektivním a retenčním chování. Mnohem vyšší retenci bazických analytů vykazovala kolona CHIRALPAK IA, zatímco vyšší enantioselektivitu pro tyto látky poskytovala kolona CHIRALPAK AD-RH. Vyšší retence bazických látek na imobilizované koloně vysvětluje porovnání iontových interakcí a LFER výsledků. Příspěvek iontových interakcí byl silnější na této koloně, čemuž odpovídá i nižší záporná hodnota regresního koeficientu *b*. Iontové interakce se uplatňují mezi bazickými analyty a volnými silanolovými skupinami, které zvyšují retenci, ale nemají vliv na chirální rozpoznávání. Pro enantioseparace kyselých analytů nebyl zjištěn tak velký rozdíl mezi kolonami jako pro bazické analyty. Enantioselektivní potenciál obou kolon je srovnatelný, přičemž pro enantioseparace profenů a blokových aminokyselin *tert*-butyloxykarbonylovou skupinou je vhodnější CHIRALPAK AD-RH kolona, zatímco pro aminokyseliny blokové benzyloxykarbonylovou skupinou kolona CHIRALPAK IA. Model LFER byl využit pro zjištění interakcí, které se uplatňují v retenčním mechanismu na těchto CSF. MF byly tvořeny

stejnými složkami jako pro chirální separace. Regresní koeficient v dosahoval nejvyšších kladných hodnot ze všech koeficientů na obou CSF v obou MF, přičemž vyšší hodnota byla získána pro systém s pokrytou CSF. Stejný trend vykazuje i regresní koeficient e . Záporné hodnoty ostatních regresních koeficientů: s , a , b ukazují, že interakce popsané těmito koeficienty jsou preferovány v MF. Vyšší absolutní hodnoty regresních koeficientů s výjimkou koeficientu s v bazické MF byly získány v systému s kolonou CHIRAKPAK AD-RH, což značí, že tato kolona může ovlivňovat retenci analytů těmito interakcemi v menší míře než imobilizovaná kolona. Lze shrnout, že způsob vazby polysacharidového CS na silikagelový nosič významně ovlivňuje nejen retenci, ale i enantioselektivní potenciál v RP HPLC.

2.1.2.2 SFC

Princip a základní mechanismus, který se uplatňuje při separacích v SFC společně s přehledem chirálních stacionárních fází a jejich aplikací v SFC jsme podrobně zpracovali v publikaci [VIII]. Literární rešerše zahrnuje období 2000-2013.

Jak již bylo zmíněno, většina kolon pro HPLC je vhodná i pro měření v SFC. V rámci dalších projektů jsme se zaměřili na charakterizaci CSF na bázi cyklofruktanu a derivatizovaných polysacharidů v SFC.

Model LFER byl použit pro zjištění interakcí, které se uplatňují v mechanismu separace v SFC systému s CSF obsahující chirální selektor dimethylfenyl cyklofruktan 7 [IX]. SFC separační systémy byly následně porovnány s analogickými systémy NP HPLC [IV] z hlediska poskytovaných interakcí a enantioselektivity pro strukturně odlišné chirální analyty. Mobilní fáze pro srovnávané systémy byly tvořeny CO₂/propan-2-ol/TFA 80/20/0 a 80/20/0,5 (v/v/v) pro SFC, v NP HPLC byl místo CO₂ použit jako hlavní složka MF n-hexan. Hlavním rozdílem pro oba separační systémy ve všech MF jsou interakce prostřednictvím n - a π -elektronových párů (regresní koeficient e), které se významně uplatňují pouze v SFC systému. V HPLC systému je tento koeficient statisticky nevýznamný, tudíž je zde tento typ interakcí srovnatelný v MF a CSF. Pozorovaný rozdíl je možné vysvětlit reakcí CO₂ s volnými hydroxylovými skupinami CS za vzniku karboxylové skupiny [54, 55] a/nebo také adsorpcí organického modifikátoru na CSF. Dalším významným rozdílem mezi srovnávanými SFC a HPLC systémy je vliv přídavku TFA do MF na hodnotu regresního koeficientu s (dipolarita/polarizibilita). Zatímco v HPLC systému hodnota koeficientu s významně vzroste po přídavku TFA do MF, v SFC je vliv TFA zanedbatelný (malý pokles hodnoty koeficientu

v rámci konfidenčního intervalu). Pokud srovnáme jednotlivé systémy, tento typ interakcí se silněji uplatňuje v HPLC (vyšší kladná hodnota koeficientu s). Schopnost fází působit jako donor vodíku pro tvorbu vodíkové vazby se uplatňuje ve všech testovaných systémech. Regresní koeficient b dosahuje u všech systémů nejvyšší kladné hodnoty ze všech koeficientů LFER rovnice. Vyšší hodnoty byly získány pro HPLC systémy. Přídavek TFA do MF pouze nepatrně sníží hodnoty b koeficientů v obou systémech. Regresní koeficient a je statisticky nevýznamný pro všechny testované systémy. Disperzní interakce (regresní koeficient v) jsou preferovány pro všechny systémy v MF, což je typické pro NP HPLC i SFC s polární SF. V literatuře bylo popsáno, že v SFC systémech dochází k vyšší adsorpci složek mobilní fáze na stacionární fázi pokud MF obsahuje malé množství organického modifikátoru [56, 57]. Proto byl v SFC dále studován vliv MF CO₂/MeOH/TFA 95/5/0 a 95/5/0,1 (v/v/v) na regresní koeficienty LFER rovnice. Jako organický modifikátor byl vybrán MeOH, protože v těchto MF byly dosaženy nejlepší výsledky chirálních separací pro deriváty binaftolu. Při použití těchto MF se na retenčním mechanismu uplatňují všechny interakce základního LFER modelu. Nicméně regresní koeficienty v v obou MF a s v MF s TFA významněji přispívají k chybě modelu, což vyplývá z vyšších p hodnot.

Na základě výsledků LFER a chirálních separací bylo zjištěno, že amino skupina přítomná v molekule analytu se významně podílí na retenčním a separačním mechanismu na DMP CF7 CSF. Pokud je tato skupina v blízkosti chirálního centra nebo osy chiraloty, vykazuje enantiodiskriminační charakter. Amino skupiny vzdálené od prvku chiraloty mají vliv zejména na retenci. Adsorpce složek MF na CSF se významněji uplatňuje v SFC než HPLC. Bylo ověřeno, že čím nižší je množství organického modifikátoru v MF, tím více dochází k adsorpci na CSF, což ovlivňuje poskytované interakce a mechanismus separace v SFC separačním systému a je ve shodě s publikovanými výsledky jiných autorů.

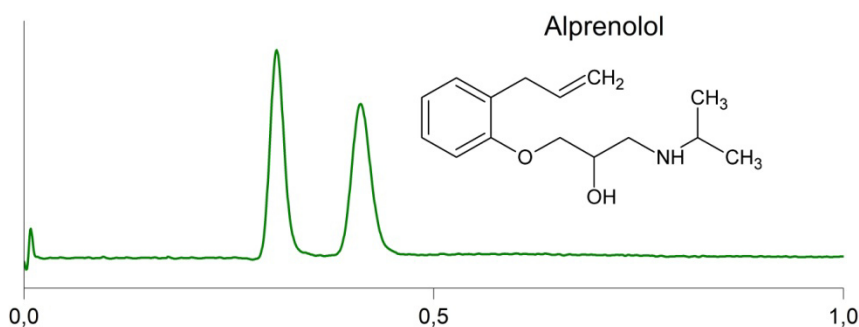
Efektivní separace bazických látek nejen v SFC bývá obtížná z důvodu sekundárních interakcí analytů s volnými silanolovými skupinami silikagelového nosiče. Enantioseparace bazických látek v SFC často vykazuje nízkou enantioselektivitu a nesymetrické píky. V další práci jsme se proto zaměřili na vývoj a optimalizaci SFC separačních podmínek pro enantioseparace 27 strukturně odlišných biologicky aktivních bazických látek na CSF na bázi derivatizované amylozy, konkrétně (*tris*(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylozy) [X]. Tři strukturně odlišné skupiny chirálních bází, tj. deriváty amfetaminu a katinonu, deriváty benzofuranu a syntetické analogy aminonaftolu, tzv. Betti báze byly vybrány pro tyto účely. V rámci vývoje metod byl testován vliv složení MF (typ a množství organického modifikátoru (methanol, propan-2-ol nebo jejich směsi), přídavek kyselých a/nebo bazických

aditiv (TFA, izopropylamin, diethylamin, triethylamin)), teploty a zpětného tlaku na enantiosektivitu a rozlišení enantiomerů. Výsledky ukázaly, že přídavek aditiva do MF pozitivně ovlivňuje enantiosektivitu a tvar píků bazických analytů. Primární amin, izopropylamin, se ukázal být nejvhodnějším bazickým aditivem oproti diethylaminu (sekundární amin) a triethylaminu (terciární amin). Toto aditivum je použito v optimalizovaných separačních podmínkách (MF CO₂/propan-2-ol/MeOH/izopropylamin (v/v/v/v), teplota 35°C, zpětný tlak 138 bar) pro enantioseparace derivátů benzofuranu a Betti bázi, které byly separovány do pěti respektive sedmi minut na základní linii. Pro deriváty amfetaminu a kathionu byly nejlepší hodnoty rozlišení enantiomerů získány při použití kombinace kyselého (TFA) a bazického (izopropylamin) aditiva v objemovém poměru 1:1. MF byly složené z CO₂/propan-2-ol/TFA/izopropylamin (v/v/v/v). Při počátečním nastavení teploty (35°C) a zpětného tlaku (138 bar) byly separovány všechny deriváty amfetaminu a kathionu na základní linii s výjimkou 3,4-dimethylmetkathionu. Následná optimalizace těchto podmínek, tj. zvýšení teploty na 40°C a zpětného tlaku na 150 bar vedla k enantioseparaci tohoto derivátu na základní linii. Pro všechny separované enantiomery byly získány relativně symetrické píky a krátká doba analýzy při použití amyložové kolony o rozměrech 150 × 3mm, velikost částic 3 μm.

Tato práce poskytuje návod pro vývoj a optimalizaci SFC podmínek pro chirální separace širokého spektra bazických látek.

Za podmínek SFC byl také studován a porovnán enantioselektivní potenciál *tris*(3,5-dimethylfenylkarbamátu) amyložy a celulózy. Cílem bylo ukázat vliv polysacharidového skeletu na enantiosektivitu v SFC [XI]. Pro tuto práci byly použity krátké kolony (ACQUITY UPC² Trefoil CEL1 a ACQUITY UPC² Trefoil AMY1), tj. 50 × 3mm, velikost částic 2,5 μm umožňující rychlé separace. 52 strukturně odlišných biologicky aktivních chirálních látek (kyselé, bazické, bifunkční a neutrální) bylo použito jako analyty. Teplota a zpětný tlak byly pro všechna měření konstantní, aby enantioselektivita byla ovlivněna pouze typem CSF a složením MF. Mobilní fáze byly tvořeny CO₂, alkoholovým modifikátorem (methanol nebo propan-2-ol) a aditivem – kyselým (TFA), bazickým (izopropylamin) nebo kombinací obou. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na celulózové CSF při použití MF tvořených CO₂, propan-2-olem a směsným aditivem (TFA + izopropylamin). Oproti tomu, pro enantioseparace na amyložové CSF se nejlépe osvědčily MF tvořené CO₂, methanolem a bazickým aditivem (izopropylamin). Komplementární enantioselektivita z důvodu různé struktury polysacharidového skeletu umožnila separaci na základní linii většiny testovaných biologicky aktivních chirálních látek. Obecně vyšší enantiosektivitu vykazovala CSF na

bázi derivatizované amylozy (76,9% separací na základní linii). CSF na bázi derivatizované celulózy poskytla 51,9% separací na základní linii. Nicméně pro některé sloučeniny (např. indoprofen, analyty ze skupiny β -blokátorů) je CSF na bázi derivatizované celulózy lepší nebo jedinou volbou pro rychlou separaci na základní linii. Ukázka rychlé enantioseparace β -blokátoru alprenololu na koloně ACQUITY UPC² Trefoil CEL1 je znázorněna na Obr. 5.



Obr. 5: Chromatogram enantioseparace alprenololu. Kolona ACQUITY UPC² Trefoil CEL1, MF CO₂/MeOH/izopropylamin 90/10/0.1 (v/v/v). průtok 2,5 ml/min, teplota 35°C, zpětný tlak 138 bar.

Kombinace těchto dvou chirálních stacionárních fází v SFC nabízí rychlé a účinné separace celé škály strukturně odlišných enantiomerů.

3. Závěr

Vybrané publikace zahrnuté v této práci představují určitý příspěvek k objasnění mechanismu separace v různých módech vysokoúčinné kapalinové chromatografie a superkritické fluidní chromatografie. Studium chromatografického chování strukturně odlišných látek v různých separačních systémech vedlo k vytvoření některých zevšeobecňujících závěrů.

K popisu mechanismu separace v HILIC systémech byly použity různé přístupy, tj. závislosti popisující adsorpci analytu na povrch stacionární fáze a rozdělování analytu mezi vodnou vrstvu částečně sorbovanou na povrch stacionární fáze a mobilní fázi, model lineárních vztahů volných energií, který umožňuje charakterizovat interakce, které se uplatňují na mechanismu separace jak z kvalitativního, tak kvantitativního hlediska, popis iontových interakcí a selektivity pro různé funkční skupiny ve struktuře analytů. Pro nové modifikátory stacionární fáze na bázi cyklofruktanu bylo zjištěno, že modifikace silikagelového nosiče přináší nové interakční možnosti, což vede k efektivnější separaci polárních látek. Na základě podrobného porovnání chromatografických vlastností dvou kolon se stejným ligandem, tj. amidových SF, je možné říci, že tyto fáze vykazují podobné, ale nikoliv stejné fyzikálně-chemické interakce a selektivity. Tento závěr lze zobecnit i pro ostatní fáze se stejným ligandem, které nemají shodný postup přípravy.

Interakce, které se podílí na mechanismu separace v systémech s cyklofruktanovými chirálními stacionárními fázemi v NP HPLC a SFC byly identifikovány semiempirickým modelem LFER. Ze změn hodnot regresních koeficientů bylo zjištěno, že sorpce složek mobilní fáze na stacionární fázi se významněji uplatňuje v SFC v porovnání s NP HPLC. Kromě popisu retenčního/separačního mechanismu byly na těchto CSF optimalizovány podmínky pro enantioseparace řady látek, zejména chirálních katalyzátorů a léčiv.

Byl testován vliv typu polysacharidového skeletu, derivatizačních skupin a vazby selektoru na nosič na enantioselektivitu polysacharidových CSF v HPLC. V rámci testování byla zjištěna komplementární enantioselektivita daná strukturou polysacharidového skeletu, derivatizační skupinou i použitým chromatografickým módem. Byly navrženy separační podmínky, tj. konkrétní polysacharidová CSF a složení MF pro celou škálu strukturně odlišných chirálních analytů pro praktické využití.

Enantioselektivní potenciál moderních polysacharidových kolon byl studován a porovnán za podmínek SFC. Byly navrženy vhodné složky MF, tj. organický modifikátor a

aditivum pro rychlé a efektivní analýzy různých skupin biologicky aktivních látek na konkrétní polysacharidové CSF.

I přes rozsáhlý vývoj teoretických i praktických poznatků a zájem vědců o tuto problematiku, často neexistuje univerzální postup pro optimalizaci chromatografických separačních podmínek, zejména pro komplexní směsi a rozlišení enantiomerů. Tento fakt ukazuje směr pro další výzkumy na teoretické i praktické úrovni.

4. Seznam literatury

- [1] Scriba, G. K. E., *J. Chromatogr. A* 2016, *1467*, 56-78.
- [2] Snyder, L. R., Poppe, H., *J. Chromatogr.* 1980, *184*, 363-413.
- [3] Hemstrom, P., Irgum, K., *J. Sep. Sci.* 2006, *29*, 1784-1821.
- [4] Schoenmakers, P. J., Billiet, A. H., De Galan, L., *J. Chromatogr.* 1979, *185*, 179-195.
- [5] Alpert, A. J., *J. Chromatogr.* 1990, *499*, 177-196.
- [6] Jandera, P., Janás, P., *Anal. Chim. Acta* 2017, *967*, 12-32.
- [7] Soukup, J., Jandera, P., *J. Chromatogr. A* 2014, *1374*, 102-111.
- [8] Borges, E. M., *J. Chromatogr. Sci.* 2015, *53*, 580-597.
- [9] Kalíková, K., Kozlík, P., Gilar, M., Tesařová, E., *J. Sep. Sci.* 2013, *36*, 2421-2429.
- [10] Buszewski, B., Noga, S., *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, *402*, 231-247.
- [11] Qiao, L., Shi, X., Xu, G., *Trends Anal. Chem.* 2016, *81*, 23-33.
- [12] Kozlík, P., Šimová, V., Kalíková, K., Bosáková, Z., Armstrong, D. W., Tesařová, E., *J. Chromatogr. A* 2012, *1257*, 58-65.
- [13] Schuster, G., Lindner W., *J. Chromatogr. A* 2013, *1273*, 73-94.
- [14] McCalley, D. V. *J. Chromatogr. A* 2017, *1483*, 71-79.
- [15] West, C., Auroux, E., *J. Chromatogr. A* 2016, *1461*, 92-97.
- [16] Bartó, E., Felinger, A., Jandera P., *J. Chromatogr. A* 2017, *1489*, 143-148.
- [17] Heaton, J. C., Russell, J. J., Underwood, T., Boughtflower, R., McCalley, D. V., *J. Chromatogr. A* 2014, *1347*, 39-48.
- [18] Sýkora, D., Vozka, J., Tesařová, E., *J. Sep. Sci.* 2016, *39*, 115-131.
- [19] Poole C. F., Poole S. K., *J. Chromatogr. A* 2002, *965*, 263-299.
- [20] Poole C. F., Lenca, N., *J. Chromatogr. A* 2017, *1486*, 2-19.
- [21] Nováková, L., Grand-Guillaume Perrenoud, A., Francois, I., West, C., Lesellier, E., Guillaume, D., *Anal. Chim. Acta* 2014, *824*, 18-35.
- [22] Kalíková, K., Šlechtová, T., Vozka, J., Tesařová, E., *Anal. Chim. Acta* 2014, *821*, 1-33.
- [23] Tarafder, A., Kaczmariski, K., Ranger, M., Poe, D. P., Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 2012, *1238*, 132-145.
- [24] Khater, S., West, C., *J. Chromatogr. A* 2014, *1373*, 197-210.
- [25] Geryk, R., Kalíková, K., Schmid, M. G., Tesařová E., *Anal. Chim. Acta* 2016, *932*, 98-105.
- [26] Wang, C., Zhang, Y., *J. Chromatogr. A* 2013, *1281*, 127-134.
- [27] Gritti, F., Fogwill, M., Gilar, M., Jarrell, J. A., *J. Chromatogr. A* 2016, *1468*, 217-227.

- [28] West, C., Lemasson, E., Bertin, S., Hennig, P., Lesellier, E., *J. Chromatogr. A* 2016, 1440, 212-228.
- [29] Andri, B., Dispas, A., Marini, R. D., Hubert, P., Sassi, P., Al Bakain, R., Thiébaud, D., Vial J., *J. Chromatogr. A* 2017, 1491, 182-194.
- [30] Vozka, J., Kalíková, K., Roussel, C., Armstrong, D. W., Tesařová E., *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 1711-1719.
- [31] Sýkora, D., Vozka, J., Tesařová, E., *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 115-131.
- [32] Lammerhofer, M., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 814-856.
- [33] Abraham, M. H., Whiting, G. S., Doherty, R. M., Shuely, W. J., *J. Chromatogr.* 1991, 587, 213-228.
- [34] Abraham, M. H., *Chem. Soc. Rev.* 1993, 22, 73-83.
- [35] Abraham, M. H., Ibrahim, A., Zissimos, A. M., *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 29-47.
- [36] Vitha, M. F., Carr, P. W., *J. Chromatogr. A* 2006, 1126, 143-194.
- [37] Poole, C. F., Atapattu, S. N., Poole, S. K., Bell, A. N., *Anal. Chim. Acta* 2009, 652, 32-53.
- [38] Vonk, E. C., Lewandowska, K., Claessens, H. A., Kaliszan, R., Cramers, C. A., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 777-792.
- [39] Fields, P. R., Sun, Y., Stalcup, A. M., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 467-475.
- [40] Chirita, R.-I., West, C., Zubrzycki, S., Finaru, A., L., Elfakir, C., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 5939-5963.
- [41] Schuster, G., Lindner, W., *J. Chromatogr. A* 2013, 1301, 90-110.
- [42] West, C., Zhang, Y., Morin-Allory, L., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 2019-2032.
- [43] West, C., Guenegou, G., Zhang, Y., Morin-Allory, L., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 2033-2057.
- [44] Khater, S., West, C., *J. Chromatogr. A* 2014, 1373, 197-210.
- [45] Nováková, L., Havlíková, L., Vlčková, H., *Trends Anal. Chem.* 2014, 63, 55-64.
- [46] Immel, S., Schmitt, G. E., Lichtenthaler, F. W., *Carbohydr. Res.* 1998, 313, 91-105.
- [47] Sun, P., Wang, C., Breitbach, Z. S., Zhang, Y., Armstrong, D. W., *Anal. Chem.* 2009, 81, 10215-10226.
- [48] Jensen, D. S., Teutenberg, T., Clark, J., Linford, M. R., *LCGC North. Am.* 2012, 30, 1052-1057.
- [49] Kawachi, Y., Ikegami, T., Tabuko, H., Ikegami, Y., Miyamoto, M., Tanaka, N., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 5903-5919.
- [50] Kalíková, K., Šlechtová T., Tesařová, E., *Curr. Med. Chem.* 2017, 24, 829-848.

- [51] Chankvetadze, B., *J. Chromatogr. A* 2012, *1269*, 26-51.
- [52] Zhang, T., Kientzy, C., Franco, P., Ohnishi, A., Kagamihara, Y., Kurosawa, H., *J. Chromatogr. A* 2005, *1075*, 65-75.
- [53] Zhang, T., Nguyen, D., Franco, P., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 1048-1055.
- [54] Pell, R., Lindner, W., *J. Chromatogr. A* 2012, *1245*, 175-182.
- [55] Mitchell, C. R., Benz, N. J., Zhang, S., *J. Chromatogr. B* 2008, *875*, 65–71.
- [56] Lesellier, E., *J. Sep. Sci.* 2008, *31*, 1238–1251.
- [57] Lesellier, E., *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 1881–1890.

5. Publikace přiložené k této práci

- [I] Kozlík, P., Šimová, V., **Kalíková, K.***, Bosáková, Z., Armstrong, D. W., Tesařová, E. Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases. *Journal of Chromatography A* 2012, 1257, 58-65.
- [II] **Kalíková, K.**, Kozlík, P., Gilar, M., Tesařová, E. Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns. *Journal of Separation Science* 2013, 36, 2421-2429.
- [III] **Kalíková, K.**, Janečková, L., Armstrong, D. W., Tesařová E. Characterization of new R-naphthylethyl cyclofructan 6 chiral stationary phase and its comparison with R-naphthylethyl beta-cyclodextrin-based column. *Journal of Chromatography A* 2011, 1218, 1393-1398.
- [IV] Janečková, L., **Kalíková, K.**, Vozka, J., Armstrong, D. W., Bosáková, Z., Tesařová E. Characterization of cyclofructan-based chiral stationary phases by linear free energy relationship. *Journal of Separation Science* 2011, 34, 2639-2644.
- [V] Geryk, R., **Kalíková, K.***, Vozka, J., Plecítá, D., Schmid, M. G., Tesařová, E. Enantioselective potential of chiral stationary phases based on immobilized polysaccharides in reversed phase mode. *Journal of Chromatography A* 2014, 1363, 155-161.
- [VI] Geryk, R., **Kalíková, K.***, Vozka, J., Tesařová, E. Immobilized polysaccharide-based stationary phases for enantioseparation in normal versus reversed phase HPLC. *Chromatographia* 2015, 78, 909-915.
- [VII] **Kalíková, K.**, Geryk, R., Vozka, J., Tesařová, E. Evaluation of differences between Chiralpak IA and Chiralpak AD-RH amylose-based chiral stationary phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 2015, 38, 711-719.
- [VIII] **Kalíková, K.**, Šlechtová, T., Vozka, J., Tesařová, E. Supercritical fluid chromatography as a tool for enantioselective separation; A review. *Analytica Chimica Acta* 2014, 821, 1-33.
- [IX] Vozka, J., **Kalíková, K.**, Roussel, C., Armstrong, D. W., Tesařová, E. An insight into the use of dimethylphenyl carbamate cyclofructan 7 chiral stationary phase in supercritical fluid chromatography: The basic comparison with HPLC. *Journal of Separation Science* 2013, 36, 1711-1719.
- [X] Geryk, R., **Kalíková, K.***, Schmid, M. G., Tesařová, E. Enantioselective separation of biologically active basic compounds in ultra-performance supercritical fluid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2016, 932, 98-105.

[XI] Kučerová, G., **Kalíková, K.***, Tesařová, E. Enantioselective potential of polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography. *Chirality* 2017, 29, 239-246.