

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studium chiralitity s využitím výpočetní chemie a chromatografického
experimentu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Lucie Žampachová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Konzultant práce:

RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.

Olomouc 2019

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Lucie Žampachová
Název práce: Studium chiralidy s využitím výpočetní chemie
a chromatografického experimentu
Typ práce: diplomová
Pracoviště: Katedra analytické chemie
Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
Rok odevzdání práce: 2019
Anotace:

Cílem této práce bylo studium a zhodnocení chiralidy, resp. optické otáčivosti, felodipinu a kyseliny fenylmléčné. Vlastnosti těchto dvou sloučenin byly sledovány v sedmi rozpouštědlech experimentálně s využitím detektoru optické otáčivosti s průtočnou celou a v pěti z nich pomocí výpočetní chemie za použití teorie funkcionálu hustoty (DFT) s funkcionálem B3LYP, bázovým setem 6-31G* a aug-cc-pVDZ. Rozpouštědla byla modelována implicitně modelem polarizovaného kontinua (PCM). Pro obě dvě studované látky byla vyhodnocena vhodná rozpouštědla a zároveň byly popsány a diskutovány podmínky sledování optické aktivity výpočetní chemií.

Klíčová slova: felodipin, kyselina fenylmléčná, optická otáčivost, chiralita, HPLC, výpočetní chemie, DFT
Počet stran: 90
Počet příloh: 7
Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Lucie Žampachová
Title: Study of chirality using computational chemistry and chromatographic experiment
Type of thesis: Master's
Department: Department of Analytical Chemistry
Supervisor: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.
Consultant: RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
The year of submission: 2019
Annotation:

This master thesis deals with chirality of felodipine and phenyllactic acid. Their properties were studied experimentally using optical rotation detector with flow cell in seven solvents. On five of them Density Functional Theory (DFT) method was applied using B3LYP functional with 6-31G* and aug-cc-pVDZ basis sets. Solvents were implicitly performed using Polarizable Continuum Model (PCM). The most suitable solvents and requirements for optical rotation were determined for both analytes. Suitable solvents for optical rotation detection of both compounds were selected. Conditions for study of optical activity by computational chemistry were described and discussed.

Keywords: felodipine, phenyllactic acid, optical rotation, chirality, HPLC, computational chemistry, DFT
Number of pages: 90
Number of appendices: 7
Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré použité prameny a informace, které jsem ve své práci zmínila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

Podpis

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování této práce. Vřelé díky patří RNDr. Ondřeji Kurkovi, Ph.D. za pomoc s výpočty, trpělivý přístup, důležité informace, podporu i čas, který mi při řešení problémů věnoval. Chtěla bych poděkovat také spolužákům a celému kolektivu Katedry analytické chemie PřF UP za přívětivý přístup a pomoci, které se mi dostalo během celé doby studia. V neposlední řadě děkuji svému bratru Michalovi a rodičům, bez kterých by tato práce vůbec nevznikla.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1. Chiralita.....	2
2.1.2. Metody určování absolutní konfigurace	4
2.1.3. Principy separace enantiomerů	5
2.2. Výpočetní chemie.....	8
2.2.1. Využití výpočetní chemie ve studiu chiralitý	12
2.2.2. Zjišťování základní struktury molekul.....	13
2.3. Chromatografické metody.....	15
2.3.1. Využití HPLC pro separace diastereomerů a enantiomerů.....	16
2.3.2. Chirální stacionární fáze (CSP)	17
2.3.3. Polysacharidové stacionární fáze.....	22
2.4. Blokátory kalciových kanálů (BKK)	23
2.4.1. Felodipin	27
2.4.2. Využití kapalinové chromatografie pro achirální separace felodipinu	29
2.4.3. Využití kapalinové chromatografie pro chirální separace felodipinu.....	30
2.5. Fenylmléčná kyselina.....	31
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1. Instrumentální vybavení.....	33
3.2. Použité chemikálie	33
3.3. Chromatografické analýzy	33
3.4. Měření optické otáčivosti.....	34
3.5. Kvantově-chemické výpočty.....	35
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	36
4.1. Měření optické otáčivosti enantiomerů kyseliny fenylmléčné.....	36
4.2. Separace racemátu felodipinu	43
4.3. Měření optické otáčivosti enantiomerů felodipinu	44
4.4. Výpočetní chemie jako nástroj pro určování optické otáčivosti	52
4.4.1. Postup zpracování dat pomocí skriptů	52
4.4.2. Optimalizace geometrie a výpočet optické otáčivosti kyseliny fenylmléčné	53
4.4.3. Optimalizace geometrie a výpočet optické otáčivosti R-(+)-felodipinu.....	56
5. ZÁVĚR	60

6. LITERATURA	62
7. PŘÍLOHY	69
7.1. Závislost plochy signálu na koncentraci kyseliny fenylmléčné	69
7.2. Závislost plochy signálu na koncentraci felodipinu	76
7.3. Kolísání blanku v čase u kyseliny fenylmléčné	80
7.4. Kolísání blanku v čase u felodipinu	82
7.5. Konformery kyseliny fenylmléčné (Gibbsova energie a optická otáčivost)	83
7.6. Konformery R-felodipinu (Gibbsova energie a optická otáčivost)	88
7.7. Seznam skriptů	90

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
AGP	α_1 -kyselý glykoprotein
AM1	Austin Model 1
B3LYP	hybridní Beckeho, tříparametrický, Lee-Yang-Pareho funkcionál
BKK	blokátory kalciových kanálů
BOA	Born-Oppenheimerova aproximace
BSA	hovězí sérový albumin
CD	cirkulární dichroismus
CIP	Cahn-Ingold-Prelogova projekce
COSMO	model solvatace pracující s elektrostatickými interakcemi
CSP	chirální stacionární fáze
CYP3A4	cytochrom P450 3A4
D(+)-PLA	D-(+)-3-fenylmléčná kyselina
DEA	diethylamin
DFT	teorie funkcionálu hustoty
DHP	dihydropyridin
EtOH	ethanol
FELO1	R-enantiomer felodipinu vycházející z kolony po separaci jako první
FELO2	S-enantiomer felodipinu vycházející z kolony po separaci jako druhý
FIA	flow-injection mód
GC	plynová chromatografie
GGA	aproximace zobecněného gradientu
GTO	Gaussova funkce (orbitalu)
HF	Hartree-Fockova metoda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSA	lidský sérový albumin
i-PrOH	isopropanol
L(-)-PLA	L-(-)-3-fenylmléčná kyselina
LDA	aproximace lokální hustoty
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
n-PrOH	n-propanol

NMR	nukleární magnetická rezonance
NP	normální fáze
PCM	model polarizovaného kontinua
PLA	fenylmléčná kyselina
RP	reverzní fáze
STO	Slaterův orbital

1. ÚVOD

Chiralita představuje základní vlastnost biologických systémů a ovlivňuje efektivitu léků. Více než polovina dnes dostupných léčiv uváděná na trh je ve formě racemické směsi. Je známo, že interakce léčiv s receptory či enzymy závisí na stereoselektivitě. Dva enantiomery jedné látky často působí v organismu různě a mohou vykazovat rozdílné farmakodynamické a farmakokinetické vlastnosti. Vlastnosti enantiomerů se odvíjí od afinity k receptorovým místům jejich aktivitě v cílové tkáni. Farmakologický účinek může tedy spočívat pouze na jednom enantiomeru, zatímco druhý enantiomer, neaktivní či s nežádoucími účinky, potom představuje nadbytečnou složku podílející se na lékových interakcích nebo zatěžující organismus.^{1,2}

Felodipin patří do třídy dihydropyridinových blokátorů kalciového kanálu. V praxi se využívá k léčbě hypertenze a anginy pectoris. Nese ve své molekule chirální centrum a existuje ve dvou enantiomerních formách. (S)-(-)-felodipin se ukázal jako 3x účinnější v případě snižování krevního tlaku než (R)-(+)-felodipin³. Z tohoto pohledu je výhodnější používat pouze aktivní S-enantiomer než racemát. Kyselina fenylmléčná je organická kyselina vykazující antimikrobiální vlastnosti⁴. Existuje ve dvou enantiomerech, D-(+)-3-fenylmléčná a L-(-)-3-fenylmléčná kyselina. V potravinářství je využívána k prodloužení trvanlivosti potravin. Vzhledem ke své struktuře a dostupnosti v požadované čistotě je vhodným modelem pro studium chiralit.

Ve farmaceutickém průmyslu jsou rozpouštědla přítomná v mnoha výrobních procesech. Používají se jako reakční média, při separacích i čištění. S využitím dnešní pokročilé počítačové techniky můžeme pomocí kvantové chemie sledovat interakce léčivých substancí s rozpouštědly „bez použití laboratoře“ a žádaných informací i v řadě případů, kdy je experiment vzhledem k potřebnému materiálu drahý, neekologický nebo nebezpečný. Výpočetně-chemickými metodami lze tak vypočítat nejstabilnější konformace chirálního léčiva v daném prostředí na základě hledání energetického minima. V kapalinové chromatografii tak může výpočetní chemie napovědět více informací jak o struktuře, tak mechanismu separace. Tato práce se zabývá experimentálním a výpočetním studiem vlivu rozpouštědel na optickou otáčivost felodipinu a kyseliny fenylmléčné a na jejich odezvu při měření chirálním detektorem používaným při chromatografické analýze.

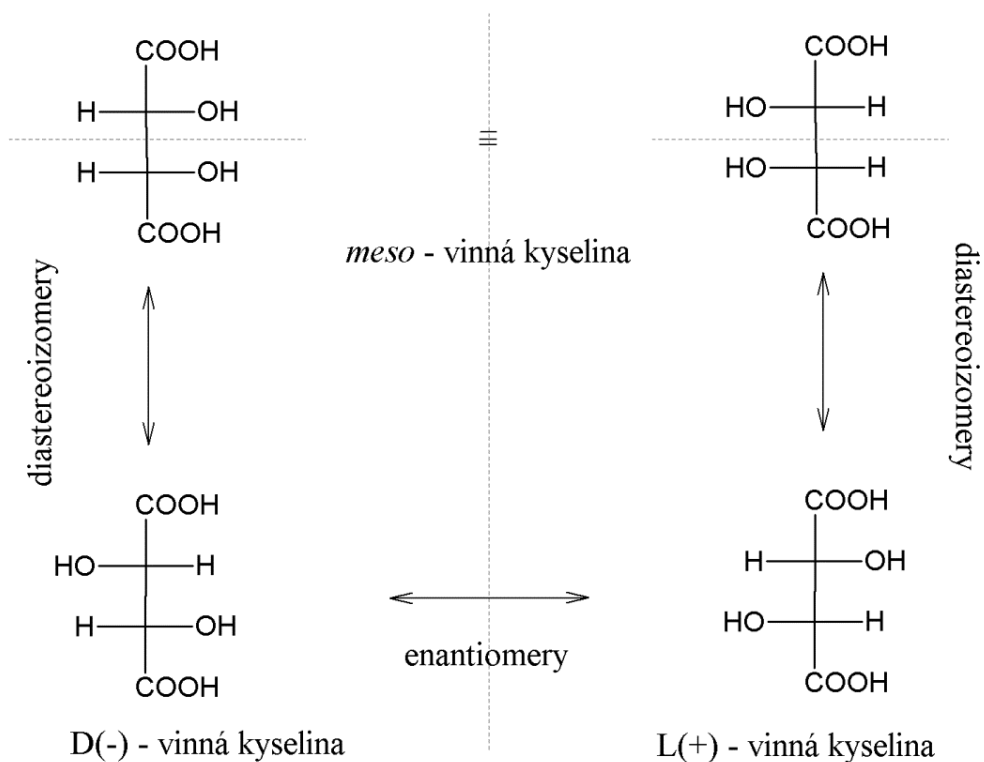
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Chiralita

Pojem chiralita je odvozen od slova *chiros*, neboli ruka. Popisuje fenomén existence chemických sloučenin, které jsou navzájem svými zrcadlovými obrazy, podobně jako pravá a levá ruka. Chiralita spadá do oblasti chemie zabývající se vzájemnými vztahy atomů sloučenin v prostoru (stereochemie) a představuje specifickou vlastnost danou prostorovým uspořádáním. Látky se stejným konstitučním a sumárním vzorcem lišící se prostorovým uspořádáním (konfigurací) jsou nazývány stereoizomery. Každý stereoizomer je svou konfigurací jedinečný. Dvě molekuly, které si jsou navzájem zrcadlovými obrazy, představují tzv. enantiomerní pár (Obrázek 1). Oba enantiomery se vyznačují stejnými fyzikálními i chemickými vlastnostmi (hustotou, bodem varu, teplotou tání atd.). Odlišují se však svojí optickou otáčivostí, která je dána rozdílným uspořádáním atomů v prostoru. Odlišnost v prostorovém uspořádání může v organismu vyvolat specifickou biologickou aktivitu, kde např. pouze jeden enantiomer disponuje žádoucími medicínskými vlastnostmi, zatímco druhý může disponovat menším biologickým účinkem nebo jej zcela postrádat^{1,2}. V extrémních případech může dokonce jedna z forem vyvolat nežádoucí toxické účinky nebo i smrt. Znalost konfigurace molekuly je z tohoto hlediska důležitým aspektem při návrhu nových léčiv a studium optické otáčivosti je pro tento účel významné^{2,5}.

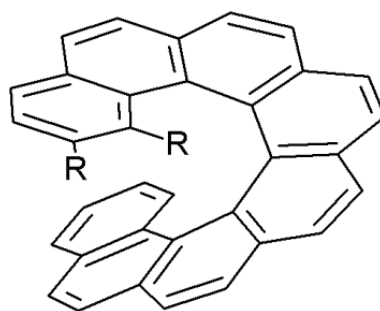
Vnitřní uspořádání rostlinných a živočišných organismů je praktickým příkladem chirálního prostředí, ve kterém se projeví rozdíly v působení a osudu jednotlivých enantiomerů přítomných látek. Patně nejvíce jsou chirální vlastnosti studovány u léčiv a látek ovlivňujících naše životní prostředí, například pesticidů. Minimálně 50 % všech využívaných léčiv jsou chirální sloučeniny a u pesticidů je to více než čtvrtina^{6,7}. V obou případech jsou tyto látky nejčastěji prodávány jako racemické směsi (většinou kvůli omezení nákladů spojených s produkcí nebo procesem čištění). Například oba enantiomery benalaxylu, (chirálního pesticidu užívaného při pěstování rajčat, brambor či tabáku) působí fungicidně. Nicméně aktivita (R)-benalaxylu je vyšší a zároveň je i toxičtější pro *Scenedesmus obliquus*, druh sladkovodních zelených řas⁷. Jiná studie pozorovala změnu v chování vůči predátorům u určitého druhu ryb (gambusie Holbrookova) při subletálních koncentracích antidepresiva fluoxetinu⁸. Ve vodním prostředí byla pro fluoxetin pozorována stereoselektivita při biodegradaci, která

ve výsledku vedla k vyšší přítomnosti (S)-fluoxetinu oproti jeho (R)-enantiomeru⁶. I když dnes pochopení problematiky stereoselektivity farmaceutických přípravků a pesticidů roste, stále není jejich chování jednoznačně předpověditelné.



Obrázek 1: Enantiomer a diastereoizomer na příkladu kyseliny vinné

Existuje i řada sloučenin, které nemají chirální centrum lokalizované na některém atomu, a přesto existují v různých enantiomerních formách. Klasickým příkladem jsou zde helicity (Obrázek 2). Helicity jsou neplanární aromatické systémy tvořené kondenzovanými benzenovými jádry vytvářejícími šroubovici. S takovou strukturou se lze setkat také např. u peptidických řetězců.⁹



Obrázek 2: Struktura [n]helicenu

2.1.1. Optická aktivita

Optická aktivita vyjadřuje schopnost chirální látky stáčet rovinu polarizovaného světla. Sloučeniny s touto schopností jsou nazývány opticky aktivní. Enantiomer stáčeující rovinu polarizovaného světla po směru hodinových ručiček je značen jako (+) a enantiomer stáčeující tuto rovinu v protisměru jako (-). Ekvimolární směs dvou enantiomerů (směs v poměru 1:1, jinak též racemická směs) vykazuje nulovou optickou otáčivost. Pro přesné určení absolutní konfigurace byla Cahnem, Ingoldem a Prelogem vyvinuta metoda (CIP projekce), kdy po uspořádání skupin dle priority (tj. přednosti těžšího nuklidu) se označuje každý enantiomer jako (R) nebo (S). Pokud molekula obsahuje více než jedno centrum chiraloty, nese každé chirální centrum svou (R) či (S) předponu⁵. Nejběžnější optické izomery obsahují asymetrický uhlík (tj. uhlík se čtyřmi různými substituenty), avšak chirálními centry mohou být i atomy jiných prvků, např. bor, křemík, fosfor. V případě, že molekula obsahuje více než jedno chirální centrum, mají některé stereoizomery k sobě vztah jako enantiomery a jiné jako diastereoizomery. Diastereoizomery mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti a je tedy možno je vzájemně rozlišit i v achirálním prostředí. Jejich optická aktivita se liší podle charakteru přítomných chirálních center. Může dokonce nastat i „achirální případ“, kterým je například tzv. *meso*-forma, klasicky popisovaná u kyseliny vinné (Obrázek 1)⁹. Tvorba diastereoizomerů je klíčová pro chirální separace v achirálních separačních systémech.¹⁰

2.1.2. Metody určování absolutní konfigurace

Stanovení absolutní konfigurace, tj. konfigurace enantiomerů, má za úkol přiřadit každému modelu příslušný projekční vzorec. Princip stanovení je založen na struktuře

diastereoizomerů. Konfigurace opticky aktivních látek se dá určit např. rentgenostrukturní analýzou, kdy do krystalu aktivní látky je zaveden atom těžkého prvku (např. rubidium). Při následném užití rentgenového záření s vlnovou délkou blízkou hraně absorpce těžkého atomu dochází k difrakci a fázovému posunu. Výsledné rentgenogramy jednotlivých enantiomerů nejsou totožné. Tato metoda je nicméně pracná, tudíž se v praxi využívá jiných a jednodušších postupů.^{11,12}

Konfiguraci lze zjistit také čistě chemickou cestou. Při chemické reakci se sleduje přeměna dvou enantiomerů, z nichž jeden má známou konfiguraci a konfigurace druhého je zkoumána. Následným polarimetrickým měřením je zjištěno, který enantiomer nově vznikl. Podmínkou je, aby reakce měly známý stereochemický průběh.^{11,13}

Chirální molekuly lze studovat i pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). Enantiomery jsou v NMR spektroskopii od racemické směsi nerozlišitelné. Nicméně, umístíme-li racemickou směs do chirálního prostředí, protony enantiomerů rozlišit lze. Magnetická okolí těchto protonů jsou jiná a poskytují rozdílné signály.¹⁴

2.1.3. Principy separace enantiomerů

Získávání čistých opticky aktivních látek vyžaduje specifický přístup, jelikož separacemi založenými na fyzikálních principech (např. destilace nebo krystalizace) enantiomery rozdělit nelze. První metoda separace racemátů na enantiomery byla založena na čistě mechanickém rozřídění krystalů lišících se od sebe svými tvary. Studium této problematiky byly časem postupně vyvinuty metody chemického (tvorba diastereoizomerů) a biochemického (enzymové selektivní reakce mikroorganismů) charakteru a v dnešní době zejména metody chromatografické.

Optická čistota obdrženého produktu je vyjádřena jako přebytek jednoho enantiomeru vůči racemátu. Produkt p v Rovnici 1 označuje tedy účinnost separace (obohacení produktu jedním enantiomerem). Při srovnání chirálních sloučenin získaných biologicky a „uměle“ chemickou cestou bývají obvykle ve větší optické čistotě získávány právě sloučeniny produkované živými organismy. Biotransformace řady chirálních látek totiž vykazuje stereoselektivitu. Dráhy jednotlivých enantiomerů v organismu se mohou lišit v boji o aktivní místo receptoru, afinitě k receptoru i rychlosti biotransformace.^{15,16}

$$p = \frac{[\alpha]_{zisk}}{[\alpha]_{abs}} \cdot 100 \%$$

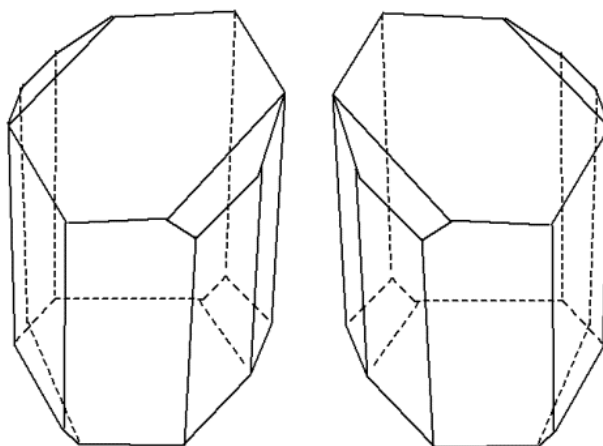
Rovnice 1: Účinnost separace racemátu

$[\alpha]_{zisk}$ – optická otáčivost získané látky

$[\alpha]_{abs}$ – optická otáčivost čistého enantiomeru

2.1.3.1. Mechanické štěpení (Pasteurova metoda)

Ručním roztríděním dvou zrcadlově odlišných krystalů vínanu sodno-amonného (Obrázek 3) dosáhl už v roce 1848 Louis Pasteur první chirální separace. Pro dnešní požadavky je však tato metoda zdlouhavá a pracná. Navíc tímto způsobem může být rozlišen jen malý počet látek. Klíčovým parametrem ovlivňujícím tuto metodu je teplota, při které probíhá samotná krystalizace. Pokud byla krystalizace racemické směsi vínanu sodno-amonného prováděna nad teplotu 27°C, byl získán opět racemát. Pouze pod teplotu 27°C se z roztoku srážejí krystaly pravotočivého a levotočivého enantiomeru odděleně.^{11,13}



Obrázek 3: Levotočivý a pravotočivý krystal vínanu sodno-amonného podle Pasteurových originálních nákresů (převzato z práce¹⁷)

2.1.3.2. Separace přes diastereoizomerní sloučeniny

Racemická směs enantiomerů může být chemicky přeměněna na „vhodný derivát“ pomocí jiné opticky aktivní látky (čínidla). Čínidlo obvykle musí odpovídat charakteru štěpené látky (tj. například štěpená látka – kyselina reaguje s čínidlem – bází a naopak). Vzniklé deriváty pravotočivého a levotočivého enantiomeru mají rozdílné rozpustnosti a někdy i jiné krystalové formy, a mohou proto být následně separovány klasickými fyzikálními metodami (krystalizací, destilací či chromatograficky). Získané diastereoizomerní soli jsou následně každá zvlášť rozloženy. Výsledným produktem jsou čisté enantiomery. Důležité je, aby tvorba i štěpení probíhaly snadno, načež je žádoucí minimalizovat proces racemizace. Nevýhody této metody spočívají často ve vysoké ceně a potřebné dostatečné čistotě opticky aktivního čínidla. Problematická je i závislost na vlastnostech rozpouštědla či na teplotě.^{11,13}

2.1.3.3. Biochemická metoda získávání opticky aktivních látek

Roku 1857 pozoroval Pasteur působení mikroorganismů (plísní) na kyselinu vinnou. Objevil, že při některých biochemických pochodech je pravotočivá forma kyseliny rozkládána přednostně. Tyto pochody dovolovaly nespotřebovaný levotočivý enantiomer nahromadit a izolovat v čisté podobě. Biochemická metoda našla uplatnění např. při štěpení L- a D-enantiomerů aminokyselin nebo při stereospecifické hydrolyze esterů.¹¹

2.1.3.4. Separace na opticky aktivních adsorbentech

Roztok s chirální látkou je adsorbován na opticky aktivní adsorbent. Různé adsorpční vlastnosti, tj. různá diastereoizomerní interakce, jednotlivých enantiomerů zapříčiní rozdílnou chromatografickou pohyblivost v separačním loži. Každý z enantiomerů je jinak adsorbován, což nám dovoluje rozpuštěnou látku separovat. Aktivní adsorbenty mohou být přírodního (některé krystaly křemene) i syntetického (polyakrylát s navázaným chininem) původu. Na tomto základu vznikly dnešní chromatografické metody, kam lze zahrnout papírovou, plynovou a kapalinovou chromatografii. O samostatných chromatografických metodách dále pojednává kapitola 2.3.^{11,13}

2.2. Výpočetní chemie

Základem metod výpočetní chemie je využití Schrödingerovy rovnice, pomocí níž lze získat hodnoty energií E a odpovídající vlnové funkce ψ sledovaného systému¹⁸. Celkovou energii E můžeme uvažovat jako součet vibrační, rotační, potenciální a kinetické energie. V kvantové chemii je tato rovnice využívána především v tzv. časově nezávislém tvaru (Rovnice 2) sloužící kupříkladu k nalezení geometrie dané molekuly¹⁹. Na druhou stranu, časově závislá rovnice (Rovnice 3) může posloužit k odvozování vývoje daného systému v čase (např. typy přechodů ve spektrometrii)²⁰. Hamiltonův operátor (hamiltonián) \hat{H} udává informaci o geometrii a silách mezi elektrony a jádry v dané molekule. Pro každou geometrii molekuly nabývá hamiltonián jiného tvaru. V uvedeném vztahu představuje i imaginární jednotku a \hbar redukovanou Planckovu konstantu. Přesná řešení Schrödingerovy rovnice jsou nicméně omezená na nejjednodušší systémy. U systémů komplikovanějších dostáváme tedy i ve výpočetní chemii řešení pouze přibližná.

$$\hat{H}\psi = E\psi$$

Rovnice 2: Časově nezávislý tvar Schrödingerovy rovnice

$$\hat{H}\psi = i\hbar \frac{\partial\psi}{\partial t}$$

Rovnice 3: Časově závislý tvar Schrödingerovy rovnice

K samotnému výpočtu Schrödingerovy rovnice bylo vyvinuto několik aproximačních metod, které na základě přístupu lze rozdělit do tří skupin:

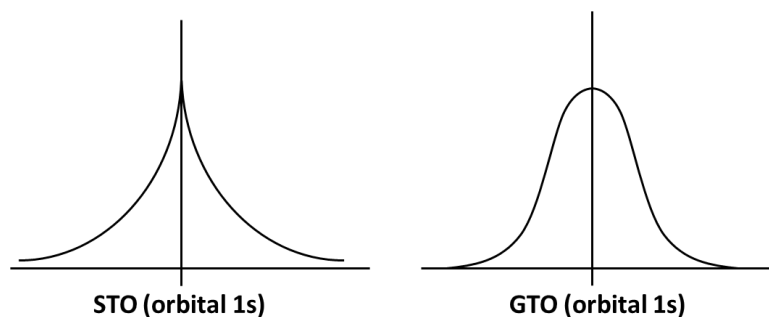
- Ab initio metody (z lat. „od počátku“) vycházející ze základních přírodních zákonů. Tyto metody vyžadují pro výpočet pouze základní fyzikální charakteristiky studovaného systému (hmotnost, náboj aj.) a jsou náročné na výpočetní čas. Do této skupiny patří např. Hartree-Fockova metoda (HF).
- Semiempirické metody využívají vícero aproximací pro experimentálně zjištěná data nebo výpočty výše zmíněných *ab initio* metod. Typicky jsou do výpočetních kroků zahrnuty pouze vnější elektrony, zatímco vnitřní jsou považovány za součást jádra. Nejjednodušší a nejstarší semiempirickou metodou je Hückelova metoda.

- Metody založené na teorii funkcionalu hustoty (zkr. DFT, z angl. *Density Functional Theory*) se odlišují od prvních dvou zmíněných tím, že jejich základem není hledání tvaru vlnové funkce, nýbrž distribuce hustoty elektronů v rámci studovaného systému. Mezi nejpoužívanější aproximace v DFT patří tzv. aproximace lokální hustoty (zkr. LDA, z angl. *Local Density Approximation*). DFT bývají oproti *ab initio* metodám méně časově náročné, nicméně jsou pomalejší než výpočty semiempirické. O bližších specifikacích DFT se lze dočíst v textu níže.

Všechny metody v kvantové chemii využívají pro zjednodušení hamiltoniánu tzv. Born-Oppenheimerovy aproximace (BOA)²¹: Hmotnost protonů v jádře atomu značně převyšuje hmotnost elektronů. Předpokládáme tedy, že elektrony jsou z tohoto důvodu v prostoru mnohem pohyblivější než jádra, která tedy tvoří aproximovaně fixní elektrostatické pole. V okolí nehybných jader poté s využitím Schrödingerovy rovnice hledáme nejvýhodnější uspořádání elektronů. Dalším pravidlem přibližující energii systému je tzv. variační princip. Na jeho základě hledáme při výpočtech takovou vlnovou funkci, při níž je energie stavu molekuly nejnižší. Takto jsou testovány různé funkce a ta, která má energii nejnižší, popisuje nejlépe daný systém.²¹

Teorie funkcionalu hustoty (DFT) patří dnes díky své akceptovatelné přesnosti a relativní jednoduchosti mezi nejpoužívanější metody odhadu elektronové struktury. Základem jsou Hohenbergovy-Kohnovy teoremy²², kterými je možné vyjádřit energii systému při zohlednění vzájemného vztahu mezi coulombovskými interakcemi elektronů s jádry. Pomocí výše zmíněného variačního principu následnými operacemi hledáme elektronovou hustotu o nejnižší energii. Zatímco vlnová funkce popisuje, s jakou pravděpodobností se jeden *konkrétní* elektron nalézá v daném prostoru, elektronová hustota udává, s jakou pravděpodobností se v prostoru vyskytuje *jakýkoli* elektron, což značně zjednodušuje přístup při řešení problému. Podle typu a kvality požadovaného výstupu používáme např. již zmíněnou aproximaci lokální hustoty (zkr. LDA, z angl. *Local Density Approximation*), aproximaci zobecněného gradientu (zkr. GGA, z angl. *Generalized Gradient Approximation*) a popř. další hybridní modely. LDA se zakládá na hypotetickém předpokladu konstantnosti elektronové hustoty v celém studovaném systému (prostoru). GGA představuje určitý typ vylepšení LDA, kdy do výpočtu zahrnujeme i informaci o gradientu elektronové hustoty²⁰. Nutno zmínit skutečnost, že výpočetní čas lineárně roste v závislosti na rozměrech a komplikovanosti studovaného systému^{19,23}.

K provedení aproximací je třeba zavést tzv. báze, což je soubor funkcí nazývaných jako „bázové“. Bázové funkce reprezentují soubor atomových orbitalů. Kombinacemi těchto funkcí jsou vytvořeny molekulové orbitály. Ovšem i v tomto bodě dochází k určitému zjednodušení, kdy v bázích uvažujeme pouze nejdůležitější počet potřebných funkcí. Pro popsání bázových funkcí existují dva přístupy: Slaterův orbital (zkr. STO, z angl. *Slater Type Orbitals*) nebo Gaussova funkce (zkr. GTO, z angl. *Gaussian Type Orbitals*). Jejich grafické zobrazení je znázorněno na Obrázku 4. STO více odpovídají reálnému stavu. GTO byly zavedeny druhotně vzhledem k tomu, že jsou výpočetně jednodušší zpracovatelné než STO²⁴. Exponenciální křivka STO je pro nulovou vzdálenost od jádra „špičatá“. Gaussova křivka naproti tomu má „kulatý“ vrchol, což neodpovídá reálnému průběhu vlnové funkce a na ose r klesá k nule rychleji než u STO (Obrázek 5). Lineárními kombinacemi více Gaussovských funkcí se získává křivka blíží se tvarem funkci Slaterova typu (Obrázek 6). Pro bázové funkce se tedy nevyužívají jednoduché gaussiany, nýbrž jejich kombinace. Pro vyjádření vlnové funkce molekuly využíváme v základu takový počet bázových funkcí, kolik má molekula elektronů. K dalšímu rozšíření tohoto minimálního bázového setu lze doplnit zohlednění nevalenčních elektronů, polarizační či difúzní funkce.^{25,26}

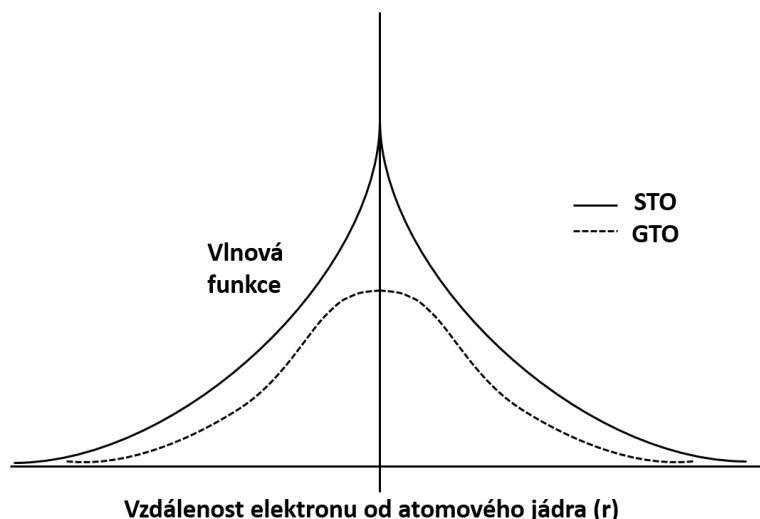


Obrázek 4: Funkce Slaterova a Gaussova orbitalu (převzato z práce ²⁷)

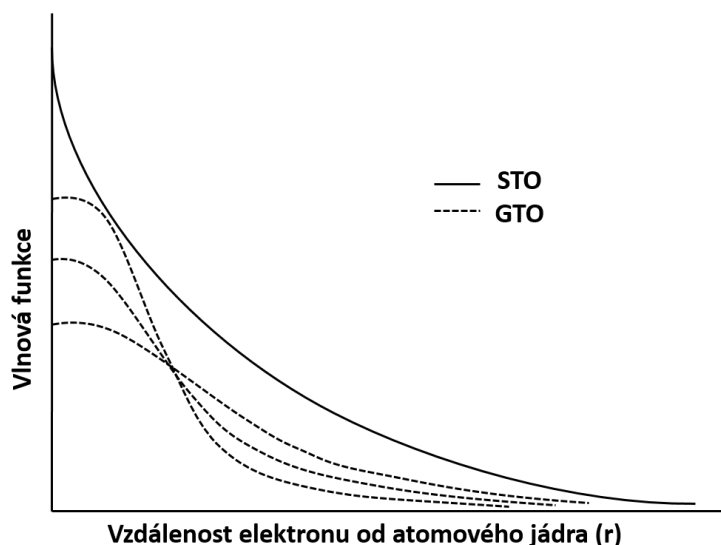
Jelikož k popisu chemických vlastností a reaktivity většiny molekul jsou potřebné valenční elektrony, byly vyvinuty tzv. „split-valence“ bázové sety. Tyto sety popisují nevalenční elektrony minimální bází a valenční elektrony popisují bází větší, např. double zeta (DZ), triple zeta (TZ). V případě double zeta jsou pro popis atomového orbitalu použity dvě bázové funkce, pro triple zeta tři. Znásobení počtu bázových funkcí umožňuje lepší popis elektronové distribuce. Tyto funkce pak tvoří skupinu Gaussovských funkcí tvořících jednu bázovou funkci. Celý set se poté označuje zkráceným popisem. Například

set 6-31G popisuje vnitřní elektrony (vlevo) od valenčních elektronů (vpravo) pomlčkou. Vnitřní elektrony jsou popsány šesti Gaussovskými funkcemi. Přidáním polarizačních bazových setů, označeno přidáním hvězdičky „*“, se zlepšuje flexibilita funkce (6-31G*) u nevodíkových atomů. Pokud se polarizační funkce přivedou i na vodík, označuje se dvěma hvězdičkami (6-31G**).^{25,26}

Vyvinuty byly také korelačně konzistentní bazové sety založené na minimalizaci atomu. Označují se např. „aug-cc-pVDZ“, kde předpona „aug“ značí přidavek difuzní funkce. Písmena „cc“ značí korelačně konzistentní bázi, což znamená, že k dispozici jsou zde všechny typy orbitalů (s, p, d, f...). Písmenem „p“ se označuje zahrnutí polarizační funkce a „VDZ“ (tedy „split-valence double zeta“) popisuje rozdělení valenčního prostoru.^{25,26}



Obrázek 5: Porovnání funkcí STO a GTO (převzato z práce ²⁸)



Obrázek 6: Báze STO, kde každý orbital je popsán třemi Gaussovými funkcemi (převzato z práce ²⁸)

2.2.1. Využití výpočetní chemie ve studiu chiralit

Kvantově-chemickými studii lze sledovat molekuly lišící se navzájem v absolutní konfiguraci. Metody kvantové chemie dovolují prostudovat mechanismy účinku některých látek a mohou přinést i jinak obtížně dosažitelné informace o složitých molekulových systémech (například určit elektronové hustoty na daných atomech, vzájemné orientace skupin a řetězců molekul apod.). Výpočetními postupy byla studována např. kyselost chirálních organokatalyzátorů kyseliny fosforečné, které jsou využívány v organické syntéze. Disociační konstanta kyselin byla takto predikována s přesností na 0,5 pKa. Kvantová chemie nabízí také možnost predikce molekulárních vlastností díky teoretickým informacím o vibračních a UV/VIS spektrech, termochemii aj. Hlubšímu porozumění optické aktivitě došlo hlavně v posledních 15 letech, kdy modely kvantové chemie pokročily ve směru studia absolutní konfigurace. Od molekul složených z maximálně 50 atomů se s nástupem rychlejších počítačů přešlo i ke složitějším a objemnějším systémům. Určení absolutní konfigurace chirálního produktu získaného enzymatickou cestou nám na základě výpočtu optických vlastností může např. pomoci vyvrátit nebo potvrdit mechanismus reakce enzymu se substrátem^{29,30}.

První postupy kvantové mechaniky pro výpočet specifické otáčivosti byly vyvinuty Rosenfeldem již na konci 30. let. S vývojem počítačových technologií se tyto postupy dají dnes aplikovat na i složitější struktury. V jednom z prvních výzkumů bylo v práci

profesora P. L. Polavarapu studováno 11 rozdílných molekul. U všech zkoumaných byl potvrzen souhlas znaménka experimentálně změřené měrné otáčivosti s predikovanými (vypočtenými). Znaménko specifické rotace bylo také úspěšně predikováno při studiu (R)-bromochlorofluoromethanu³¹. Nicméně v obou případech se chyba hodnoty optické otáčivosti pohybovala i v desítkách stupňů.

2.2.2. Zjišťování základní struktury molekul

Prvním krokem ve studiu chiraloty pomocí výpočetní chemie je návrh 3D struktury molekuly. Trojrozměrná struktura molekuly závisí na energii – systém se snaží zaujmout co nejvíce energeticky stabilní stav. Jemu odpovídající geometrie (konformace molekuly) pak hraje roli při následné interakci molekuly s polarizovaným zářením. Kvalita výsledků se odvíjí od typu aproximace. Příznivým poměrem kvality výsledků a časové náročnosti výpočtu oplývá v současnosti populární metoda DFT. Metoda DFT také (na rozdíl od HF) ošetřuje vzájemnou korelaci elektronů, a je proto v současnosti preferována. Elektronová hustota je v případě DFT funkcí tří prostorových souřadnic, zatímco vlnová funkce N částic závisí na $3N$ souřadnicích. Metoda DFT může vést k přesnější energii systému během kratšího výpočetního času. Nezbytná je volba vhodného setu bází následovaná výpočetními kroky v hledání minima potenciálních energií. Cílem je optimalizace geometrie tak, aby v trojrozměrném modelu byla všechna pnutí v molekule minimalizována, tedy abychom dosáhli minimální energie modelu. Na tomto místě mohou nastat komplikace např. u biopolymerů, jejichž konformace mohou obsahovat velké množství lokálních minim. U proteinů může být kalkulace struktury velmi náročná, nicméně menší molekuly mohou být řešeny metodou tzv. simulovaného žihání. V podstatě se jedná o simulaci uspořádání částic v prostoru tak, aby bylo z termodynamického hlediska dosaženo globálního minima. Simulace vychází z předpokladu, že při vysokých teplotách je uspořádání molekul v prostoru náhodné. Postupným a pomalým snižováním teploty k absolutní nule překoná systém lokální minima a ustálí se v krystalickém uspořádání odpovídajícím globálnímu minimu interakční energie.^{23,32,33}

I samotné interakce chemického okolí se sledovanou molekulou vyžadují aplikaci modelů. Různá rozpouštědla různě interagují s výchozími látkami či produkty, přičemž se zároveň mění jak termodynamika, tak kinetika systému, jak ukázaly některé experimenty^{34,35}. První metoda popisu rozpouštědla je tzv. metoda *implicitního solventu*,

kdy se provádí tzv. „konformační průměrování“, při kterém se vypořádáváme s nejistotami výsledků zavedením vhodného spojitého media reprezentujícího rozložení rozpouštědla kolem studované látky^{23,32}. Univerzální model rozpouštědla vytvaruje kolem atomů molekuly kavitu (dutinu) dle jejího povrchu a elektrostatických vlastností. Takovýto model se nazývá model polarizovaného kontinua (zkr. PCM, z angl. *Polarizable Continuum Model*) a pracuje s rozpouštědlem jako s dielektrikem.³⁶ Na základě dané simulace existují i další druhy modelů a jejich vzájemné kombinace, např. model COSMO (z angl. *Conductor-like Screening Model*) pracující s rozpouštědly jako s vodiči podle jejich permitivit. Implicitní metoda se často používá pro odhad volné energie polysacharidů, DNA, RNA. Výhodou implicitních solvatačních modelů je jejich menší ekonomická náročnost než u modelů explicitních. Pro molekulové modelování je vhodné použít tzv. *explicitní solvataci*. Explicitní solvatační modely jsou jak z časové, tak výpočetní stránky poměrně náročné, jelikož ve výpočtu se uvažují stovky i tisíce jednotlivých molekul solventu. Sledování jednotlivých interakcí může být ale i výhodou, pokud chceme získat informace o mezimolekulárních interakcích. Do této kategorie solvatačních modelů patří např. molekulová dynamika nebo metoda Monte Carlo.^{20,37}

DFT metody se ukázaly i jako vhodný prostředek k predikci IR a NMR spekter^{2,38,39} či k výpočtu optické otáčivosti^{2,40,41}. V současné době jsou počítačové simulace vhodným prostředkem i k výpočtům spekter cirkulárního dichroismu (zkr. CD, z angl. *Circular Dichroism*). Cirkulární dichroismus je metoda založená na rozdílné absorpci pravotočivé a levotočivé kruhově polarizované složky záření opticky aktivní látkou. Analýzou CD spekter jsou například získávány informace o sekundární struktuře proteinů, jako je α -helix a β -skládaný list⁴²⁻⁴⁴. Simulace spekter nabízí možnost porovnání se spektry skutečnými, čímž poskytují údaje o mechanismu jejich vzniku nebo o interakcích molekul. Nicméně, výpočetní chemie nezaručuje dokonalý souhlas se skutečností. Při studiu větší chirální sloučeniny se ukázala teoretická spektra vibračního cirkulárního dichroismu vhodná k potvrzení absolutní konformace. Naproti tomu, v rámci téže studie, se vypočtená spektra optické rotační disperze a elektronového cirkulárního dichroismu neshodovala s experimentálními daty u většiny úseků vlnových délek. V tomto případě nebylo s dostatečnou přesností možné ze spekter určit absolutní konfiguraci diastereoizomerů⁴⁵. Při interpretaci vypočtených dat je tedy namístě opatrnost a pokud možno ověření výsledků – alespoň ve vhodně volených a odůvodněných situacích – experimentem.⁴⁶

2.3. Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou založeny na rozdílném ustalování rovnováhy stanovovaných látek mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fází. Využívají k tomu celou řadu principů separace a mají různá experimentální uspořádání. V závislosti na konkrétní použité technice je pak volen vhodný detekční systém. I když chromatografické metody tvoří celá skupina metod, nejčastěji se rozdělují na dvě podskupiny podle charakteru fází: plynovou (mobilní fáze je plyn) a kapalinovou chromatografii (mobilní fáze je kapalina). V případě plynové chromatografie využíváme teplotně-vodivostní, plamenově-ionizační nebo hmotnostní detektory. Plynová chromatografie (zkr. GC, z angl. *Gas Chromatography*) je využitelná k analýze látek těkavých (s bodem varu pod 300°C). Problém může nastat, pokud se analyt při vysoké teplotě rozkládá⁴⁷. Mnohdy je třeba před samotnou analýzou provést derivatizaci analytu za účelem jeho převedení z netěkavé formy na formu těkavou. Naproti tomu kapalinová chromatografie umožňuje analýzu termicky labilních, a i málo těkavých látek. Mezi nejčastěji používané detekční techniky používané ve spojení s kapalinovou chromatografií patří např. UV/VIS spektrometrie, amperometrie a hmotnostně-spektrometrická detekce. Pro analýzu chirálních látek jsou významné polarimetrické detektory a zařízení dovolující měření cirkulárního dichroismu (CD) v průtoku. Detailní informace o technickém řešení těchto zařízení a možných aplikacích jsou dostupné v přehledovém článku Bobbitta a Lindera⁴⁸. CD a polarimetrické detektory jsou založeny na interakci chirální molekuly s polarizovaným světlem. Analyty interagují s tímto světlem na základě své vnitřní struktury a výsledná měření mohou být využita jak pro kvalitativní analýzu, tak pro kvantifikaci. Samotná kapalinová chromatografie je schopna pokrýt větší oblast sledovaných látek. V dnešní době je velmi běžnou technikou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Svým uspořádáním je podobná klasické kolonové chromatografii, nicméně pracuje při vysokých tlacích v jednotkách až desítkách MPa. Stacionární fáze v koloně u HPLC je nejčastěji tvořena malými pravidelnými kulovitými porézními částicemi, čímž dosahujeme účinnosti až desítek tisíc teoretických pater. Z hlediska účinnosti se také u kapalinové chromatografie projevuje příspěvek molekulární difúze složky méně než u chromatografie plynové z důvodu vyšší viskozity kapalin oproti plynům. V dnešní době lze chromatografickou analýzu automatizovat (automatické dávkovače) a případně i miniaturizovat (např. s použitím kapilárních kolon).¹⁰

2.3.1. Využití HPLC pro separace diastereomerů a enantiomerů

Chromatografie v systému reverzních fází (RP-HPLC) je v dnešní době první volbou pro separaci většiny obvyklých achirálních vzorků. Poskytuje dostatečnou robustnost a reprodukovatelnou analýzu. Systém RP je charakteristický tím, že stacionární fáze je méně polární (na sorbent je navázán nepolární řetězec, nejčastěji tzv. C18 nebo C8) než vodně-organická mobilní fáze. Retence analyzovaných látek závisí na mnoha faktorech, jako jsou např. polarita molekul, složení MF či teplota. Čím menší je polarita analytu, tím více je zadržován ve stacionární fázi. Chromatografie v systému s obrácenými fázemi se proto hodí k dělení členů homologických řad, jelikož čím delší je jejich uhlíkatý skelet, tím delší je zadrž na koloně. Nicméně, některé velmi hydrofilní nebo hydrofobní vzorky, izomery (ať už achirální či chirální) nebo biomolekuly nemohou být pomocí RP-HPLC vhodně odděleny a vyžadují tedy využití jiného separačního mechanismu. Přímá separace enantiomerů v systému reverzních fází není možná, ale po jejich chemické přeměně na diastereomery (vhodnou derivatizací) už rozlišení možné je. Převedení na diastereomery je poměrně oblíbeným postupem, jak bude podrobněji uvedeno dále.

Na rozdíl od reverzní fáze, se v systému normálních fází (NP-HPLC) pracuje se stacionární fází, která je polárnější než fáze mobilní. Základním principem je adsorpce, a proto je tento druh chromatografie vhodný pro separaci konfiguračních izomerů. V NP je vhodné pracovat s bezvodými rozpouštědly, jelikož i malé množství vody separaci komplikuje (obzvláště v případě stacionární fáze s nemodifikovaným silikagelem). Systém NP-HPLC je výhodný pro vzorky, které se ve vodném prostředí rozkládají. Z důvodu vyšších nákladů, horší reprodukovatelnosti retence, nižší účinnosti kolon a některých dalších aspektů je NP-HPLC používána méně často. Normální fáze jsou rovněž achirální a potenciálně umožňují přímé separace diastereomerů. Pro separaci enantiomerů je potřeba provést derivatizaci vhodným chirálním činidlem. V práci zabývající se separací enantiomerů ketorolaku pomocí NP-HPLC dosáhli I. Tsina, Y. L. Tam a kol. účinné separace s využitím (+)-R-1-(1-naftyl)ethylaminu jako derivatizačního činidla⁴⁹.

Jak vyplývá z předchozího textu, oba chromatografické módy nelze využít k přímé separaci. Enantiomery se totiž v achirálním prostředí chovají jako dvě totožné látky. Jejich odlišnost se projevuje až při interakci s chirálním prostředím, kdy zpravidla vzniká nějaká forma diastereoizomerů, které již mají v tomto směru vlastnosti odlišné. Použití chirálního

prostředí v principu rozděluje používané metody na dvě velké skupiny – tzv. „přímou“ a „nepřímou“ metodu. Přímá metoda využívá k dělení analytů chirální stacionární fáze (zkr. CSPs, z angl. *Chiral Stationary Phases*), kde diastereomer vzniká interakcí analytu se stacionární fází. Interakce analyzovaného enantiomeru s chirálním selektorem vede ke vzniku tranzitního diastereomerního komplexu, který již lze separovat. Přímá metoda je pro svou snadnost a absenci derivatizačního kroku populárnější. Nevýhodou je ovšem obvykle poměrně vysoká cena selektoru (pro jeho přidavek do mobilní fáze) nebo chirální kolony^{10,50}. U nepřímé metody nejprve dochází k reakci analytů a vhodného činidla za vzniku diastereomerů a následná separace probíhá na achirální stacionární fázi. Diastereomerní komplex musí při separaci splňovat pravidlo tzv. třibodové interakce. To znamená, že činidlo interaguje s enantiomerem třemi různými interakcemi najednou, přičemž alespoň jedna z nich je stereoselektivní (vodíkové můstky, sterické interakce, elektrostatické síly apod.)⁵⁰. Hlavní nevýhodou nepřímé metody je nutnost práce s činidly o vysoké čistotě (větší než 99,9 %) a časová náročnost přípravy derivátu. Mimo jiné je nutné zajistit, aby během derivatizační reakce nedocházelo k racemizaci. Riziko racemizace vzniká při nedostatečné čistotě činidel a teplotních podmínkách nad 40°C. Získáním derivátu zároveň přicházíme o původní molekulu, což v některých případech představuje nevýhodu, pokud chceme s analytem ještě dále pracovat.⁵⁰

2.3.2. Chirální stacionární fáze (CSP)

První separaci enantiomerů na fázi s vázanými L-aminokyselinami provedl roku 1971 profesor Davankov a kol.⁵¹. V této práci bylo provedeno rozlišení enantiomerů α -aminokyselin. Od té doby se vývoj značně posunul. Dnes nalezneme na trhu více než sto komerčně dostupných chirálních stacionárních fází, které lze použít na separaci většiny chirálních sloučenin. První komerčně dostupnou fází navrhl Pirkle a kolektiv⁵². Šlo o tzv. fází kartáčového typu, která poskytovala dvě amidové a jednu dinitrobenzoylovou skupinu (Obrázek 10). Následoval výzkum crown-etherových (Obrázek 9) a cyklodextrinových (Obrázek 8) fází. Vedle syntetických polymerů se rozvíjela i aplikace přírodních chirálních polymerů jako jsou proteiny a polysacharidy.^{53,54}

Přímá metoda s využitím CSP je v dnešní době nejrozšířenějším způsobem separace izomerů v HPLC. Při tvorbě diastereoizomerních sloučenin enantiomeru (analytu) se stacionární fází se uplatňují různé interakce (vodíkové vazby, inkluze, ligandové

interakce, π - π interakce aj.) – ty jsou řídící silou enantioseparace. Typ interakce závisí na struktuře samotné stacionární fáze. Přehled těch nejpoužívanějších a u nich se uplatňující interakce udává Tabulka 1.^{10,50,55}

Tabulka 1: Rozdělení chirálních stacionárních fází a jejich hlavní interakce

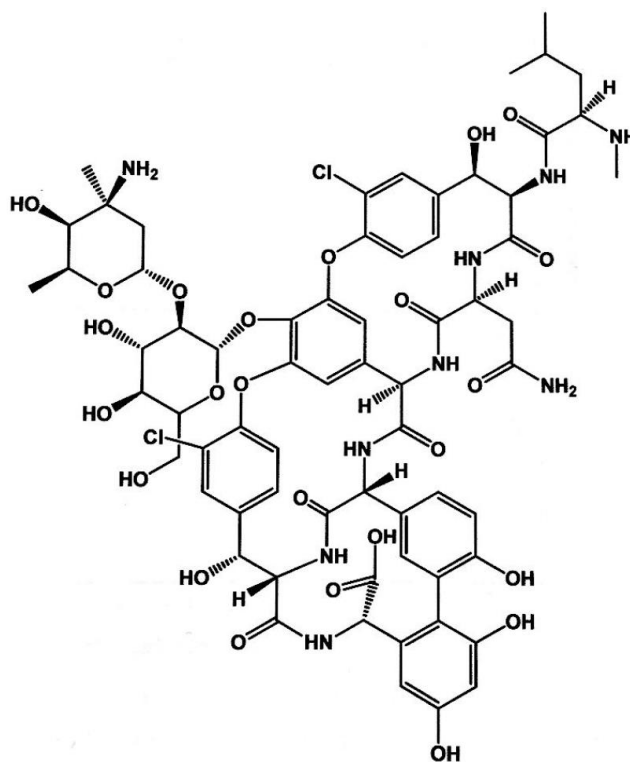
Typ fáze	Typ interakce
Polysacharidové (na bázi amylosy nebo celulosy) ⁵⁶	Vodíkové vazby, π - π interakce
Makrocyclická antibiotika (vankomycin, teicoplanin, ristocetin) ⁵⁷	Vodíkové vazby, π - π interakce, hydrofobní inkluze
Cyklodextrinové ^{58,59}	Inkluzní komplexace
Crown-etherové ⁶⁰	Inkluzní komplexace
Glykoproteinové ⁶¹	Vodíkové vazby, π - π interakce, hydrofobní inkluze
Pirklovy fáze ⁶²	π - π interakce

Na volbu vhodné fáze pro efektivní chirální separaci daného analytu neexistuje dosud obecně platný postup. Existují doporučení, která mohou s výběrem pomoci. Kyseliny je např. doporučeno dělit na proteinových, celulosových, amylosových nebo Pirklových fázích. Pro alkaloidy a dihydropyridiny je doporučována celulosová kolona, na estery kolona s Pirklovými nebo celulosovými fázemi. Predikce výběru nejvhodnější CSP je nicméně téměř nemožná.⁵⁰

Polysacharidy jsou přirozeně vyskytující se polymery. Vzhledem k tomu, že samy jsou opticky aktivní, umožňují chirální separaci. V původním stavu však poskytují pouze malé rozlišení, v praxi se proto používají jejich synteticky připravené deriváty. Tyto deriváty jsou na silikagelový nosič pouze nanášeny (tzv. coated-type) nebo vázány kovalentně (tzv. immobilized-type). *Coated-type* kolony jsou schopny rozlišit širší škálu sloučenin a jsou vhodnější pro preparativní aplikace. Na druhou stranu, výběr mobilní fáze je limitován na alkoholy, alkany a acetonitril. Etery, estery, ketony a chlorované alkany jsou pro tento typ kolon nevhodné, jelikož rozpouštějí polysacharid. *Immobilized-type* kolony výrazně rozšiřují výběr mobilní fáze, tím i rozpustnost analyzovaných látek.

V kapalinové chromatografii se používají zejména fáze na bázi celulosy a amylosy, ale můžeme se setkat i s fázemi xylanovými, chitosanovými a dextranovými. Komerčně dostupné chirální kolony firmy Daicel bázi celulosy lze nalézt pod názvy Chiralcel. Amylosové kolony firmy Daicel nesou název Chiralpak. Bližší popis polysacharidových fází podává kapitola 2.3.3.^{53,63}

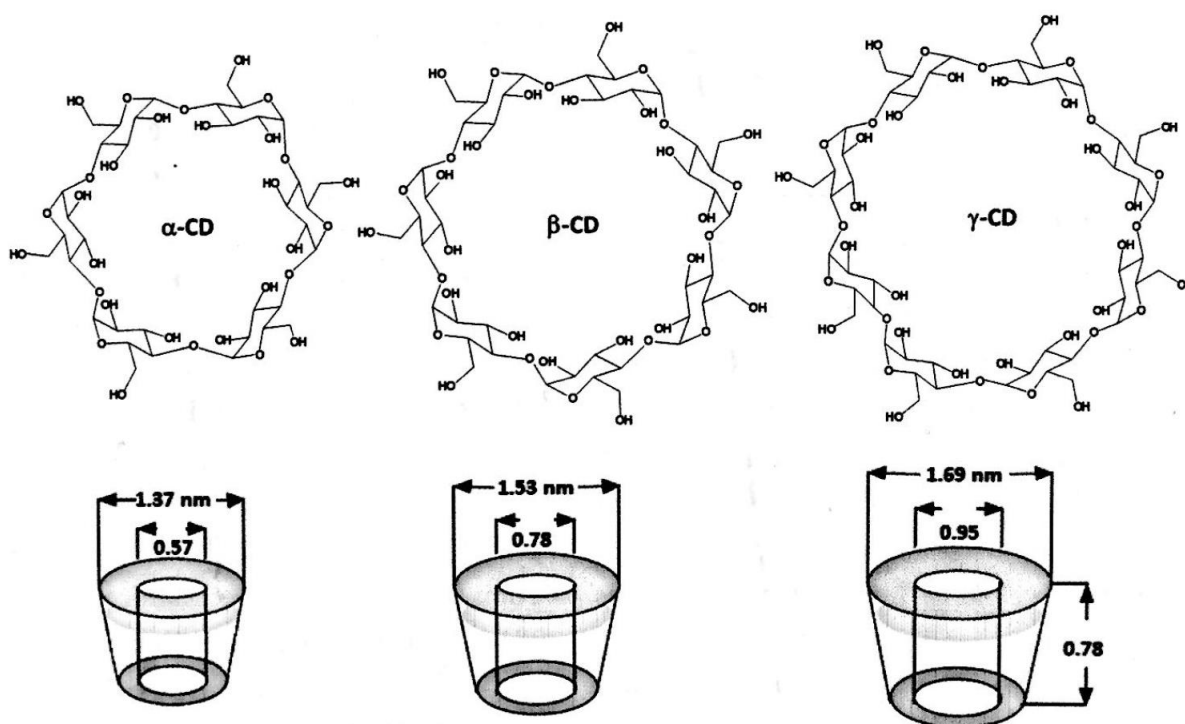
Jedním z nejnovějších a rychle se rozvíjejících chirálních selektorů jsou makrocyclická antibiotika. Komerčně používanými sloučeninami z této skupiny jsou zejména vankomycin (Obrázek 7), teicoplanin a ristocetin A. Všechna zmíněná antibiotika vznikají jako produkty fermentace. Principem separace na těchto fázích je zachycení enantiomeru do aglykonové „misky“ tvořené makrocyclickým kruhem a peptidovým řetězcem s různým počtem sacharidových skupin. Ten z enantiomerů, který je zadržován v „misce“ více, eluuje z kolony později než slaběji vázaný enantiomer.^{10,64}



Obrázek 7: Struktura vankomycinu¹⁰

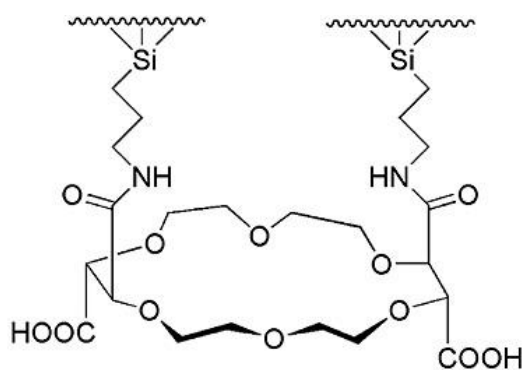
Cyklodextriny (Obrázek 8) jsou cyklické oligosacharidy obsahující 6 až 12 D-(+)-glukopyranosových jednotek spojených α -1,4-glykosidickou vazbou. Podle jejich velikosti (počtu glukosových jednotek) je dělíme na α - (6 jednotek), β - (7 jednotek) a γ -cyklodextriny (8 jednotek). Vznikají nespecifickým enzymatickým rozkladem

a rozlišení enantiomerů na nich spočívá v obdobném principu jako u makrocyclických antibiotik. Do hydrofobní kavity cyklodextrinu pronikne nepolární část molekuly, kde je následně vázána mezimolekulárními silami. Hydroxylové skupiny na vnější straně cyklodextrinu mohou být derivatizovány za účelem zvýšení rozpustnosti, změny konformace či náboje. Např. heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -CD poskytuje hlubší kavitu a je více rozpustný než původní β -CD^{65, 10,64}



Obrázek 8: Struktury nejčastějších cyklodextrinových CSP¹⁰

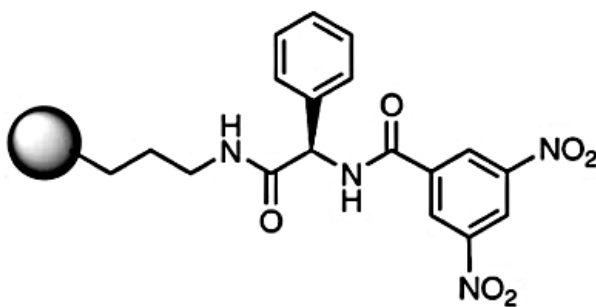
Crown-etherové CSP strukturou připomínají korunu (Obrázek 9). Jedná se o syntetické makrocyclické polyethery obsahující ethylenoxidový můstek (-CH₂CH₂O-). Dle počtu můstků vzniká dutina o různých rozměrech obdobně jako u cyklodextrinů, ale s uplatněním jiných typů interakcí.¹⁰



Obrázek 9: Struktura CSP crown-etherového typu vázaného na nosiči⁶⁰

Glykoproteiny jsou vysokomolekulární a strukturně komplexní proteiny vzniklé spojením L-aminokyselin a cukerné složky. Mezi nejčastěji používané proteiny patří hovězí sérový albumin (zkr. BSA, z angl. *Bovine Serum Albumin*), lidský sérový albumin (zkr. HSA, z angl. *Human Serum Albumin*), α_1 -kyselý glykoprotein (zkr. AGP, z angl. *Acid Glycoprotein*), pepsin, riboflavin atd. Nevýhodou těchto CSPs je poměrně nízká kapacita a omezení v rozpětí pH mobilní fáze od 4 do 7. Při teplotách nad 40°C navíc hrozí, že dojde k denaturaci stacionární fáze.¹⁰

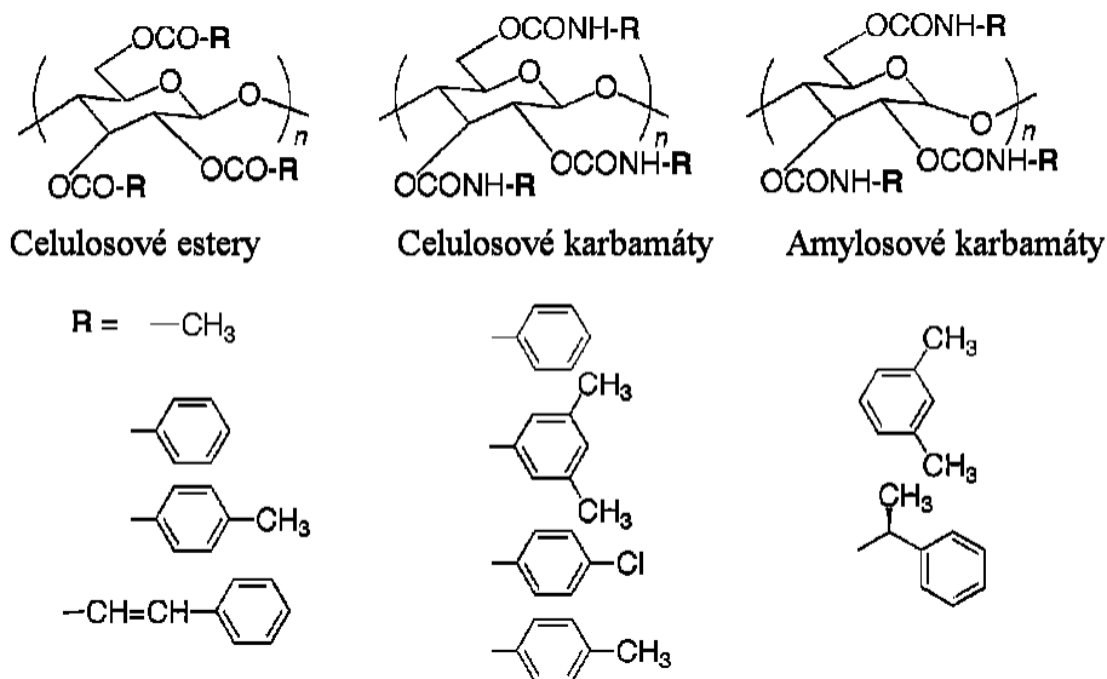
CSP Pirklova typu jsou tvořeny molekulami obsahujícími π elektronový donor (bazické), π elektronový akceptor (kyselé) nebo obě tyto skupiny. Stejně jako v případě výše zmíněných fází jsou tyto molekuly nejčastěji vázány na silikagelový nosič. Pirklovy fáze jsou charakteristické nízkou molekulovou hmotností chirálního selektoru a omezeným počtem chirálních center. K separaci dochází na základě rozdílně silné nekovalentní vazby enantiomeru k chirální části molekuly.⁶⁴



Obrázek 10: Struktura CSP založená na 3,5-dinitrobenzoylphenylglycinu (první komerčně dostupná CSP)⁶⁶

2.3.3. Polysacharidové stacionární fáze

Na trhu je dnes dostupné široké spektrum polysacharidových fází nabízející uplatnění pro neméně široký rozsah enantiomerů. Dvěma nejčastějšími typy jsou amylosové a celulosové fáze. V obou případech se jedná o přírodní polymery s asymetrickou opticky aktivní strukturou. Celulosa je tvořena 200 až 14000 jednotkami D-(+)-glukosy navzájem spojenými β -1,4-glykosidickou vazbou. Amylosa je tvořena 500 až 20000 týmiž glukosovými jednotkami vzájemně propojenými α -1,4-glykosidickou vazbou. Z důvodu nízké selektivity se však nepoužívá nativní amylosa ani celulosa. Místo toho se v praxi derivatizují a nanášejí či kovalentně navazují na silikagelový nosič. Průběžně jsou vyvíjeny nové a účinnější fáze, v současnosti nepoužívanějšími jsou však trikarbamátové a benzyl-esterové deriváty. Ukázky struktur takovýchto derivátů jsou zobrazeny níže (Obrázek 11). Kolony tohoto typu je možné používat jak v normálním, tak v reverzním separačním módu. Polysacharidovými CSPs můžeme dnes dělit racemáty agrochemikálií, léčiv i různých přírodních materiálů. Kromě výše zmíněných se můžeme setkat i s dalšími druhy polysacharidových fází jako je xylan, dextran, chitin, inulin aj.⁵³



Obrázek 11: Struktury komerčních polysacharidových CSP⁵³

Prostorové uspořádání polysacharidové fáze má dopad na její selektivitu – rigidní celulosová a šroubovicová amylosová fáze budou vykazovat různou selektivitu. Selektivitu ovlivňuje také složení MF, molekulová hmotnost polysacharidu a samozřejmě také charakter samotného analytu. Pro dobrou reprodukovatelnost by měly být polysacharidové kolony termostatovány a pracovní teplota by se měla pohybovat v rozmezí od 0 do 40°C. Ohled by měl být brán i na volbu rozpouštědel. Mobilní fáze obsahující aceton, tetrahydrofuran nebo acetonitril mohou rozpouštět pokryté (*coated*) stacionární fáze na bázi polysacharidů.^{10,50}

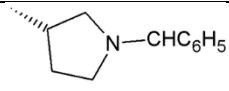
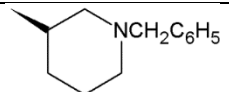
2.4. Blokátory kalciových kanálů (BKK)

V lidském organismu hraje důležitou roli koncentrační gradient vápníku vně a uvnitř buňky. Reguluje především kontrakci a relaxaci buněk hladké svaloviny cév. Při normálních podmínkách koncentrace vápníku vně buňky mnohonásobně převyšuje koncentraci uvnitř. Tento gradient je udržován kalciovými kanály přítomnými v buněčné membráně. Jsou prokázány kanály typu L (*long-lasting*), N (*neural/non-L*), P/Q („Purkyně“), R (*residual*) a T (*transient*), které se vzájemně liší hodnotami napětí a umístěním v organismu. Kanály L, N, P/Q jsou aktivovány vysokým napětím, R a T se aktivují napětím středním, resp. nízkým. Při léčbě hypertenze jsou nejvýznamnější kanály typu L, méně pak kanály typu T. Typ L (otevírající se na dlouhou dobu) se nachází především v hladké svalovině cév a myokardu (svalu srdečním). Složitá struktura tohoto kanálu se skládá z několika podjednotek označovaných jako alfa 1, alfa 2, beta, gama a delta. Nejdůležitější úlohu hraje první zmíněná alfa 1 podjednotka odpovědná za transmembránový pohyb vápníku. Alfa 1 je zároveň vazebným místem pro BKK. Ostatní podjednotky pak korigují správnou funkci kalciového kanálu. Na jednotlivých neuronech přítom může koexistovat i více typů kalciových kanálů.^{67,68}

Jako „blokátory vápníkového kanálu“ jsou označována farmaka (tzv. antagonisté vápníku), která inhibují vstup Ca^{2+} iontů do tohoto kanálu a zároveň nemají vliv na vstup nebo výstup jiných iontů, např. vstup Na^+ nebo výstup K^+ . BKK se naváží na kanál typu L, čímž sníží kontrakci příslušných svalových vláken. Pro cévní stěnu a myokard to znamená, že dojde ke snížení intenzity kontrakce a následně tím i k poklesu tlaku krve.

Tento druh léčiv lze na základě jejich struktury rozdělit na deriváty dihydropyridinu a antagonisty s nedihydropyridinovou skupinou. Dihydropyridinové blokátory jsou nenabitě, hydrofobní látky vyvolávající relaxaci cévního svalstva (tj. silný vazodilatační účinek) a prakticky neovlivňují srdeční funkce. Do této skupiny je řazen amlodipin, barnidipin, isradipin, felodipin a další „dipiny“ (Tabulka 2). Antagonisté s nedihydropyridinovou skupinou působí inhibičně nejen na svalovinu arterií, ale i na svalovinu srdeční. Do této skupiny patří verapamil, gallopamil (fenylalkylaminy, Tabulka 3) či diltiazem (benzothiazepin, Obrázek 12).^{67,69,70}

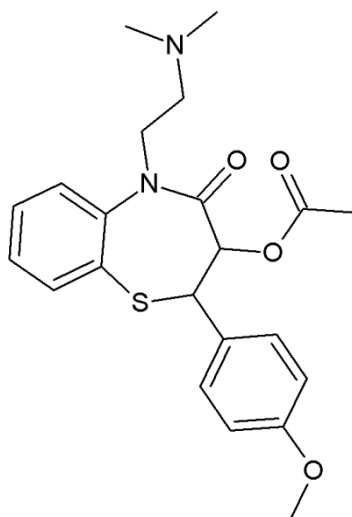
Tabulka 2: Vybrané deriváty dihydropyridinu

Název	R ₁	R ₂	R ₃	X
Amlodipin	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ NH ₂	CH ₂ CH ₃	CH ₃	2-Cl
Barnidipin	CH ₃		CH ₃	3-NO ₂
Benidipin	CH ₃		CH ₃	3-NO ₂
Cilnidipin	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₂ CH=CHC ₆ H ₅	3-NO ₂
Clevidipin	CH ₃	CH ₂ OC(=O)nC ₃ H ₇	CH ₃	2,3-diCl
Felodipin	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	2,3-diCl

Isradipin				
Manidipin	CH ₃		CH ₃	3-NO ₂
Nicardipin	CH ₃	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃)CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₃	3-NO ₂
Nifedipin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	2-NO ₂
Nilvadipin	CN	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	3-NO ₂
Nimodipin	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH(CH ₃) ₂	3-NO ₂
Nisoldipin	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	2-NO ₂
Nitrendipin	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	3-NO ₂

Tabulka 3: Vybrané fenylalkylaminy

Název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
acyanoverapamil	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	CH ₃
devapamil	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	CN	CH ₃
emopamil	H	H	H	H	H	CN	CH ₃
gallopamil	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	CN	CH ₃
norverapamil	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CN	H
verapamil	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CN	CH ₃



Obrázek 12: Struktura diltiazemu

První blokátory kalciových kanálů byly popsány v roce 1964 fyziologem Fleckensteinem⁷¹. V 70. letech byly aplikovány při léčbě anginy pectoris (onemocnění tepen, kdy nedochází k dostatečnému zásobení okysličené krve do srdečního svalu) a později v 80. letech i v léčbě arteriální hypertenze (zvýšení krevního tlaku). Nyní patří mezi jedny z nejvíce předepisovaných léků při kardiovaskulárních onemocněních. Mimo již zmíněné choroby se uplatňují i u srdečních arytmií (poruchy srdečního rytmu), plicních hypertenzí (abnormální zvýšení krevního tlaku v cévách plic), Raynaudovy nemoci (zúžení drobných cév způsobující oslabení přítoku krve do prstů) a dalších.⁷²

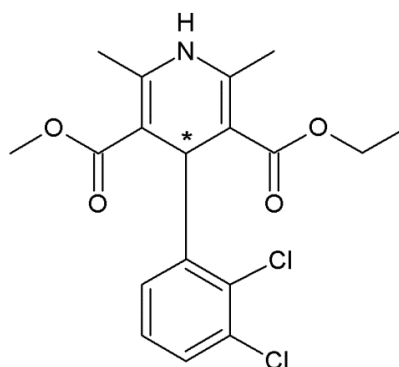
Na základě doby účinku dělíme dihydropyridiny, benzothiazepiny a fenylalkylaminy do tří hlavních generací (viz Tabulka 4). Do I. generace jsou zařazeny krátkodobě působící blokátory, které se dnes již nepoužívají. Důvodem je nutnost podávání přípravku opakovaně během dne a výskyt nežádoucích účinků (např. bolest hlavy, závrať, častější výskyt infarktu myokardu). Blokátory II. generace jsou charakteristické delší dobou účinku, čehož bylo dosaženo změnou struktury molekuly a postupnějším uvolňováním přípravků v trávicím traktu. Stačí je tedy podávat jen 1x, příp. 2x denně a jsou vhodné při léčbě hypertenze, jelikož nezvyšují riziko kardiovaskulární mortality. Nejnovější skupina, blokátory kalciového kanálu III. generace, se vyznačují vysokou lipofilitou, což jim oproti předchozím generacím umožňuje relativně pevně se navázat na lipidové buněčné struktury, z nichž se posléze pomalu uvolňují. V současnosti je vyvíjena i IV. generace antihypertenziv, která by měla nést výhody vyšší tolerance u pacientů a nižšího množství nežádoucích účinků^{67,70,73,74}.

Tabulka 4: Hlavní tři skupiny generací BKK

Struktura	I. generace	II. generace	III. generace
dihydropyridiny	nifedipin	felodipin	amlodipin
		isradipin	barnidipin
		nifedipin retard	lacidipin
		nifedipin GITS	lercanidipin
		nilvadipin	
		nimodipin	
		nisoldipin	
		nitrendipin	
benzothiazepiny	diltiazem	diltiazem retard	
fenylalkylaminy	verapamil	verapamil SR	

2.4.1. Felodipin

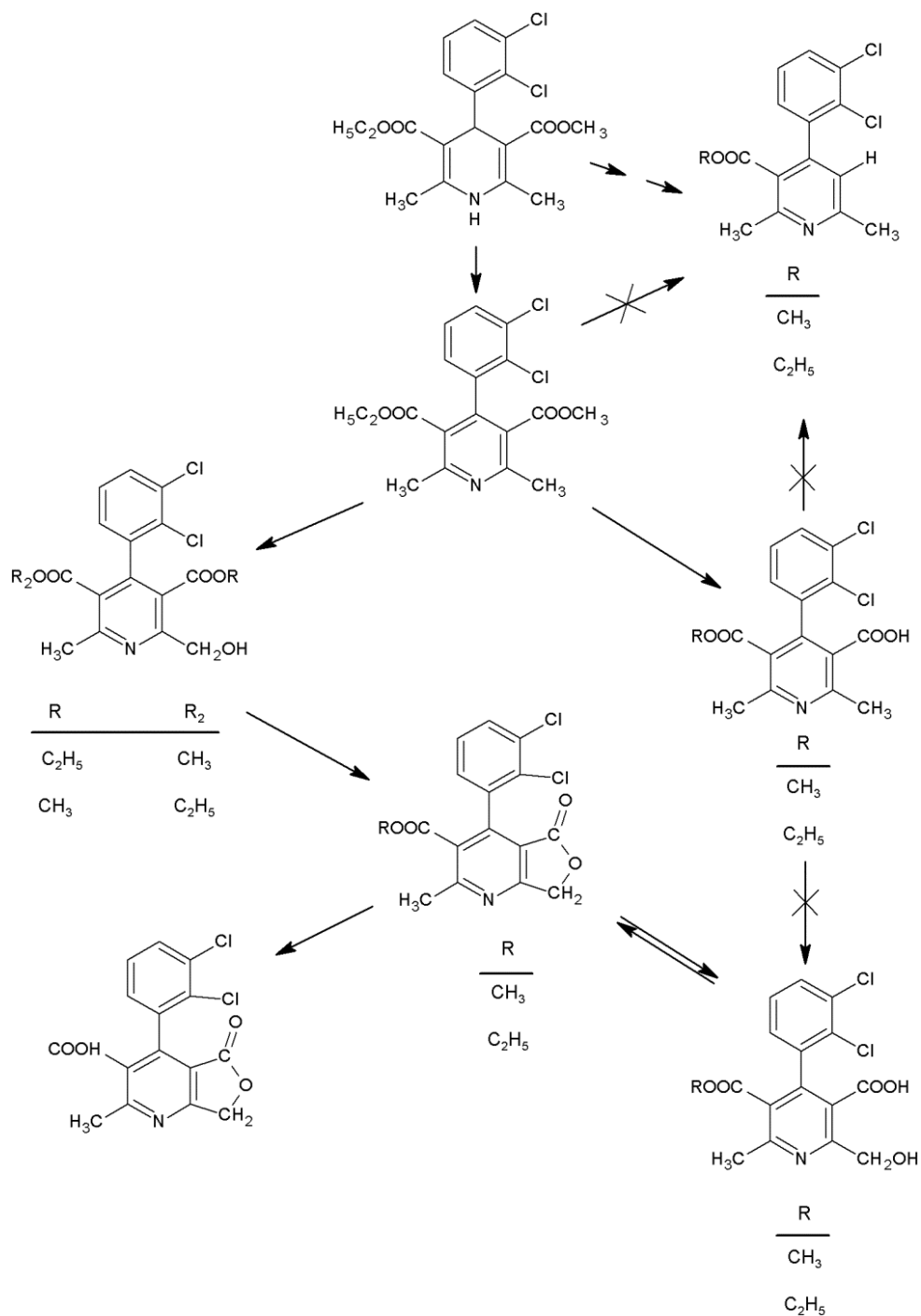
Felodipin, chemicky ethyl-methylester kyseliny 4-(2,3-dichlorfenyl)-1,4-dihydro-2,6-dimethylpyridin-3,5-dikarboxylové (Obrázek 13), je bílý až světle žlutý krystalický prášek, téměř nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu, methanolu a dichlormethanu. Jde o racemickou směs S(-) a R(+) izomeru. Ve farmakologii se zařazuje mezi dihydropyridinové (DHP) blokátory kalciového kanálu druhé generace. Dihydropyridiny jsou obecně lipofilní, proto na rozdíl od hydrofilních betablokátorů (benzothiazepiny, fenylalkylaminy) snadněji pronikají membránami (nejsou závislé na délce otevření kanálu).^{75,76}

**Obrázek 13:** Struktura felodipinu (chirální centrum označeno *)

Po perorálním podání se felodipin v tabletě s prodlouženým uvolňováním (až 24 hodin) 100% absorbuje z gastrointestinálního traktu do jater. Nicméně také zároveň dochází k jeho významné metabolizaci. Primárními metabolickými kroky jsou oxidace, esterová hydrolýza a hydroxylace (Obrázek 14). Metabolity jsou hydrofilní a farmakologicky inaktivní. Rychlost absorpce je zvýšena, pokud je lék konzumován spolu s tuky.^{77,78}

Z 99 % se felodipin váže na bílkoviny v plazmě, zejména albumin. V játrech je metabolizován cytochromem P450 3A4 (CYP3A4) a kolem 70 % z podané dávky je odstraněno ledvinami ve formě moči a zbytek stolicí. Asi 0,5% z dávky je vyloučeno ve své nezměněné formě. Přesné procento jednotlivých metabolizovaných frakcí se odvíjí od stáří pacienta a jeho zdravotního stavu. Starší pacienti mívají oproti mladším po podání léčiva koncentrace felodipinu v plazmě vyšší. Zároveň není při terapii felodipinem doporučována konzumace plodů šťávy z grapefruitu. Bylo zjištěno, že grapevový džus snižuje aktivitu CYP ve střevní stěně, což vede ke zvýšení koncentrace léku v plazmě.^{77,79}

Felodipin jakožto zástupce blokátorů kalciového kanálu zamezuje průniku Ca^{2+} iontů do prostředí buňky, čímž zamezuje jejím stahům. Důsledkem je uvolňování hladkého cévního svalstva. Postupně tak dochází k rozšíření průměru cév a tím i ke snížení tlaku krve na jejich stěny. Felodipin u pacientů při problémech s hypertenzí dlouhodobě snižuje systolický i diastolický krevní tlak. Na českém trhu existují léčivé přípravky obsahující tuto účinnou látku pod registrovanými názvy Presid, Plendil či Triasyn.⁷⁵



Obrázek 14: Struktura felodipinu a jeho metabolitů (převzato z práce ⁷⁸)

2.4.2. Využití kapalinové chromatografie pro achirální separace felodipinu

Kombinovaná terapie hypertenze podle doporučení ESH/ESC z roku 2007 (směrnice Evropské společnosti pro hypertenzi a Evropské kardiologické společnosti) vede k účinnější kontrole krevního tlaku než monoterapie⁸⁰. Tablety jsou proto mnohdy

navrhovány jako směsi dvou a více léčiv. Jednou takovou vhodnou kombinací může být např. enalapril (inhibitor enzymu angiotenzin-konvertázy) s felodipinem (blokátor kalciového kanálu). V obou případech jde o antihypertenziva, která společně navozují silnější účinek. Qin, Demarco a Ip ve své studii navrhli analytickou metodu pro separaci obou těchto aktivních látek a jejich degradačních produktů⁸¹. Použili RP-HPLC s izokratickou elucí (tj. složení mobilní fáze bylo během separace konstantní). Dobrého rozlišení všech sledovaných analytů bylo dosaženo na C-8 koloně o rozměrech 250 x 4,6 mm (teplota 40°C), s mobilní fází o složení acetonitril:KH₂PO₄ 35:65 (v/v) o pH 2 a průtokem 2,5 ml/min. Detekce probíhala s využitím UV detektoru při 215 nm. Byla sledována změna retenčního faktoru při rozdílném procentuálním zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi, resp. hodnota retenčního faktoru se snížila, pokud se zvýšil podíl acetonitrilu.

Jiná studie se také zabývala vývojem metody pro stanovení felodipinu v komerčně dostupných tabletách (konkrétně Felogard ER-10 a Plendil). HPLC stanovení bylo v tomto případě prováděno na C-18 koloně o rozměrech 250 x 4,6 mm. Jako vhodná mobilní fáze byla zvolena směs acetonitril:octan amonný 80:20 (v/v) s průtokem 1,0 ml/min. UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 236 nm⁸². Aplikace metody HPLC umožňuje stanovit felodipin v plazmě nebo krevním séru s limitem detekce až 0,1 ng/ml^{83,84}.

2.4.3. Využití kapalinové chromatografie pro chirální separace felodipinu

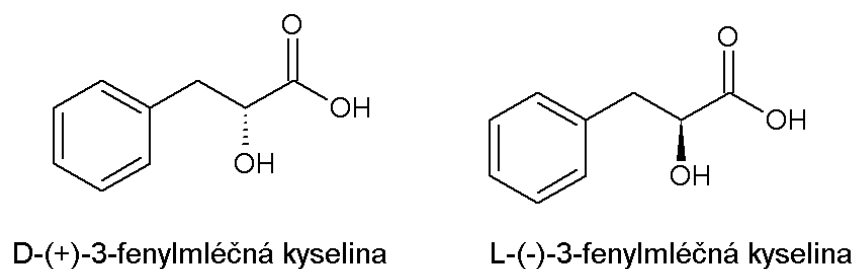
V současnosti se v širokém měřítku při rozlišení enantiomerů dihydropyridinových (DHP) kalciových antagonistů (kam mj. řadíme i felodipin) používá chirální separace (viz kapitola 2.3.1) s chirální stacionární fází (CSP). K tomuto účelu jsou využívány především polysacharidové CSP⁸⁵, u vybraných DHP antagonistů bylo však separace dosaženo i na glykoproteinovém a makrocyclickém typu stacionární fáze⁸⁶.

Wang, Zhou a kol. ukázali ve své práci, že pro enantioseparaci felodipinu na koloně Chiralpak AS-H jsou vhodné mobilní fáze tvořené směsmi diethylamin (DEA), *n*-hexan a isopropanol⁸⁷. U jiných léčiv bylo zaznamenáno, že čím více diethylaminu v rozpětí 0,1 – 0,5% bylo přidáno, tím byla dosažena lepší separace. Přídavek DEA obvykle zlepšuje selektivitu stacionární fáze, avšak větší množství zkracuje životnost kolony. Vzájemný poměr *n*-hexanu a isopropanolu je naopak oproti obsahu DEA velmi zásadní

pro enantioseparaci felodipinu. Pokles podílu isopropanolu v mobilní fázi vede k nárůstu rozlišení. Výsledky z některých měření ukazují, že i úprava teploty samotné kolony mírně ovlivňuje charakteristiky separace: studie separace felodipinu na amylosové koloně Chiralpak AS-H ukazuje, že v rozsahu teplot 18, 25 a 35°C se s rostoucí teplotou zvyšuje i rozlišení enantiomerního páru^{85,87}.

2.5. Fenymléčná kyselina

3-fenymléčná kyselina (Obrázek 15), strukturně 2-hydroxy-3-fenylpropionová kyselina, (zkr. PLA, z angl. *phenyllactic acid*) je chirální aromatickou sloučeninou, jejíž D- forma je převážně produkována bakteriálně, zatímco L- forma vzniká endogenně (v organismu). Ve vysokých koncentracích se vyskytuje u lidí trpících fenylketonurií, příp. hyperfenylalaninemií. V obou případech se jedná o vrozené metabolické poruchy, kdy organizmus postrádá klíčový enzym fenylalaninhydroxylázu (fenylketonurie) nebo tento enzym není dostatečně aktivní (hyperfenylalaninémie). Jestliže u postiženého nedochází pomocí fenylalaninhydroxylázy k přeměně fenylalaninu, esenciální aminokyseliny, na tyrosin, hromadí se tato aminokyselina v tělních tekutinách (krvi a moči). Fenylalanin se z krve následně začne odbourávat náhradní cestou na abnormální metabolické produkty – fenylactovou, fenylpyrohroznovou a i zmiňovanou fenymléčnou kyselinu. Vzniklé produkty společně s fenylalaninem pronikají do mozkové tkáně, kde poškozují nervové buňky. Pokud není tento stav léčen už od narození, dochází k opoždění vývoje celého organismu. Od počátečních nevolností (zvracení), přes kožní problémy (bledá pleť) přechází postižený až k mentální retardaci. K léčbě fenylketonurie se dnes doporučuje nízkobílkovinná dieta obnášející vyloučení masa, mléčných výrobků (včetně mateřského mléka), luštěnin, ořechů a obilovin. Strava je založena hlavně na konzumaci zeleniny, ovoce, tuků a dalších nízkobílkovinných potravin. Na trhu jsou k dostání i speciální přípravky pro zvláštní výživu, které avšak neslouží jako plnohodnotná strava.^{88–90}



Obrázek 15: Chirální izomery kyseliny fenylmléčné

PLA byla nalezena i v rostlinách a květových medech jako je např. vřes obecný⁹¹ nebo manuka med (med sbíraný z rostliny zvané balmín metlatý neboli manuka)⁹². Také je produkována fermentací nebo biotransformací v některých bakteriích a houbách. Vzhledem ke své hydrofilní povaze se snadno rozpouští v jídle a krmivech. Vzhledem k tomu, že PLA působí také jako fungicid a zpomaluje růst plísní, nabízí se možnost použít tuto kyselinu jako biokonzervant a prodloužit tak trvanlivost potravin. Kyselinu fenylmléčnou nicméně není, coby konzervační činidlo, dovoleno přidávat přímo do potravin z důvodu její toxicity.^{4,90}

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Instrumentální vybavení

Chirální separace felodipinu byla provedena na kapalinovém chromatografu firmy Knauer řady Smartline (Knauer, Berlín, Německo) vybaveným moduly: Smartline Pump 1000, Smartline Manager 5000 a Smartline UV Detector 2600. K určení optické otáčivosti byl použit chirální detektor CHIRALYSER-MP (IBZ Messtechnik GmbH, Springe, Německo). Naměřená data byla vyhodnocena s využitím softwaru Clarity (DataApex, Praha, ČR). Z naměřených dat byly Grubbsovým testem vyřazeny odlehle body.

3.2. Použité chemikálie

Racemát felodipinu (≥ 99 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), D-(+)-3-fenylmléčná (99 %, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švýcarsko) a L-(-)-3-fenylmléčná kyselina (97 %, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švýcarsko), acetonitril (HPLC – supergradient, VWR chemicals, Fontenay-sous-Bois, Francie), methanol (HPLC – supergradient, VWR chemicals, Fontenay-sous-Bois, Francie), ethanol (HPLC grade, Fisher Scientific, Loughborough, UK), hexan (99,49 %, Lachner, Neratovice, ČR), isopropanol (99,7 %, Lachner, Neratovice ČR), n-propanol (99,5 %, Lachner, Neratovice ČR). Deionizovaná voda byla vyráběna systémem na úpravu vody Millipore Direct Q UV (Millipore S.A.S., Molsheim, Francie). Demineralizovaná voda byla vyráběna pomocí zařízení AQUAL 29 (AQUAL s.r.o, Lelekovice, ČR).

3.3. Chromatografické analýzy

Separace racemátu felodipinu byla provedena na chirální koloně Lux Cellulose-3, 250 x 10 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$, (Phenomenex, Torrance, USA) s využitím mobilní fáze o složení isopropanol:hexan 1:20 (v/v). Detekční vlnová délka byla nastavena na 254 nm. Koncentrace roztoku vzorku použitého pro semipreparativní separaci byla 2000 mg/l. Průtok byl nastaven na 8 ml/min. Byl použit nástřík přeplněním smyčky o objemu 1000 μl . Jednotlivé frakce byly sbírány ručně a odpařeny do sucha pod proudem dusíku. Obě čisté

frakce felodipinu (označené jako FELO1 a FELO2) byly rozpuštěny v methanolu, čímž byly získány základní roztoky o koncentraci 2500 mg/l pro následnou přípravu roztoků.

Pro určení čistoty získaných frakcí byly oba enantiomery zkontrolovány chirální separací v analytickém módu s využitím kolony Lux Cellulose-3, 250 x 4,6 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$, (Phenomenex, Torrance, USA). Mobilní fázi tvořila směs isopropanol:hexan 1:10 (v/v). Detekční vlnová délka byla rovněž 254 nm. Byl použit nástřik přeplněním smyčky o objemu 20 μl . Průtok byl nastaven na 1 ml/min.

3.4. Měření optické otáčivosti

Stanovení optické otáčivosti felodipinu a kyseliny fenylmléčné bylo provedeno ve flow-injection módu (FIA), při kterém nebyla do systému připojena kolona. Kapilára vystupující z dávkovacího ventilu byla přes spojku připojena přímo k UV detektoru, který byl dále připojen k polarimetrickému detektoru. Vlnová délka byla ponechána na 254 nm, průtok mobilní fáze byl upraven na 1 ml/min. Jednotlivé enantiomery byly rozpuštěny v příslušném rozpouštědle a byly připraveny roztoky v koncentračním rozmezí 50-1000 mg/l. Jako „mobilní fáze“ (nosná média) byla použita tato rozpouštědla: acetonitril (ACN), ethanol (EtOH), voda, hexan, isopropanol (i-PrOH), methanol (MeOH) a n-propanol (n-PrOH). Vzhledem k omezené rozpustnosti analytů v některých rozpouštědlech byly místo nich použity směsi s EtOH, který zvyšuje jejich rozpustnost (Tabulka 5).

Při měření optické otáčivosti byl polarimetrický detektor CHIRALYSER-MP nastaven na nejvyšší citlivost („range limit“ = 4.0 mdeg. / 1000 mV). Základní linie byla ponechána v defaultním nastavení („base offset“ = 500.0 mV). U všech analýz byl použit nástřik přeplněním smyčky o objemu 20 μl . CHIRALYSER-MP byl sériově zapojen za UV/VIS detektor. Roztoky felodipinu byly vždy nástřikovány při průtoku 1 ml/min v pěti opakováních každé použité koncentrační hladiny. Po každém nástřiku analytu byl nástřikován blank (tj. mobilní fáze používaná jako rozpouštědlo).

3.5. Kvantově-chemické výpočty

Struktury jednotlivých konformerů enantiomerů felodipinu a kyseliny fenylmléčné byly vyhledávány pomocí nástroje pro generování konformerů v programu HyperChem (Company Profile of Hypercube, Inc., Gainesville, Florida, USA) s využitím „předoptimalizace“ v programu Avogadro (GNU General Public License) pomocí metody molekulové mechaniky MM+ (konkrétně force fieldu MMFF94). Následné kvantově-chemické výpočty byly prováděny v programu Gaussian 09 (Gaussian, Inc., Wallingford, USA).

V první fázi byly optimalizovány geometrie struktury všech konformerů pomocí DFT s užitím funkcionálu B3LYP a báze 6-31G*. Součástí výpočtů byla simulace solvatace konformerů pomocí implicitního PCM solvatačního modelu (uvažována byla následující rozpouštědla: acetonitril, ethanol, voda, hexan a methanol). Cílem optimalizace geometrie bylo nalezení prostorového uspořádání atomů v konformerech a srovnání energií jednotlivých generovaných struktur.

V druhé fázi byly ze sady optimalizovaných konformerů odstraněny duplicitní struktury a pro získané unikátní konformery byly vypočítány hodnoty jejich specifických optických otáčivostí v pěti výše uvedených rozpouštědlech. Výpočet optické otáčivosti proběhl s použitím B3LYP funkcionálu a aug-cc-pVDZ báze (v literatuře popsána jako vhodná pro výpočty optické otáčivosti⁹³), rozpouštědlo bylo opět simulováno PCM modelem. Velké bazové sety jako aug-cc-pDVZ a aug-cc-pVTZ obsahující difuzní funkce poskytují, oproti menším bazovým setům jako je 6-31G*, lepší výsledky ve výpočtech optické otáčivosti.

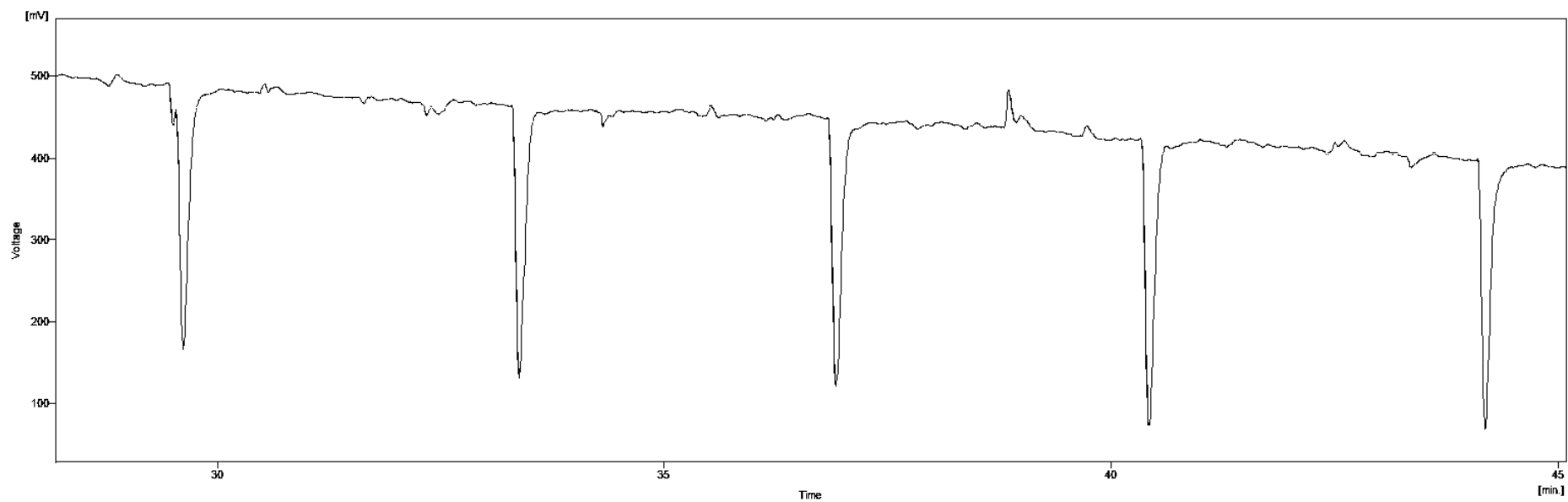
Vzhledem k množství dat a informací, které bylo potřeba ze zpracovávaných výstupních souborů extrahovat, byly v rámci řešení diplomové práce pro automatizaci některých úkonů vytvořeny skripty v jazyce PHP (např. vyhledávání klíčových hodnot ve výstupních souborech, automatické vyplňování hlaviček výstupních souborů, porovnávání geometrie jednotlivých konformerů atd.). Používané skripty jsou uvedeny v přílohách.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

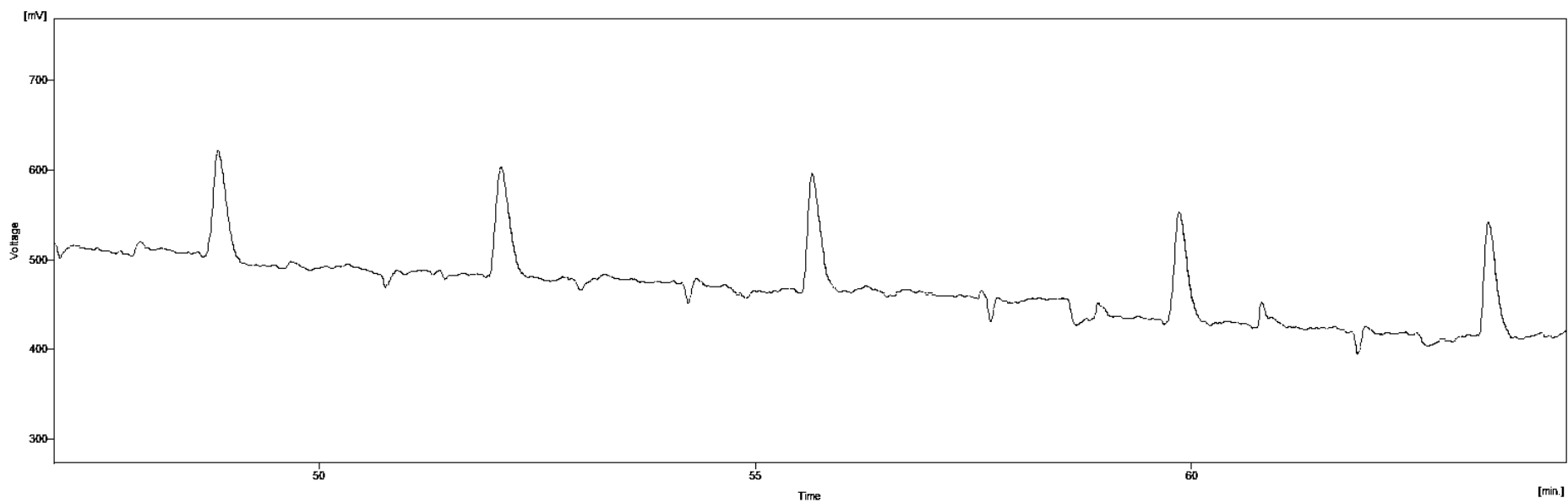
Cílem této práce bylo sledování vlivu rozpouštědla na optickou otáčivost analytu. Zkoumanými analyty byly kyselina fenylmléčná a felodipin. Jedná se o látky chirální, přičemž každá poskytuje dva enantiomery. Při měření optické otáčivosti polarimetrickým detektorem s průtočnou celou se studoval vliv sedmi rozpouštědel. Měření v průtokovém systému bylo voleno proto, aby získané výsledky byly převoditelné do reálného chromatografického experimentu. Průtokové uspořádání experimentu s pulzním dávkováním roztoků studovaných enantiomerů umožňuje práci s výrazně nižší spotřebou vzorků ve srovnání s přímou infuzí vzorků nebo dokonce se klasickým (statickým) polarimetrickým měřením s komerčně dostupnými polarimetry. Vedle toho byla optická otáčivost zjišťována i „mimo laboratoř“ pomocí postupů výpočetní chemie. Při výpočtech byl studován efekt pěti rozpouštědel na optickou otáčivost. Postup práce, vyhodnocení dat a porovnání experimentálních výsledků s vypočtenými jsou předmětem následujících kapitol.

4.1. Měření optické otáčivosti enantiomerů kyseliny fenylmléčné

Enantiomery kyseliny fenylmléčné byly pro experimentální práci komerčně dostupné v dostatečné čistotě. Pro další popis je D-(+)-3-fenylmléčná kyselina označována zkratkou D(+)-PLA a L-(-)-3-fenylmléčná kyselina zkratkou L(-)-PLA. Byla experimentálně provedena zkouška rozpustnosti enantiomerů PLA ve všech sedmi rozpouštědlech. Byla pozorována dobrá rozpustnost ve všech rozpouštědlech s výjimkou hexanu. Pro studium vlivu hexanu na optickou otáčivost bylo tedy třeba použít přídavku ethanolu. Složení jednotlivých mobilních fází je uvedeno v Tabulce 5. Základní roztoky byly připraveny rozpuštěním příslušného enantiomeru v methanolu na koncentraci 2500 mg/l. Z těchto roztoků bylo pro každé použité rozpouštědlo (příp. směs) připraveno pět kalibračních bodů (o koncentraci 50, 100, 250, 500 a 1000 mg/l). Každá koncentrační úroveň byla měřena 5x (viz Obrázek 16 a Obrázek 17), přičemž mezi nástřiky vzorku byl měřen i blank (totožný s použitou mobilní fází). Koncentrace byly zvoleny v tomto koncentračním rozmezí, jelikož při nižších koncentracích se signál analytu dostal pod limit detekce a při vyšších koncentracích nastával problém s rozpustností analytu.



Obrázek 16: Optická otáčivost L(-)PLA v ethanolu

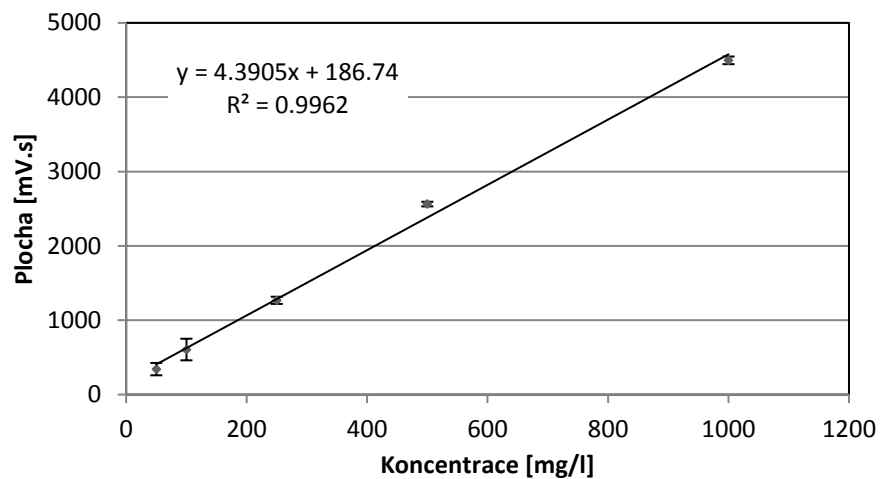


Obrázek 17: Optická otáčivost D(+)PLA v ethanolu

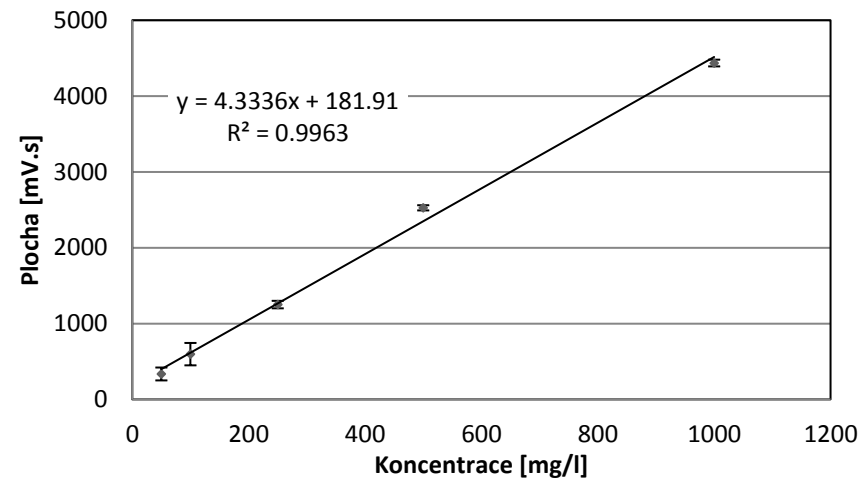
Tabulka 5: Složení mobilních fází pro analýzu felodipinu a kyseliny fenylmléčné

kyselina fenylmléčná	felodipin
ACN	ACN
EtOH	EtOH
H ₂ O	EtOH:H ₂ O 11:9 (v/v)
hexan:EtOH 19:1 (v/v)	hexan:EtOH 19:1 (v/v)
i-PrOH	i-PrOH
MeOH	MeOH
n-PrOH	n-PrOH

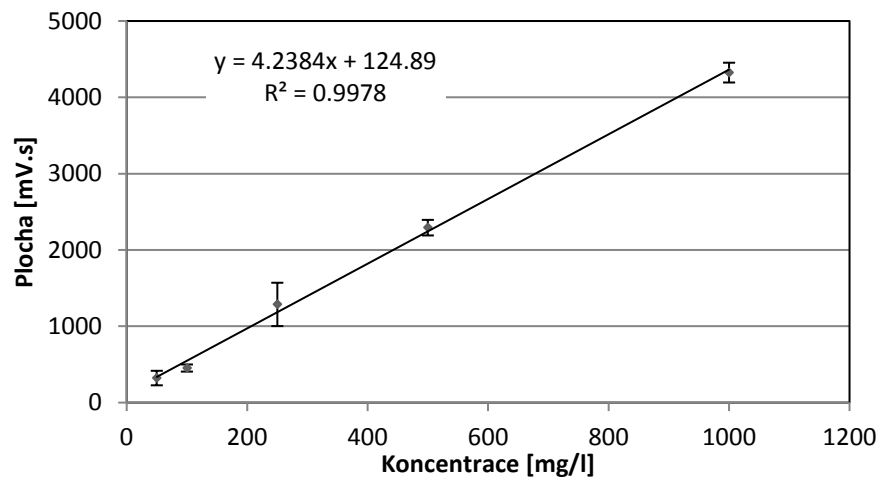
V programu Clarity byly integrovány jak plochy analytu, tak plochy blanku. Měření slepého vzorku (blanku) umožňuje odhadnout (neselektivní) příspěvek měřicího systému k signálu. Signál (pík) slepého pokusu umožnil odhadnout limit detekce použité metody. Data byla testována na odlehlé body (viz. Experimentální část) a z ošetřených dat byl vytvořen graf závislosti plochy píku na koncentraci kyseliny fenylmléčné. Pro každý enantiomer a rozpouštědlo byly vytvořeny vždy dvě sady dat, přičemž v jedné byl signál analytu korigován na blank a ve druhé ne. Korekce spočívala v odečtení zprůměrované hodnoty ploch signálu blanků nastříkovaných bezprostředně před a po daném vzorku od signálu tohoto vzorku. Hodnoty pohybující se v oblasti limitu detekce (signál analytu se blížil signálu slepého pokusu) byly ze zpracování dat vyloučeny. Z vyhovujících bodů byly sestrojeny grafy kalibračních přímek (viz Obrázky 18 - 25 a příloha 7.1). Nejvyšší směrnice kalibrační přímky (tzn. citlivost) byla zjištěna pro vodu a nejnižší pro isopropanol. V příloze 7.3 jsou pro jednotlivá rozpouštědla rovněž uvedeny grafy popisující změny signálu blanku v průběhu sekvenčního měření. Souhrnné porovnání citlivostí metody při použití různých rozpouštědel ukazuje Tabulka 6. Použité mobilní fáze jsou seřazeny podle rostoucí polarity.



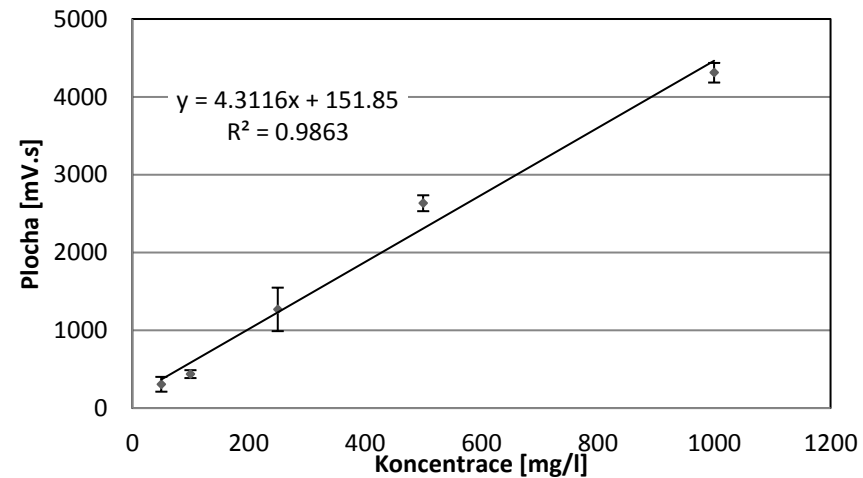
Obrázek 18: Závislost plochy na koncentraci D(+)-PLA v H₂O



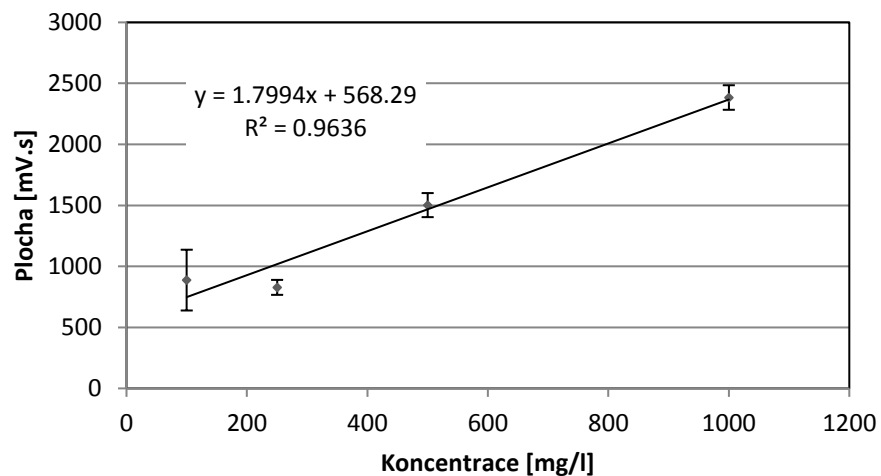
Obrázek 19: Závislost plochy na koncentraci D(+)-PLA v H₂O po odečtu signálu blanku



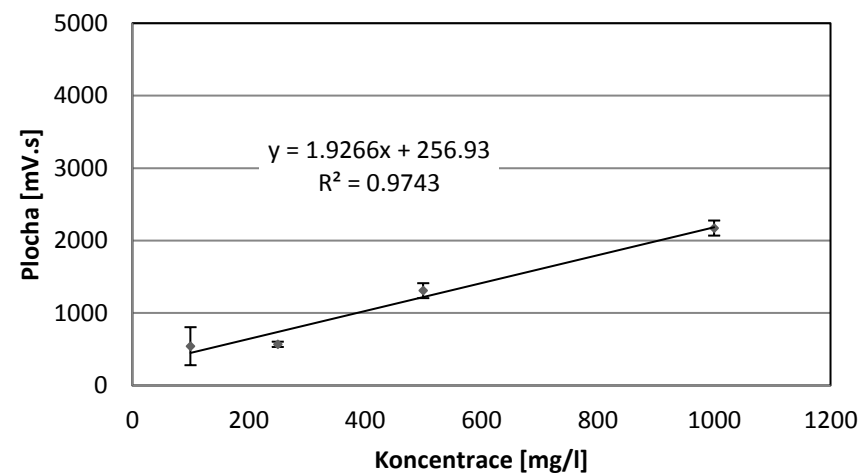
Obrázek 20: Závislost plochy na koncentraci L(+)-PLA v H₂O



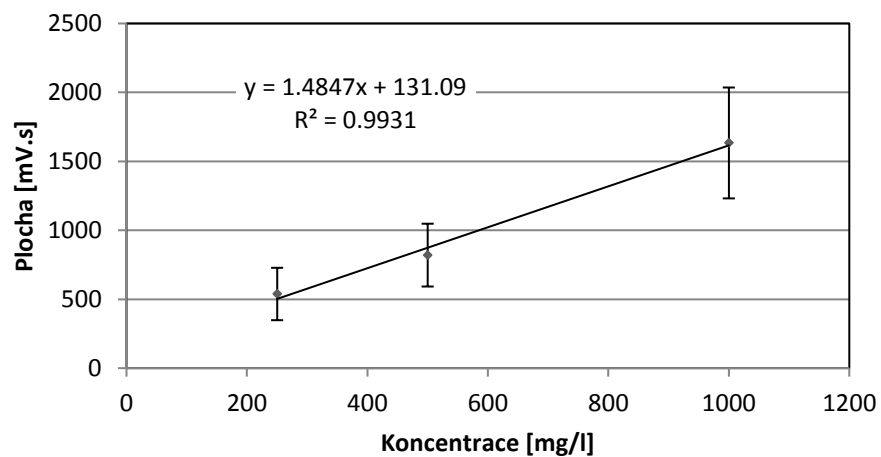
Obrázek 21: Závislost plochy na koncentraci L(+)-PLA v H₂O po odečtu signálu blanku



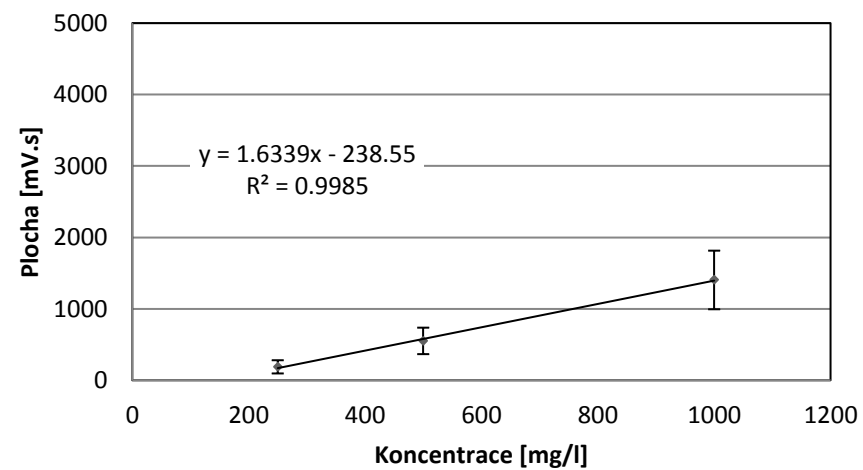
Obrázek 22: Závislost plochy na koncentraci D(+)-PLA v i-PrOH



Obrázek 23: Závislost plochy na koncentraci D(+)-PLA v i-PrOH po odečtu signálu blanku



Obrázek 24: Závislost plochy na koncentraci L(-)-PLA v i-PrOH



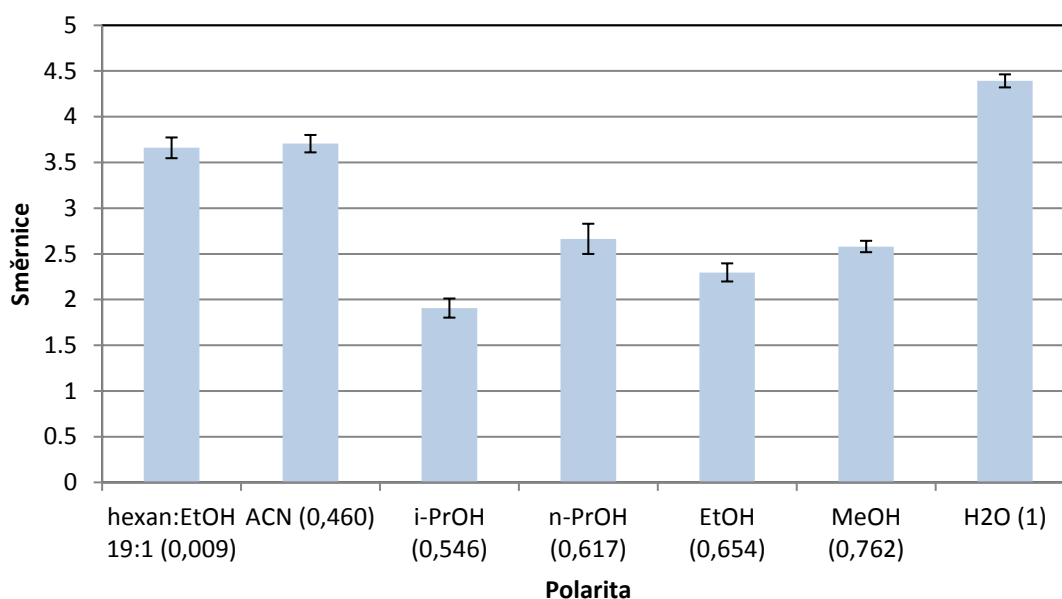
Obrázek 25: Závislost plochy na koncentraci L(-)-PLA v i-PrOH po odečtu signálu blanku

Tabulka 6: Směrnice rovnic regrese kyseliny fenylmléčné bez odečtu a s odečtem signálu blanku

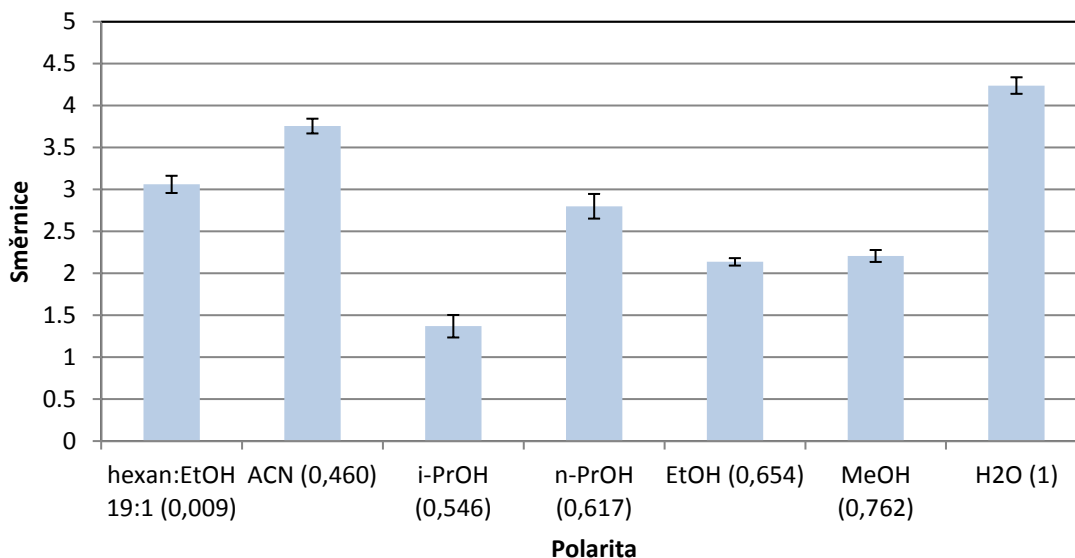
Rozpouštědlo	Relativní polarita ⁹⁴	D(+)-PLA	D(+)-PLA po odečtu blanku	L(-)-PLA	L(-)-PLA po odečtu blanku
hexan:EtOH (19:1)	0,009*	3,846	3,7293	3,0324	3,168
ACN	0,460	3,6909	3,6899	3,7562	3,7502
i-PrOH	0,546	1,7994	1,9266	1,4847	1,6339
n-PrOH	0,617	2,5579	2,6559	2,7424	2,7262
EtOH	0,654	2,3200	2,1916	2,1335	2,2252
MeOH	0,762	2,5806	2,6509	2,2072	2,3278
H ₂ O	1	4,3905	4,3336	4,2384	4,3116

* uvedena je relativní polarita hexanu (relativní polarita směsi není známa)

Bez odečtu blanku i s jeho odečtem se směrnice přímek výrazně nemění. Signál slepého pokusu tedy nemá pro kyselinu fenylmléčnou velký vliv na citlivost měření. Odečet blanku je zejména významný při porovnání citlivosti metody pro stejný analyt a dvě různá rozpouštědla – v takovém případě je možné očekávat jinou odezvu měřícího systému pro každou samotnou mobilní fázi. Z hlediska polarity (Obrázek 26 a Obrázek 27) můžeme u směrníc (citlivostí) měření v řadě alkoholů i-PrOH – EtOH – MeOH a vodě pozorovat určitý trend zvyšování citlivosti s rostoucí polaritou. Měření n-propanolu je z tohoto trendu odchýleno. Měření v acetonitrilu a hexanu ukazují, že tato rozpouštědla se chovají zcela mimo tento trend.



Obrázek 26: Porovnání směrníc regrese D(+)-PLA na vzrůstající polaritě rozpouštědla (v závorkách uvedena relativní polarita)



Obrázek 27: Porovnání směrnic regrese L(-)PLA na vzrůstající polaritě rozpouštědla (v závorkách uvedena relativní polarita)

Směrnice byly testovány vztahem pro odhad koeficientů regresní přímky z literatury⁹⁵. Z grafů vyplývá, že nejvyšší citlivost poskytují analýzy měřené ve vodě a acetonitrilu. Rozdíly jsou statisticky významné a získané výsledky mohou být tedy brány v úvahu při optimalizaci metody pro chromatografickou analýzu kyseliny mléčné a strukturně blízkých analytů.

4.2. Separace racemátu felodipinu

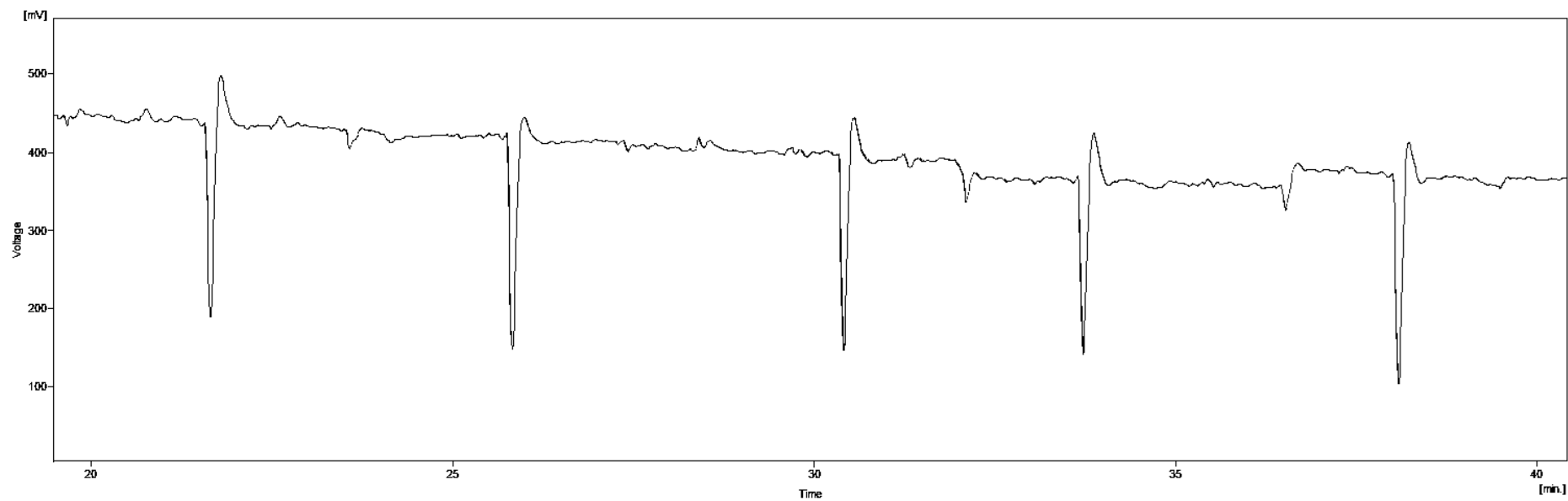
Prvním krokem v analýze jednotlivých enantiomerů felodipinu byla jejich separace z komerčně dostupné racemické směsi. Separace byla testována na kolonách Lux Cellulose-1 a Lux Cellulose-3, obě o rozměrech 250 x 4,6 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$. Vzhledem k nutnosti další práce s izolovanými enantiomery, byla pro separaci uvažována pouze čistá rozpouštědla (tj. bez aditiv), příp. jejich směsi. Jako optimální byly vyhodnoceny podmínky uvedené v experimentální části v kapitole 3.3: směs i-PrOH:hexan 1:20 jako mobilní fáze (v/v) a průtok mobilní fáze 8 ml/min. Racemát felodipinu byl rozpuštěn v mobilní fázi na koncentraci 2000 mg/l. Ručně sbírané frakce felodipinu byly označeny dle pořadí eluce za výše uvedených podmínek jako FELO1 a FELO2. Vzhledem k celkové délce analýzy 40 minut a nástřiku 1 ml racemátu o koncentraci 2000 mg/l bylo možné

získat 1,44 mg každého z enantiomerů za hodinu (bez uvažování následného odpařování mobilní fáze) s enantiomerní čistotou 96%.

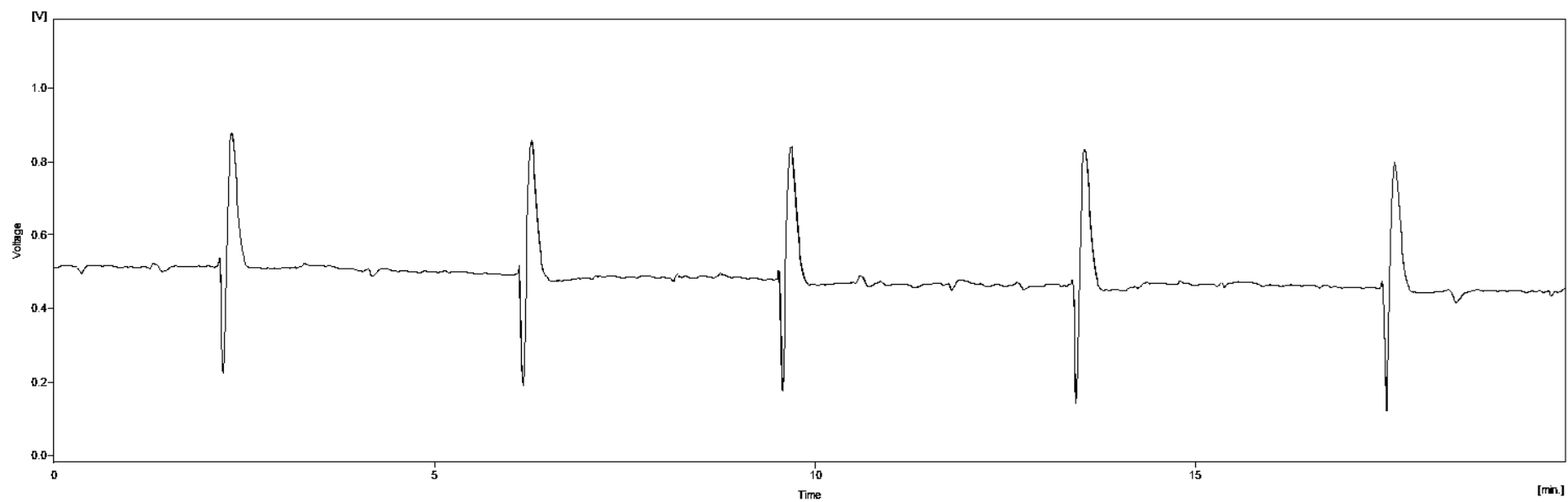
4.3. Měření optické otáčivosti enantiomerů felodipinu

Z hlediska polarity a způsobu přípravy mobilní fáze v praxi bylo pro studii felodipinu zvoleno následujících 7 rozpouštědel: ACN, EtOH, MeOH, hexan, voda, i-PrOH a n-PrOH. Jedna měřená řada obsahovala 5 bodů o koncentracích enantiomerů 50, 100, 250, 500 a 1000 mg/l. Vzhledem k malé rozpustnosti felodipinu ve vodě a hexanu byl vliv těchto rozpouštědel studován v jejich směsích s ethanolem (Tabulka 5).

Experimentálně bylo u obou izolovaných enantiomerů felodipinu zjištěno znaménko optické otáčivosti a následně s využitím studie C. Vijitha a kol.⁹⁶ i absolutní konfigurace těchto enantiomerů (Obrázek 28 a Obrázek 29).



Obrázek 28: Optická otáčivost S-(-)-felodipinu (FEL02) v ethanolu



Obrázek 29: Optická otáčivost R-(+)-felodipinu (FEL01) v ethanolu

I při nastavení nejvyšší citlivosti detektoru nebylo u felodipinu možné proměřit koncentrace 50 a 100 mg/l ani u jednoho z rozpouštědel. Z důvodu špatné rozpustnosti ve vodě nebylo navíc možné připravit vzorek o koncentraci 1000 mg/l v tomto rozpouštědle. Pro rozpouštědla s malým počtem kalibračních bodů byly proto změřeny také vzorky enantiomerů felodipinu o koncentraci 750 mg/l.

Následně byla provedena integrace ploch signálu felodipinu i blanku v softwaru Clarity. Získaná data byla podrobena testu na odlehlé body (Grubbsův test). Pokud se tímto potvrdila přítomnost odlehlého bodu, nebyla daná hodnota do dalšího zpracování dat zahrnuta. Z takto ošetřených dat byl vytvořen graf závislosti plochy píku na koncentraci felodipinu. Pro každý enantiomer a rozpouštědlo byly podobně jako ve studii enantiomerů kyseliny fenylmléčné vytvořeny vždy dvě sady dat, přičemž v jedné byl signál analytu korigován na blank a ve druhé ne. Korekce spočívala v odečtení zprůměrované hodnoty ploch signálu blanků nastříkovaných bezprostředně před a po daném vzorku od signálu tohoto vzorku. V některých případech tento postup vedl k vyloučení daného bodu a nebylo tak možné sestavit kalibrační přímky (konkrétně u ACN, hexan:EtOH (19:1) a MeOH), proto nejsou zahrnuty v příslušných tabulkách a grafech. Pro ostatní případy byla data vyhodnocena formou kalibračních přímek, vyobrazených na Obrázku 30 a Obrázku 31. Hodnoty směrnic kalibračních přímek jsou shrnuty v Tabulce 7.

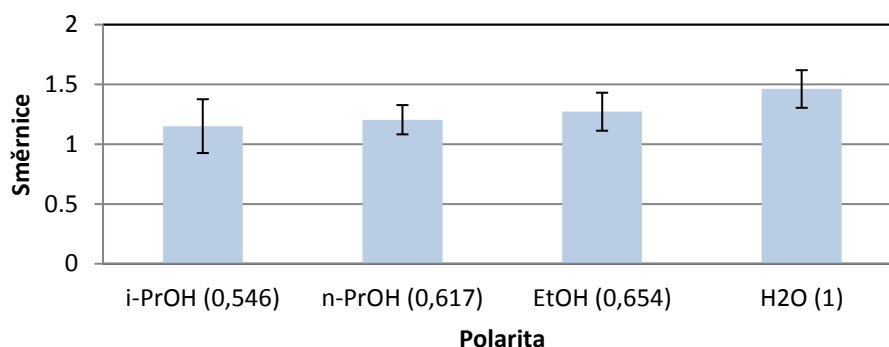
Tabulka 7: Směrnice rovnic regrese felodipinu bez odečtu a s odečtem signálu blanku

Rozpouštědlo	Relativní polarita ⁹⁴	S-(-)-felodipin	S-(-)-felodipin po odečtu blanku	R-(+)-felodipin	R-(+)-felodipin po odečtu blanku
i-PrOH	0,546	1,1747	1,2734	1,2309	1,2109
n-PrOH	0,617	1,2046	1,1855	0,9979	1,0767
EtOH	0,654	1,2746	1,5634	2,9616	3,377
EtOH:H ₂ O (11:9)	1*	1,4637	1,4266	1,3418	1,4497

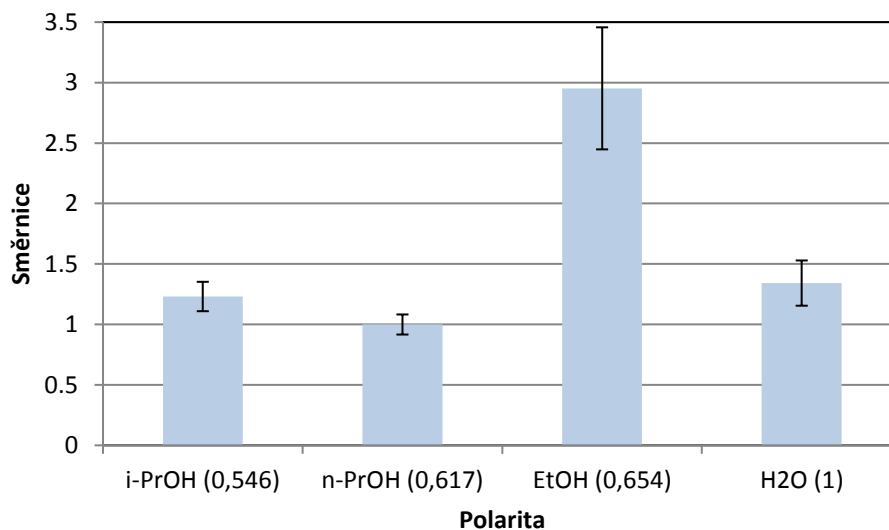
* je uvedena relativní polarita vody (relativní polarita směsi rozpouštědel není známa)

Koeficienty rovnic regrese byly testovány pomocí statistických vztahů (pouze data pro enantiomery felodipinu bez odečtu blanku). U S-(-)-felodipinu můžeme pozorovat citlivější odezvu při vyšší polaritě rozpouštědla (Obrázek 30). U R-(+)-felodipinu do tohoto trendu nezapadá ethanol (Obrázek 31). Z porovnání měření optické otáčivosti

pro kyselinu fenylmléčnou a felodipin se jeví jako vhodná úprava pro zvýšení odezvy detektoru optické otáčivosti obohacení mobilní fáze vodnou složkou. Vhodnost jednotlivých organických rozpouštědel je pak pro jednotlivé analyty různá (přestože v rámci dvojice konformerů pozorujeme vždy stejnou změnu pro (+) i (-) enantiomer). Vliv použitého rozpouštědla na citlivost detektoru je však významný (experimentálně byl pozorován až trojnásobný nárůst směrnice kalibrační přímky).



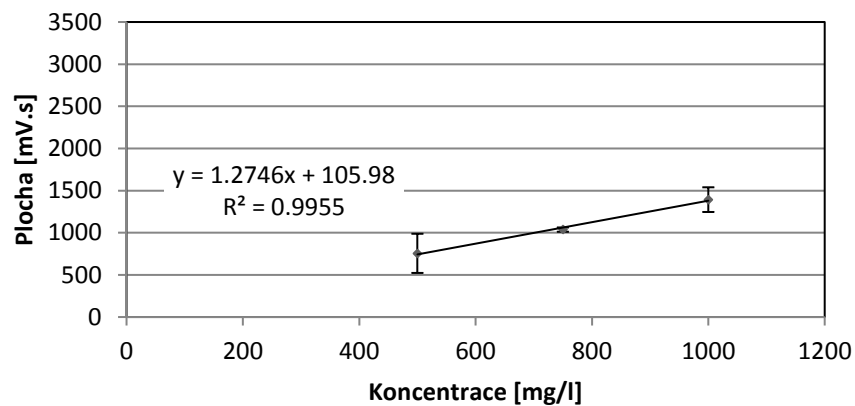
Obrázek 30: Porovnání směrnic regrese S-(-)-felodipinu na vzrůstající polaritě rozpouštědla (v závorkách uvedena relativní polarita)



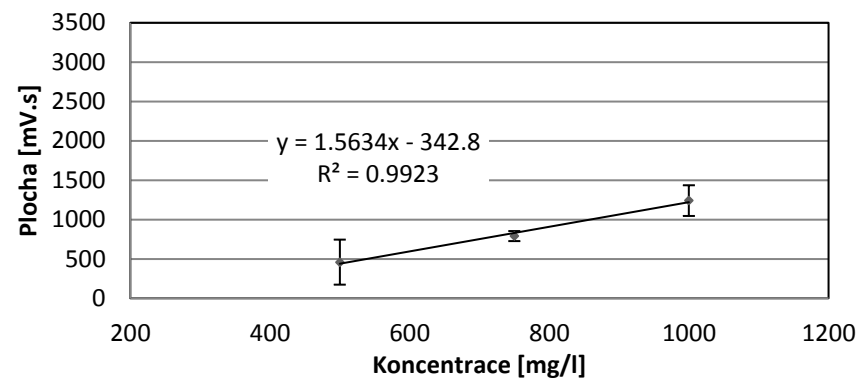
Obrázek 31: Porovnání směrnic regrese R-(+)-felodipinu na vzrůstající polaritě rozpouštědla (v závorkách uvedena relativní polarita)

Všeobecně tedy, vyšších citlivostí je dosahováno při použití rozpouštědel s vyšší polaritou (voda a EtOH oproti i-PrOH a n-PrOH). U R-(+)-enantiomeru je směrnice

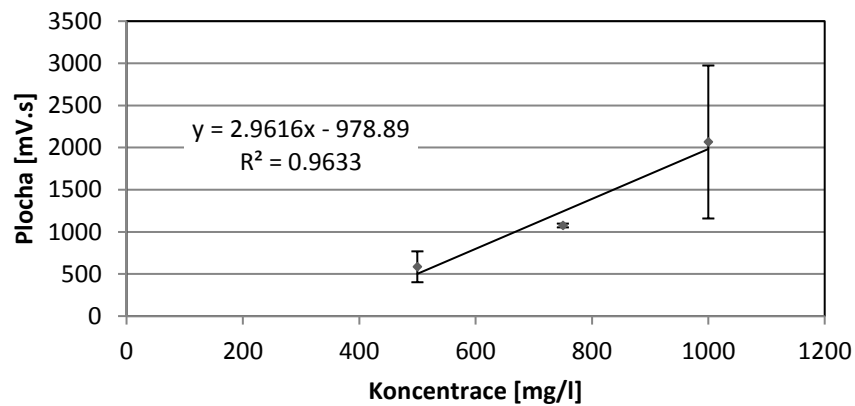
významně nejvyšší při použití EtOH. Hodnota směrnice je však zatížena větší směrodatnou odchylkou u nejvyšší měřené koncentrace. Současně, při použití EtOH je dosaženo horších limitů detekce (viz Obrázky 34 - 35). Dále byla testována citlivost měření při použití směsi EtOH:H₂O (11:9) (viz Obrázek 36 - 39). Zde bylo dosaženo zlepšení limitu detekce i koeficientu determinace (kalibrační závislost vykazuje lepší linearitu). I v případě felodipinu je tedy pozorován příznivý vliv vody na měření polarimetrickým detektorem. Kompletní seznam všech grafů závislostí plochy na koncentraci felodipinu lze nalézt v příloze 7.2. V příloze 7.4 jsou také znázorněny výkyvy signálu blanku pro jednotlivá rozpouštědla.



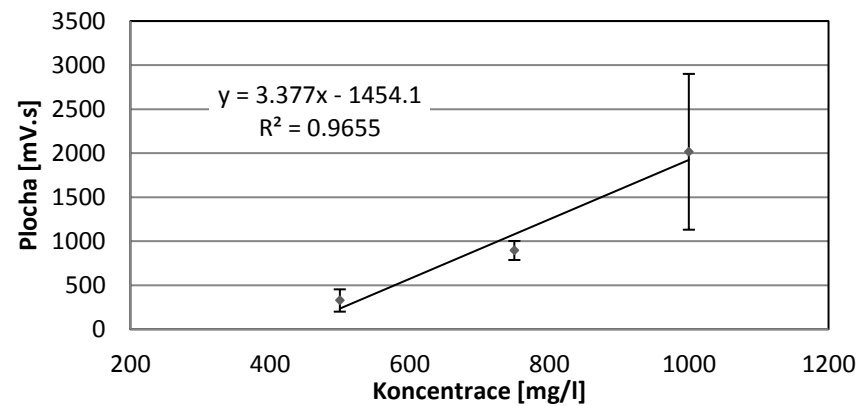
Obrázek 32: Závislost plochy na koncentraci S-(-)-felodipinu v EtOH



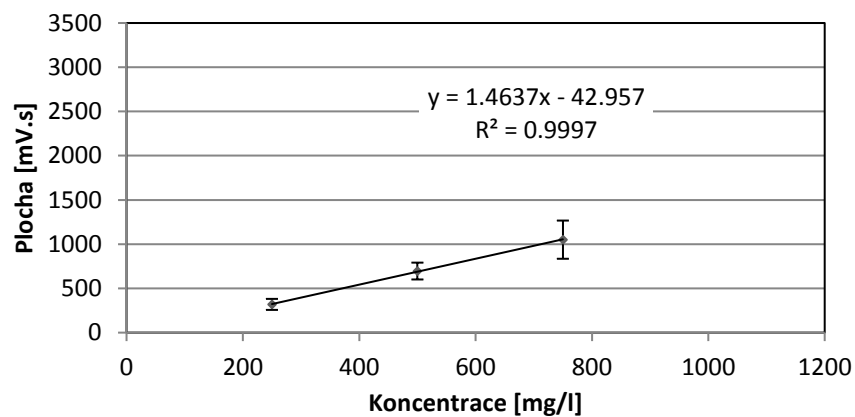
Obrázek 33: Závislost plochy na koncentraci S-(-)-felodipinu v EtOH po odečtu signálu blanku



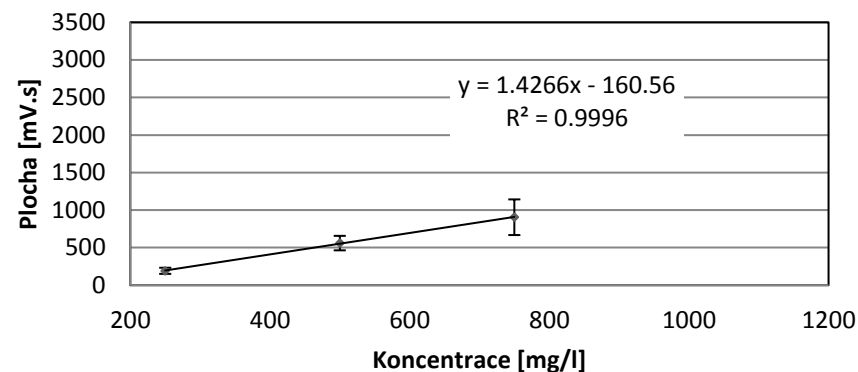
Obrázek 34: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v EtOH



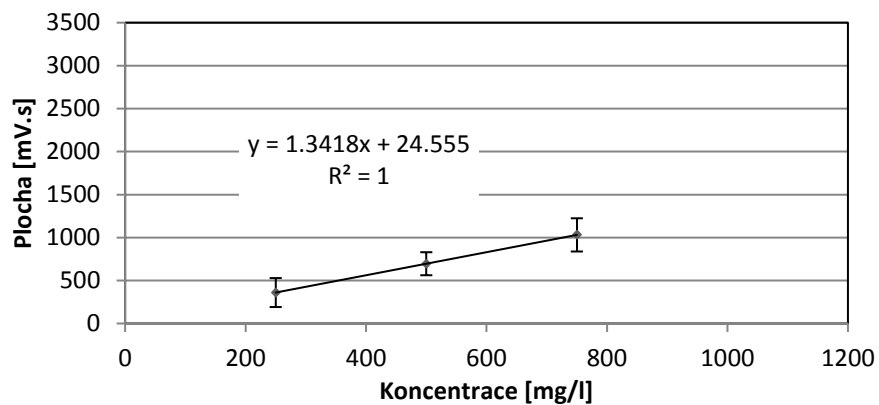
Obrázek 35: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v EtOH po odečtu signálu blanku



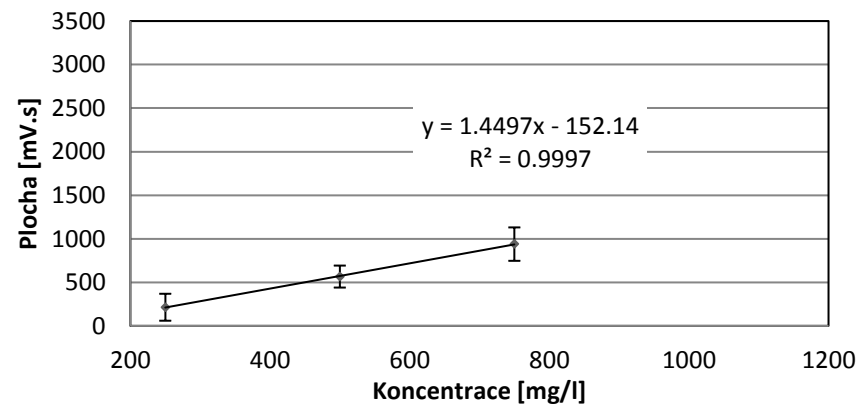
Obrázek 36: Závislost plochy na koncentraci S-(-)-felodipinu v EtOH:H₂O (11:9)



Obrázek 37: Závislost plochy na koncentraci S-(-)-felodipinu v EtOH:H₂O (11:9) po odečtu signálu blanku



Obrázek 38: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v EtOH:H₂O (11:9)



Obrázek 39: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v EtOH:H₂O (11:9) po odečtu signálu blanku

4.4. Výpočetní chemie jako nástroj pro určování optické otáčivosti

Výpočetní chemie představuje užitečný doplňkový nástroj pro určení absolutní konfigurace³¹. Hodnota optické otáčivosti analytu (využitelná u jednoduchých chirálních molekul pro určení absolutní konfigurace) je však při analýze v kapalném prostředí (např. HPLC) ovlivňována druhem použitého rozpouštědla; v extrémních případech může dojít dokonce ke změně znaménka. Příkladem může být (S)-methyoxiran, který má ve vodě kladnou optickou otáčivost, v benzenu pak zápornou⁹⁷. Pokud je molekula „flexibilní“ v prostoru, její interakce s rozpouštědly může mít velký vliv na optickou otáčivost. Prostudování závislosti optické otáčivosti rozpuštěné látky na rozpouštědle je tak důležité pro následnou optimalizaci podmínek měření této veličiny (např. pro zvýšení citlivosti používané instrumentace) a výpočetní chemie poskytuje vhodný prostředek k predikci těchto efektů. Následující kapitoly popisují sled použitých výpočetních kroků a současně diskutují jejich význam pro finální určení hodnot optických otáčivostí.

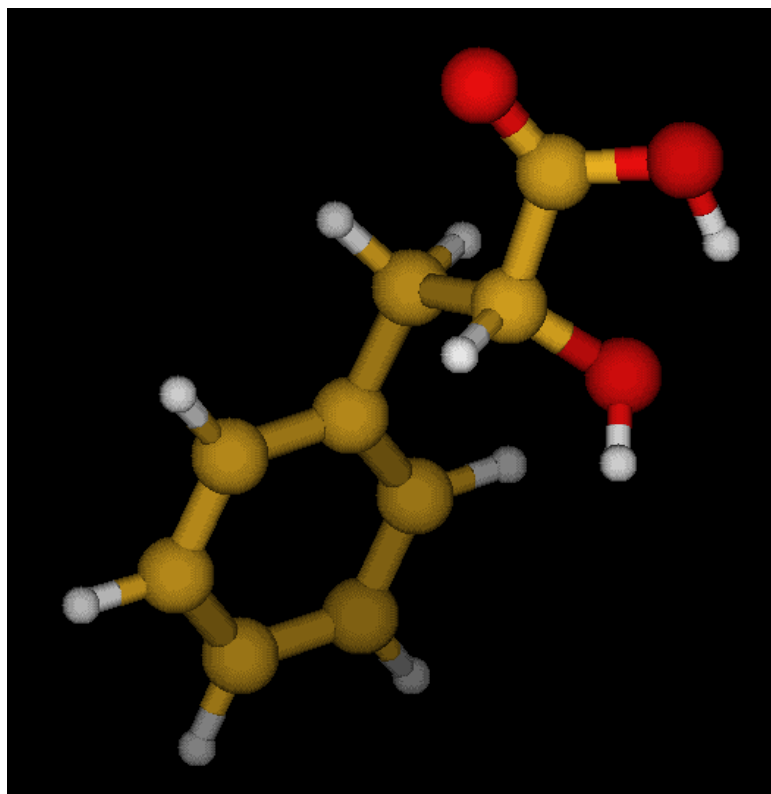
4.4.1. Postup zpracování dat pomocí skriptů

Seznam skriptů použitých v této diplomové práci je uveden v příloze 7.7 a jsou uloženy na přiloženém CD. Skriptem 1 byly ze souboru s příponou „hcs“ vyextrahovány jednotlivé konformery. Tyto konformery byly rozděleny na jednotlivá rozpouštědla skriptem 2. Skriptem 3 byla vytvořena „hlavička“ pro optimalizaci geometrie v Gaussianu. Skriptem 4 byl výpočet optimalizace geometrie spuštěn na serveru. Na serveru byl po ukončení výpočtu skriptem 5 ze vzniklých „chk“ souborů vyrobeny z-matice. Skriptem 6 byla ze z-matic ořezána nadbytečná data. Matice byly následně roztřízeny podle rozpouštědel a z „log“ souborů byly skriptem 7 byly vyextrahovány Gibbsovy energie. Vznikl soubor, ve kterém byly Gibbsovy energie seřazeny vzestupně a na základě tohoto seřazení byl vytvořen „csv“ soubor s pořadím jednotlivých konformerů podle energie pro každé rozpouštědlo zvlášť. Spuštěním skriptu 8 bylo možno vytřídit vzniklé duplicitní konformery. Unikátní konformery byly následně „ohlavičkovány“ skriptem 9 pro výpočet optické otáčivosti. Spuštění výpočtů optické otáčivosti bylo opět provedeno skriptem 4.

4.4.2. Optimalizace geometrie a výpočet optické otáčivosti kyseliny fenylmléčné

Nejprve byly programem Avogadro navrženy 3D molekuly obou enantiomerů kyseliny fenylmléčné. Po následné „preoptimalizaci“ byly programem Hyperchem pro obě struktury hledány energeticky nejstabilnější konformery. Zároveň byly vzniklé konformery preoptimalizovány metodou MM+. Programem Gaussian byla poté provedena optimalizace geometrie v 5 testovaných rozpouštědlech (ACN, EtOH, MeOH, hexan, voda) s využitím implicitního modelu rozpouštědla (PCM). Tento model simuluje přítomnost rozpouštědla jako dielektrického média interagujícího s molekulou analytu vloženou do prostoru rozpouštědla³⁶. Hlavním cílem v tomto kroku bylo získat stabilní struktury, vyřadit očekávané duplikáty konformerů (jejich přítomnost byla předpokládána vzhledem k jednodušší metodě výpočtu geometrie v softwaru Hyperchem) a hodnoty energií určující poměrné zastoupení jednotlivých konformerů. Výpočty byly proto provedeny nejprve metodou DFT za použití B3LYP funkcionálu s méně náročnější bází 6-31G*.

Struktura kyseliny fenylmléčné je poměrně jednoduchá. Jeden výpočet optimalizace energie trval přibližně 2 hodiny. Celkem bylo zpracováno 122 konformerů R-enantiomeru a 104 konformerů S-enantiomeru pro každé rozpouštědlo zvlášť. Hodnoty Gibbsových energií jednotlivých konformerů byly vzestupně seřazeny do souboru, na který byl následně aplikován skript 8 porovnávající navzájem konformery, které si byly energeticky blízké. Takto byly nalezeny duplicitní modely, které byly ze souboru vymazány. Ze všech rozpouštědel byly u obou enantiomerů nejstabilnější konformery (tj. s nejnižší Gibbsovou energií) nalezeny ve vodě. Jeden z nich, R-enantiomer, je pro příklad zobrazen na Obrázku 40. Nejčastěji se stáčela „alifatická část“ molekuly. Docházelo k vytočení mimo rovinu benzenového jádra a rotacím vodíků a uhlíků kolem jednoduchých vazeb.



Obrázek 40: Nejméně energeticky náročný konformer R-(+)-fenylmléčné kyseliny po optimalizaci ve vodě

V dalším kroku byly konformery vyhodnocené jako unikátní podrobeny výpočtům optické otáčivosti v jednotlivých rozpouštědlech. K tomuto účelu byla zvolena metoda DFT za použití B3LYP funkcionálu a aug-cc-pVDZ a aug-cc-pVTZ bazového setu⁹³. U valenčních elektronů se počítá s dvojnásobným, resp. trojnásobným, počtem orbitalů (dvojnásobným/trojnásobným počtem bazových funkcí), než obsahuje minimální báze. Tento bazový set zahrnuje polarizační funkce, báze je korelačně konzistentní (k dispozici jsou všechny typy orbitalů – s, p, d, f...) difuzní funkce. Ze spočítaných 226 konformerů obou enantiomerů (každé rozpouštědlo zvlášť) bylo vyhodnoceno 160 konformerů R-enantiomeru a 160 konformerů S-enantiomeru unikátních (ze všech rozpouštědel dohromady). U těchto struktur byla následně počítána optická otáčivost. Optické otáčivosti i energie geometrie byly počítány i triple-zeta setem. Výsledky ukázaly jen malé odchylky, tudíž je možné používat výpočet pouze na set double-zeta. Časová náročnost jednoho výpočtu optické otáčivosti pro optimalizovaný konformer fenylmléčné kyseliny se pohybovala okolo 4 hodin. Kompletní souhrn všech studovaných rozpouštědel lze nalézt v příloze 7.5.

$$\frac{N_i}{N_j} = e^{\frac{-(E_i - E_j)}{k_B \cdot T}}$$

Rovnice 4: Vztah pro výpočet Boltzmannovy distribuce

N_i – počet molekul ve stavu i o energii E_i

k_B – Boltzmannova konstanta

N_j – počet molekul ve stavu j o energii E_j

T – teplota systému

Energie konformerů jsou vztaženy relativně vždy k prvnímu, tj. nejstabilnějšímu, konformeru. Vypočtené hodnoty α jsou uvedeny ve stupních [°] a uvedeny ve sloupci “Optická otáčivost”. Teoretická zastoupení jednotlivých konformerů byla kvantifikována pomocí Boltzmannova distribučního zákona⁹⁸ (Rovnice 4) při teplotě 25°C a jsou uvedena v procentech jako parciální část vůči celkovému součtu všech pravděpodobností. V závislosti na relativním zastoupení daného konformeru s určitou optickou otáčivostí byl v celém souboru vypočítán jeho příspěvek k celkové optické otáčivosti. Parciální otáčivost zahrnuje vždy příspěvek daného konformeru a předchozích stabilnějších konformerů. Následně byla zjištěna i celková suma příspěvků optických otáčivostí vybraných konformerů (a tedy výsledná hodnota optické otáčivosti daného konformeru ve sledovaném rozpouštědle). Hodnoty celkových otáčivostí pro oba enantiomery kyseliny fenylmléčné jsou shrnuty v Tabulce 8. Z celkových otáčivostí vyplývá, že R- a S-enantiomer poskytuje s mírnými odchylkami výpočetně stejné hodnoty pro stejné rozpouštědlo, pouze s opačnými znaménky.

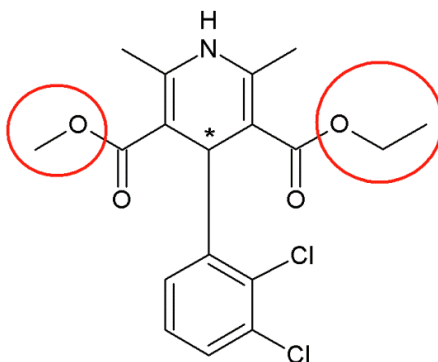
Tabulka 8: Vypočítané celkové optické otáčivosti R- a S-fenylmléčné kyseliny v pěti rozpouštědlech

	R-fenylmléčná kyselina		S-fenylmléčná kyselina	
	DZ	TZ	DZ	TZ
ACN	80,9328°	78,6488°	-81,0481°	-78,7430°
EtOH	90,0643°	87,9603°	-90,7330°	-88,4755°
H₂O	113,7757°	112,0203°	-117,6015°	-116,0242°
hexan	2,5257°	0,7352°	-2,4172°	-0,6284°
MeOH	112,2599°	109,0132°	-77,9660°	-75,6762°

Kombinací programů Hyperchem a Gaussian došlo ke správné předpovědi optických vlastností kyseliny fenylmléčné. Ukázalo se, že při generování vznikají konformery R- a S-enantiomeru v párech s téměř shodnými energiemi. Zároveň byla vypočtená znaménka celkových optických otáčivostí kyseliny shodná s polarimetrickými analýzami.

4.4.3. Optimalizace geometrie a výpočet optické otáčivosti R-(+)-felodipinu

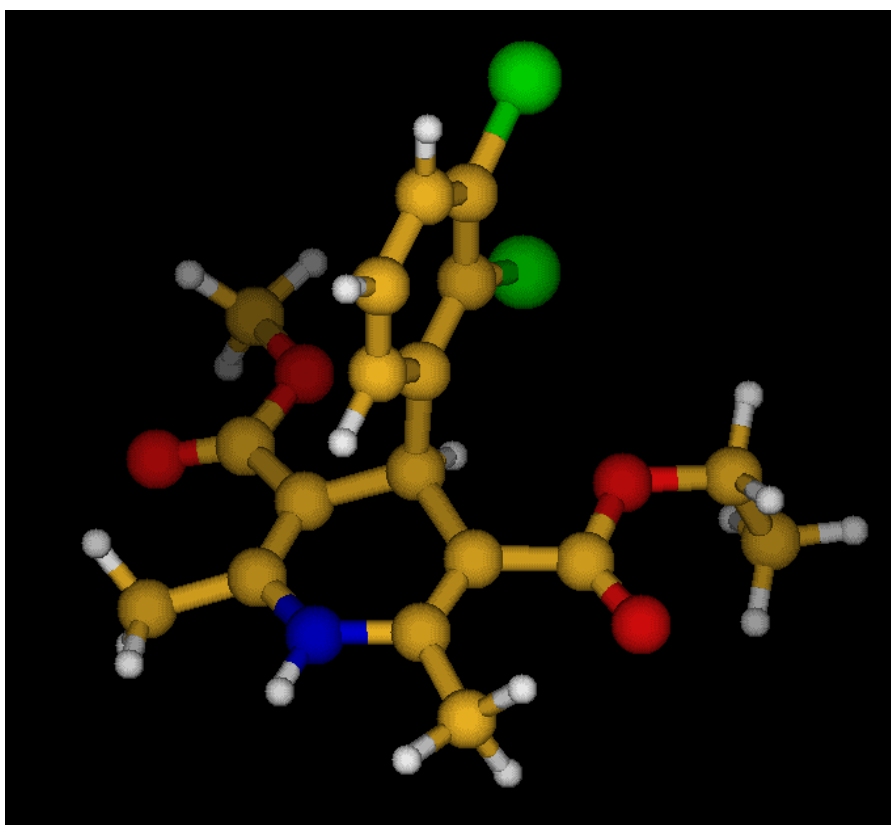
Vzhledem k časové náročnosti výpočtů felodipinu byly provedeny výpočty pouze pro R-(+)-felodipin. Z poznatků, které byly zjištěny u kyseliny fenylmléčné (tj. shoda hodnoty optické otáčivosti obou enantiomerů lišící se pouze znaménkem) by teoreticky stačilo spočítat pouze jeden enantiomer a výsledek druhého poté invertovat. Navrzení a optimalizace molekulky byla provedena stejně jako u fenylmléčné kyseliny. Tímto procesem bylo vygenerováno 911 konformerů. Pro tyto konformery byla následně pomocí programu Gaussian provedena optimalizace geometrie v 5 testovaných rozpouštědlech (ACN, EtOH, MeOH, hexan, voda) s využitím implicitního modelu rozpouštědla (PCM). Takto byly získávány stabilní struktury, ze kterých byly následně vyřazeny struktury duplicitní. Výpočty byly provedeny metodou DFT za použití B3LYP funkcionálu s bází 6-31G*.



Obrázek 41: Nejvíce pohybující se části felodipinu

Jeden výpočet pro optimalizaci energie vyžadoval přibližně 20 hodin. Celkově bylo zpracováno přes 300 konformerů (pro každé rozpouštědlo zvlášť). Na základě výpočtu a porovnání Gibbsovy energie jednotlivých konformerů byl vytvořen soubor konformerů seřazených podle vzrůstající hodnoty Gibbsovy energie. Ten byl následně zpracován vytvořeným skriptem, který porovnával geometrii energeticky blízkých konformerů. Tímto

způsobem mohly být nalezeny (a odstraněny ze souboru) případné opakující se motivy a ze spočítaných 200 původních konformerů (pro každé rozpouštědlo zvlášť) zůstalo 218 unikátních struktur (všechna rozpouštědla dohromady), u kterých byla dále počítána jejich pravděpodobnost výskytu a optická otáčivost (viz níže). Části molekuly felodipinu, u kterých se projevovала nejvyšší polohová variabilita, jsou vyznačeny na Obrázku 41. Ve strukturách s nejnižšími hodnotami energií se pravidelně opakovaly následující motivy: kolmá orientace benzenového kruhu vůči heterocyklickému, odpuzování jednotlivých esterových skupin od molekuly a rotace uhlíku a vodíků esterových skupin kolem jednoduché vazby. Geometrie konformeru s nejnižší vypočtenou hodnotou Gibbsovy energie (nalezen ve vodě) je znázorněna na Obrázku 42.

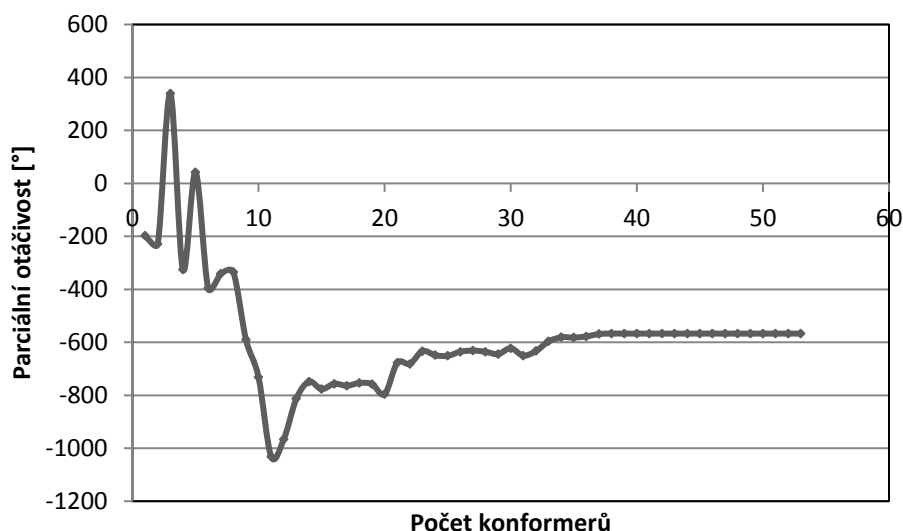


Obrázek 42: Nejméně energeticky náročný konformer R-(+)-felodipinu po optimalizaci ve vodě

V druhém kroku byly konformery (vyhodnocené jako unikátní v prvním kroku) podrobeny výpočtu optické otáčivosti v daných rozpouštědlech. K tomuto účelu byla zvolena metoda DFT za použití B3LYP funkcionálu a aug-cc-pVDZ bázevého setu⁹³.

U valenčních elektronů se počítá s dvojnásobným počtem orbitalů (dvojnásobný počet báзовých funkcí), než obsahuje minimální báze.

Časová náročnost jednoho výpočtu optické otáčivosti pro optimalizovaný konformer felodipinu se pohybovala okolo 4 dnů. Výpočet optické otáčivosti byl realizován u 218 konformerů. Seřazení konformerů a následné výpočty byly provedeny obdobně jako u kyseliny fenylmléčné. Kompletní souhrn všech pěti studovaných rozpouštědel lze nalézt v příloze 7.6. Sledováním příspěvku celkové otáčivosti je možné pozorovat konvergenci hodnoty optické otáčivosti v daném rozpouštědle ke konečné hodnotě. Výsledná hodnota optické otáčivosti daného konformeru by se při dostatečně velkém počtu výpočtů blížila k výsledné hodnotě. Obrázek 43 znázorňuje příspěvky parciálních optických otáčivosti s růstem počtu méně energeticky výhodných konformací R-(+)-felodipinu ve vodě.



Obrázek 43: Průběh parciálních příspěvku k celkové optické otáčivosti R-(+)-felodipinu ve vodě

Zatímco dle teorie je R-enantiomer felodipinu pravotočivý⁹⁶, v doposud vypočtených konformerech vycházela optická otáčivost záporná ve všech pěti zkoumaných rozpouštědlech (viz Tabulka 9). Při výkonu výpočetního klastru použitého v této práci nebylo možno dosáhnout dostatečného pokrytí celého setu konformerů (konformačního prostoru) pro tak složitou molekulu, jako je felodipin. Lze oprávněně předpokládat, že doposud nenalezené stabilnější konformery by posunuly (výrazně změnil) doposud

dosažený parciální výsledek. Tato výpočtová část práce demonstruje prudký nárůst výpočetních potřeb při práci s relativně složitějšími molekulami.

Tabulka 9: Vypočítané celkové optické otáčivosti R-felodipinu v pěti rozpouštědlech

	R-felodipin
ACN	-977,4352°
EtOH	-239,8772°
H₂O	-567,1045°
hexan	-1470,6954°
MeOH	-257,7731°

5. ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byl sledován vliv rozpouštědla na odezvu enantiomerů kyseliny fenylmléčné a felodipinu při jejich měření polarimetrickým detektorem v průtokovém uspořádání. Pomocí výpočetně-chemických metod provedena optimalizace geometrie studovaných sloučenin pomocí DFT výpočtů s využitím funkcionálu B3LYP a bázeového setu 6-31G*. Specifická optická otáčivost optimalizovaných struktur byla zjišťována DFT výpočty s využitím funkcionálu B3LYP a bázeového setu aug-cc-pVDZ, v případě kyseliny fenylmléčné pak také bázeového setu aug-cc-pVTZ. Zvolená rozpouštědla (voda, methanol, acetonitril, hexan a ethanol) byla simulována modelem polarizovaného kontinua.

Kyselina fenylmléčná poskytovala dobrou odezvu ve všech zmíněných rozpouštědlech. Nejlepším rozpouštědlem (poskytující nejlepší odezvu) byla voda, následovaná acetonitrem a nejhorší odezvu poskytoval isopropanol. Hodnoty směrnice a jejich změny s použitým rozpouštědlem se u obou enantiomerů dobře shodovaly. Získaná data ukazují, že při optimalizaci chromatografické metody využívající polarimetrický detektor bude složení mobilní fáze vedle selektivity významně ovlivňovat i možnosti detekce. Navrženým výpočetně-chemickým postupem se podařilo úspěšně vypočítat energie nejstabilnějších konformerů obou enantiomerů kyseliny fenylmléčné a následně i jejich optické otáčivosti v pěti rozpouštědlech. Byla pozorována shoda s experimentálně zjištěnými daty a zároveň se hodnoty celkových optických otáčivostí obou enantiomerů vždy stejným rozpouštědlem shodovaly až na znaménko. Z uvedeného plyne zajímavý metodický poznatek, že při správném pokrytí konformačního prostoru je zřejmě možno vypočítat optickou otáčivost jednoho enantiomeru a z něj odvodit optickou otáčivost enantiomeru druhého. Tento poznatek bude ovšem vhodné dále ověřovat pro různé struktury.

Felodipin vykazoval v porovnání s kyselinou fenylmléčnou horší odezvu ve všech studovaných rozpouštědlech. Při měření v jednotlivých rozpouštědlech byla pozorována dobrá shoda směrnice obou enantiomerů. Bylo zjištěno, že použití polárnějších mobilních fází (vody a jejich směsí s ethanolem) má pozitivní vliv na odezvu polarimetrického detektoru. Nejlepších výsledků při současném posuzování citlivosti, detekčního limitu i linearit bylo dosaženo při použití směsi ethanol-voda v poměru 11:9 (v/v). Rozpouštědla jako hexan, acetonitril a methanol byla vyhodnocena jako nejméně vhodné pro analýtu

felodipinu. Ani u felodipinu, ani u kyseliny fenylmléčné není citlivost metody plně závislá na polaritě rozpouštědla, i když v řadě studovaných protických rozpouštědel lze pozorovat určitý trend rostoucí směrnice kalibrační závislosti s polaritou. Odezva polarimetrického detektoru silně záleží na kombinaci analyt-rozpouštědlo a provedené experimenty poukazují na význam detailní a samostatné optimalizace složení mobilní fáze pro analyty s různou strukturou. Je také zřejmé, že optimalizace bude výsledkem kompromisu mezi dostatečnou enantioselektivitou separace a dostatečnou odezvou chirálního detektoru.

Jelikož molekula felodipinu představovala složitější a výpočetně náročnější systém, neposkytly provedené výpočty dostatečné pokrytí konformačního prostoru pro zkoumaný R-enantiomer natolik, aby došlo ke kvalitnímu odhadu optické otáčivosti.

Výpočty byly prováděny s nenabitými molekulami. Do budoucna by bylo zajímavé prostudovat vliv náboje v molekule (uvažovat rovnováhu mezi nabitou a nenabitou formou analytů).

6. LITERATURA

1. Smith, S. W. Chiral toxicology: It's the same thing only different. *Toxicol. Sci.* **110**, (2009).
2. Zhou, Z., Li, L., Yan, N., Du, L., Sun, C. & Sun, T. Synthesis, Crystal Structure, Absolute Configuration and Antitumor Activity of the Enantiomers of 5-Bromo-2-chloro-N-(1-phenylethyl)pyridine-3-sulfonamide. *Molecules* **20**, (2015). at <<http://www.mdpi.com/1420-3049/20/11/19740>>
3. Kumoro, A. C., Hasan, M. & Singh, H. Effects of solvent properties on the Soxhlet extraction of diterpenoid lactones from *Andrographis paniculata* leaves. *ScienceAsia* **35**, (2009).
4. Lavermicocca, P., Valerio, F. & Visconti, A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, (2003).
5. Sharma, D. *Advanced Organic Chemistry*. (2010).
6. Sanganyado, E., Lu, Z., Fu, Q., Schlenk, D. & Gan, J. Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes. *Water Res.* **124**, (2017).
7. de Albuquerque, N. C. P., Carrão, D. B., Habenschus, M. D. & de Oliveira, A. R. M. Metabolism studies of chiral pesticides: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **147**, (2018).
8. Martin, J. M., Saaristo, M., Bertram, M. G., Lewis, P. J., Coggan, T. L., Clarke, B. O. & Wong, B. B. M. The psychoactive pollutant fluoxetine compromises antipredator behaviour in fish. *Environ. Pollut.* **222**, (2017).
9. Červinka, O. Chiralita a pojmy s ní související. *Chem. Listy* **93**, (1999).
10. Nováková, L. & Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. (2013).
11. Potapov, V. M. *Stereochemie*. (1986).
12. Casy, Alan F and Dewar, G. H. *The steric factor in medicinal chemistry: dissymmetric probes of pharmacological receptors*. (1993).
13. Nógrádi, M. *Stereochemistry: basic concepts and applications*. (1981).
14. Chaudhari, S. R. & Suryaprakash, N. Recent NMR methodological developments for chiral analysis in isotropic solutions. *J. Indian Inst. Sci.* **94**, (2014).
15. Parkinson, A. *Biotransformation of xenobiotics*. (2001).
16. Fogassy, E., Nógrádi, M., Kozma, D., Egri, G., Pálovics, E. & Kiss, V. Optical resolution methods. *Org. Biomol. Chem.* **4**, (The Royal Society of Chemistry, 2006). at <<http://dx.doi.org/10.1039/B603058K>>
17. Manchester, K. L. Louis Pasteur, fermentation, and a rival. *S. Afr. J. Sci.* **103**, (2007).
18. Schrödinger, E., Shearer, J. F. & M. Deans, W. *Collected papers on wave*

- mechanics*. (1928).
19. Lewars, E. Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. (2011).
 20. Hollas, D., Svoboda, V., Svoboda, O. & Slaviček, P. Kvantová chemie: První čtení. (2014). at <https://ufch.vscht.cz/files/uzel/0013999/yy5LzCvJL0vUTc5Izc1M1TUqSi3LLM7MzwMA.pdf?redirected> [cit. 08/03/2018]
 21. Koch, W. & Holthausen, M. C. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. (2001).
 22. Hohenberg, P. & Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **136**, (1964).
 23. Koca, J. Kam se ubírá počítačová chemie - zaostřeno na modelování větších molekul. *Chem. Listy* **92**, (1998).
 24. Jensen, F. Introduction to computational chemistry. (John Wiley & Sons, Inc., 2007). at [http://karin.fq.uh.cu/qct/books/Jensen_Introduction to Computational Chemistry 2nd ed.pdf](http://karin.fq.uh.cu/qct/books/Jensen_Introduction%20to%20Computational%20Chemistry%202nd%20ed.pdf) [cit. 09/07/2018]
 25. Hehre, W. J. *A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations*. (Wavefunction, 2003). at <https://www.wavefun.com/support/AGuidetoMM.pdf> [cit. 03/05/2018]
 26. Bachrach, S. M. *Computational Organic Chemistry*. (Wiley, 2014). at http://www.oxkstu.ru/download/Bachrach_S_M_Computational_Organic_Chemistry.pdf [cit. 03/05/2018]
 27. West, C. & Hoo Kim, E. *A Computational Study for Optimizing a Synthetic Pathway to a Difluorinated Gingerol Compound*. (2018).
 28. Hoggan, P. E. & Belén RUIZ, M. *Molecular Integrals over Slater-type Orbitals. From pioneers to recent progress*. at https://pdfs.semanticscholar.org/c20b/b49685e9cc08438dbbfa97244ee7d9fd7180.pdf?_ga=2.107524353.289965367.1549974403-1483929243.1530631942 [cit. 12/02/2019]
 29. Zur, D., Des, E. & Doktorgrades, N. *Absolute Configuration by Circular Dichroism: Quantum Chemical CD Calculations*. (2010). at <https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/4813/file/Maksimenka.pdf> [cit. 14/02/2019]
 30. Daniel Crawford, T. Ab initio calculation of molecular chiroptical properties. *Theor. Chem. Acc.* **115**, (2005). at http://mercuryconsortium.org/conference/2008/speakers/crawford_sug_read.pdf [cit. 09/07/2018]
 31. Costante, J., Hecht, L., Polavarapu, P. L., Collet, A. & Barron, L. D. Absolute Configuration of Bromochlorofluoromethane from Experimental and Ab Initio Theoretical Vibrational Raman Optical Activity. *Angew. Chemie Int. Ed. English*

- 36**, (1997).
32. Autschbach, J. Computing chiroptical properties with first-principles theoretical methods: Background and illustrative examples. *Chirality* **21**, (2009).
33. *Adaption of Simulated Annealing to Chemical Optimization Problems*. (Elsevier, 1995). at
<<https://books.google.cz/books?id=g5iL5GVqJJQC&pg=PA304&lpg=PA304&dq=Simulated+annealing+strategies+for+molecular+dynamics&source=bl&ots=pi9GeJzD04&sig=g82lf2cx3Ir8kaQtTMs400fWq3w&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwif5sX3w5TcAhWJmbQKHZ34Cw04ChDoAQgmMAA#v=onepage&q=Simu>>[cit. 10/07/2018]
34. Mori, T., Grimme, S. & Inoue, Y. Supporting Information for A combined experimental and theoretical study on the conformation of multiarmed chiral aryl ethers. *J. Org. Chem.* **72**, (2007).
35. Pitrat, D., Daugey, N., Jean, M., Vanthuynne, N., Wien, F., Ducasse, L., Calin, N., Buffeteau, T. & Brotin, T. Unusual Chiroptical Properties of the Cryptophane-222 Skeleton. *J. Phys. Chem. B* **120**, (2016).
36. Sabin, J. & Brandas, E. *Advances in Quantum Chemistry, Volume 64*. (2012).
37. Guerard, J. J. & Arey, J. S. Critical evaluation of implicit solvent models for predicting aqueous oxidation potentials of neutral organic compounds. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, (2013).
38. Terencio, T., Roithová, J., Brandès, S. & Rousselin, Y. A Comparative IRMPD and DFT Study of Fe³⁺ and UO₂²⁺ Complexation with N-Methylacetohydroxamic Acid. *Inorg. Chem.* **57**, (2018).
39. Stephens, P. J., McCann, D. M., Devlin, F. J., Flood, T. C., Butkus, E., Stončius, S. & Cheeseman, J. R. Determination of molecular structure using vibrational circular dichroism spectroscopy: The keto-lactone product of Baeyer-Villiger oxidation of (+)-(1R,5S)-bicyclo[3.3.1]nonane-2,7-dione. *J. Org. Chem.* **70**, (2005).
40. Yu, J., Cao, Y., Song, H., Wang, X. & Yao, S. Calculations of optical rotation: Influence of molecular structure. *J. Serb. Chem. Soc.* **77**, (2012).
41. Talotta, C., Gaeta, C., Troisi, F., Monaco, G., Zanasi, R., Mazzeo, G., Rosini, C. & Neri, P. Absolute configuration assignment of inherently chiral calix[4]arenes using DFT calculations of chiroptical properties. *Org. Lett.* **12**, (2010).
42. Hudecová, J. & Bouř, P. VIBRAČNÍ OPTICKÁ AKTIVITA: EXPERIMENTÁLNÍ ZÁZEMÍ A POČÍTAČOVÉ SIMULACE. *Chem. Listy* **108**, (2014).
43. Bour, P. & Keiderling, T. A. Structure, spectra and the effects of twisting of b-sheet peptides. A density functional theory study. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **675**, (2004).
44. Bour, P., Kubelka, J. & Keiderling, T. A. Ab initio quantum mechanical models of peptide helices and their vibrational spectra. *Biopolymers* **65**, (2002).
45. Gussem, E. De, Bultinck, P., Feledziak, M., Marchand-Brynaert, J., Stevens, C. V.

- & Herrebout, W. Vibrational Circular Dichroism versus Optical Rotation Dispersion and Electronic Circular Dichroism for diastereomers: the stereochemistry of 3-(1'-hydroxyethyl)-1-(3'-phenylpropanoyl)-azetidín-2-one. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, (2012).
46. Ministerstvo zdravotnictví ČR. *Český lékopis 2017: Tištěná verze (1.-4. díl)*. (Grada Publishing a.s., 2017). at <<https://books.google.cz/books?id=in1iDwAAQBAJ>>
 47. R. Snyder, L. R., Kirkland, J. & W. Dolan, J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. (2010).
 48. Bobbitt, D. R. & Linder, S. W. Recent advances in chiral detection for high performance liquid chromatography. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **20**, (2001).
 49. Tsina, I., Tam, Y. L., Boyd, A., Rocha, C., Massey, I. & Tarnowski, T. An indirect (derivatization) and a direct HPLC method for the determination of the enantiomers of ketorolac in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**, (1996).
 50. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Glajch, J. L. *Practical HPLC Method Development*. Wiley-Interscience (1997).
 51. Rogozhin, S. V. & Davankov, V. A. Ligand chromatography on asymmetric complex-forming sorbents as a new method for resolution of racemates. *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* **0**, (1971).
 52. Pirkle, W. H., Finn, J. M., Schreiner, J. L. & Hamper, B. C. A widely useful chiral stationary phase for the high-performance liquid chromatography separation of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, (1981).
 53. Yamamoto, C. & Okamoto, Y. in *Chiral Anal.* (Elsevier, 2006). at <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444516695500077>>[cit. 18/08/2018]
 54. Smith, R. J. & Webb, M. L. *Analysis of Drug Impurities*. (2007).
 55. Štulík, K. *Analytické separační metody*. (2004).
 56. Yashima, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *J. Chromatogr. A* **906**, (2001).
 57. Ward, T. J. & Farris III, A. B. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review. *J. Chromatogr. A* **906**, (2001).
 58. Bressolle, F., Audran, M., Pham, T.-N. & Vallon, J.-J. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **687**, (1996).
 59. Han, S. M. Direct enantiomeric separations by high performance liquid chromatography using cyclodextrins. *Biomed. Chromatogr.* **11**, (1997).
 60. Hyun, M. H. Development of HPLC Chiral Stationary Phases Based on (+)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic Acid and Their Applications. *Chirality* **27**, (2015).

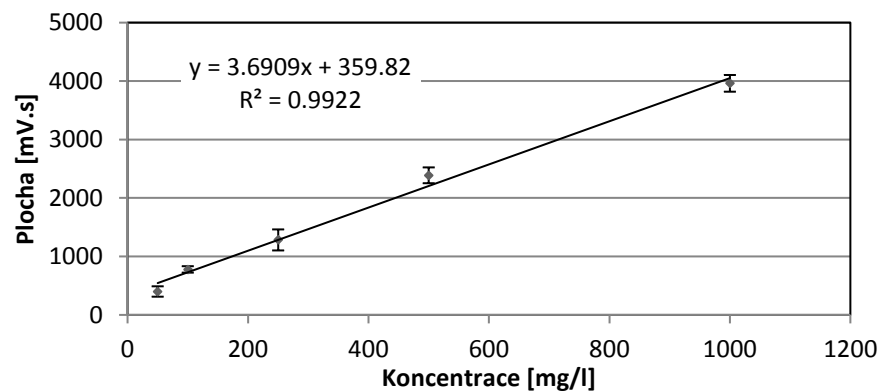
61. Haginaka, J. Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations. *J. Chromatogr. A* **906**, (2001).
62. Lämmerhofer, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* **1217**, (2010).
63. Thunberg, L., Hashemi, J. & Andersson, S. Comparative study of coated and immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and their applicability in the resolution of enantiomers. *J. Chromatogr. B* **875**, (2008).
64. Ali, I., Kumerer, K. & Aboul-Enein, H. Y. Mechanistic Principles in Chiral Separations Using Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* **63**, (2006).
65. Fanali, S. *Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis*. *J. Chromatogr. A* **735**, (1996).
66. Okamoto, Y. & Ikai, T. Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers. *Chem. Soc. Rev.* **37**, (2008).
67. Lincová, D. & Farghali, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. (2007).
68. Donáth, V. Patofyziologia epilepsie. *Neurol. pro praxi* **3**, (2002). at <<https://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-200202-0003.php>>[cit. 19/08/2018]
69. Lüllmann, H., Mohr, K. & Hein, L. *Barevný atlas farmakologie*. (2012).
70. Šipula, M. J. Blokátory kalciových kanálů v léčbě hypertenze. *Interní medicína pro praxi* **5**, (2003).
71. Fleckenstein, A. Die Bedeutung der energiereichen Phosphate für Kontraktilität und Tonus des Myokards BT - Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin. in (ed. Schlegel, B.) (1964).
72. Špác, J. & Vyskočilová, M. Blokátory kalciového kanálu po 50 letech. *Klin. Farmakol. a Farm.* **32**, (2018).
73. Wang, A. L., Iadecola, C. & Wang, G. New generations of dihydropyridines for treatment of hypertension. *J. Geriatr. Cardiol.* **67H72 14**, (2017).
74. Chandra, K. S. & Ramesh, G. The fourth-generation Calcium channel blocker: Cilnidipine. *Indian Heart J.* **65**, (2013).
75. Gregor, P. Lékové profily - felodipinum. *Remedia* (2002). at <<http://www.remmedia.cz/Clanky/Lekove-profily/Felodipinum/6-I-fl.magarticle.aspx>>[cit. 18/02/2018]
76. Dru, J. D.-Y., Hsieh, J. Y.-K., Matuszewski, B. K. & Dobrinska, M. R. Determination of felodipine, its enantiomers, and a pyridine metabolite in human plasma by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **666**, (1995).
77. Edgar, B., Regårdh, C. G., Johnsson, G., Johansson, L., Lundborg, P., Löfberg, I. & Rönn, O. Felodipine kinetics in healthy men. *Clin. Pharmacol. Ther.* **38**, (1985).

78. Baarnhielm, C., Backman, A., Hoffmann, K. J. & Weidolf, L. *Biotransformation of Felodipine in Liver Microsomes from Rat, Dog, and Man*.
79. Bailey, D. G., Malcolm, J., Arnold, O. & Spence, J. D. *Grapefruit juice-drug interactions. Br J Clin Pharmacol* **46**, (1998).
80. 2007 ESH-ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *Blood Press.* **16**, (Taylor & Francis, 2007). at <<https://doi.org/10.1080/08037050701461084>>[cit. 27/02/2019]
81. Qin, X. Z., DeMarco, J. & Ip, D. P. Simultaneous determination of enalapril, felodipine and their degradation products in the dosage formulation by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a Spherisorb C8 column. *J. Chromatogr. A* **707**, (1995).
82. Basavaiah, K., Chandrashekar, U. & Prameela, H. C. Determination of felodipine in bulk drug and in tablets by high performance liquid chromatography. *Indian J. Chem. Technol.* **10**, (2003).
83. Tokuma, Y. & Noguchi, H. Stereoselective pharmacokinetics of dihydropyridine calcium antagonists. **694**, (1995).
84. Inotsume, N. & Nakano, M. Stereoselective determination and pharmacokinetics of dihydropyridines: An updated review. *J. Biochem. Biophys. Methods* **54**, (2002).
85. Zhou, Y., Ma, C., Wang, Y., Zhang, Q. M., Zhang, Y. Y., Fu, J., Gao, H. & Zhao, L. X. High performance liquid chromatographic separation of thirteen drugs collected in Chinese Pharmacopoeia 2010(Ch.P2010) on cellulose ramification chiral stationary phase. *J. Pharm. Anal.* **2**, (2012).
86. Boatto, G., Nieddu, M., Faedda, M. V. & De Caprariis, P. Enantiomeric separation by HPLC of 1,4-dihydropyridines with vancomycin as chiral selector. *Chirality* **15**, (2003).
87. Wang, Y., Zhou, Y., Ma, C., Yang, B., Feng, R., Zhang, Y., Fu, J., Chen, W., Sun, Y., Ma, J., Zhang, Q., Deng, Y., Zhang, Y. & He, W. High performance liquid chromatographic separation of eight drugs collected in Chinese Pharmacopoeia 2010 on amylose ramification chiral stationary phase. *Acta Pharm. Sin. B* **2**, (2012).
88. Stožický, F. & Sýkora, J. *Základy dětského lékařství*. (Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016). at <<https://books.google.cz/books?id=a8I4DAAAQBAJ>>[cit. 03/09/2018]
89. Pazdírková, R. & Komárková, J. *Fenylketonurie a mateřství*. (Klinika dětí a dorostu 3. lékařské fakulty UK, 2010). at <<https://books.google.cz/books?id=aRiGYgEACAAJ>>[cit. 03/09/2018]
90. Chaudhari SS, G. D. Phenylactic Acid: A Potential Antimicrobial Compound in Lactic acid Bacteria. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access* **2**, (2016).
91. Dimitrova, B., Gevrenova, R. & Anklam, E. Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **18**,

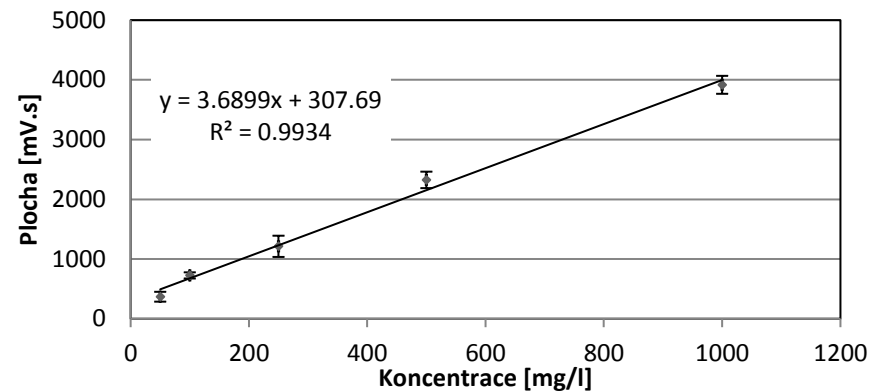
92. Gresley, A. Le, Kenny, J., Cassar, C., Kelly, A., Sinclair, A. & Fielder, M. D. The application of high resolution diffusion NMR to the analysis of manuka honey. *Food Chem.* **135**, (2012).
93. Stephens, P. J., Devlin, F. J., Cheeseman, J. R. & Frisch, M. J. Calculation of optical rotation using density functional theory. *J. Phys. Chem. A* **105**, (2001).
94. Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. (2003).
95. Eckschlager, K., Kodejš, Z. & Horsák, I. Vyhodnocování analytických výsledků a metod. (SNTL, 1980). at <https://books.google.cz/books?id=kWHnGAAACAAJ>>[cit. 28/03/2019]
96. Vijitha, C., Swetha, E. & Veeresham, C. Enantioselective Conversion of Racemic Felodipine to S(-)-Felodipine by *Aspergillus niger* and Lipase AP6 Enzyme. *Adv. Microbiol.* **06**, (2016).
97. Mukhopadhyay, P., Zuber, G., Goldsmith, M. R., Wipf, P. & Beratan, D. N. Solvent effect on optical rotation: A case study of methyloxirane in water. *ChemPhysChem* **7**, (2006).
98. Young, D. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems*. *J. Am. Chem. Soc.* (2001). at [http://blogs.cimav.edu.mx/daniel.glossman/data/files/Libros/Computational Chemistry - A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems.pdf](http://blogs.cimav.edu.mx/daniel.glossman/data/files/Libros/Computational%20Chemistry%20-%20A%20Practical%20Guide%20for%20Applying%20Techniques%20to%20Real%20World%20Problems.pdf)>[cit. 18/03/2019]

7. PŘÍLOHY

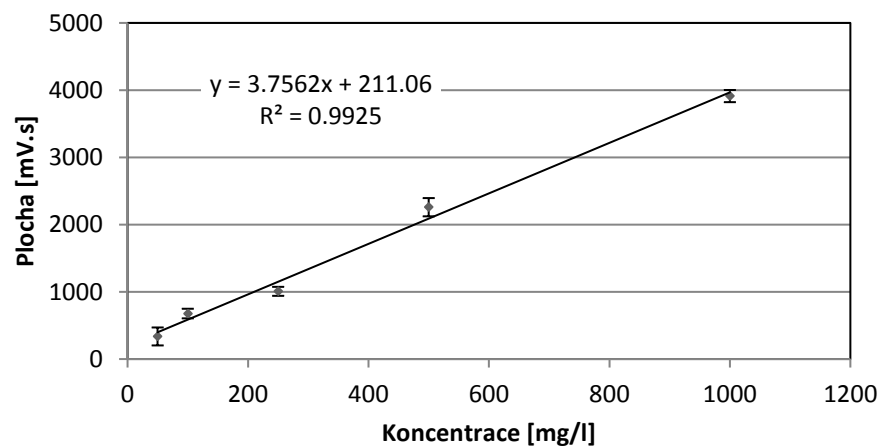
7.1. Závislost plochy signálu na koncentraci kyseliny fenylnléčné



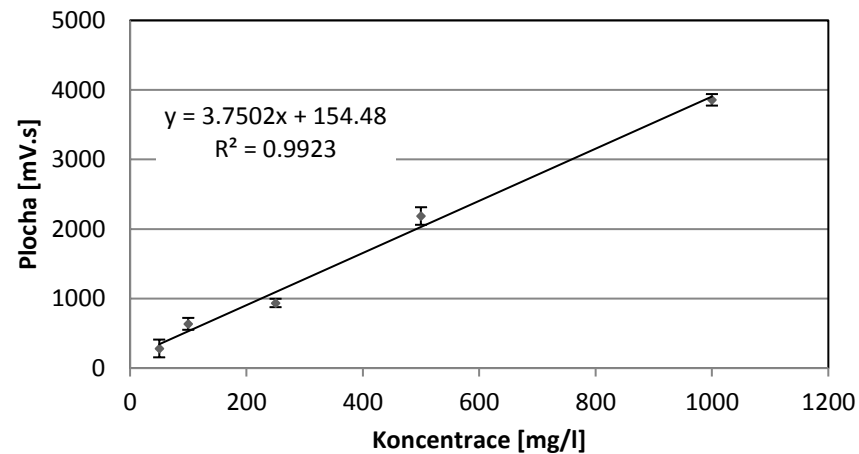
Obrázek 44: D(+)-PLA v ACN



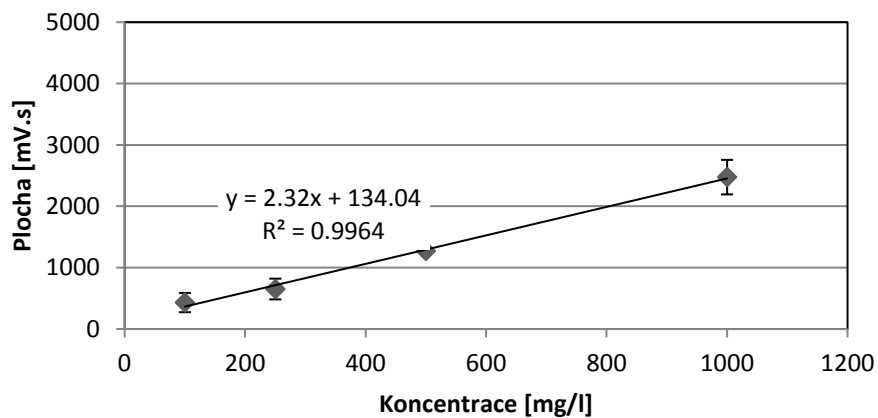
Obrázek 45: D(+)-PLA v ACN po odečtu signálu blanku



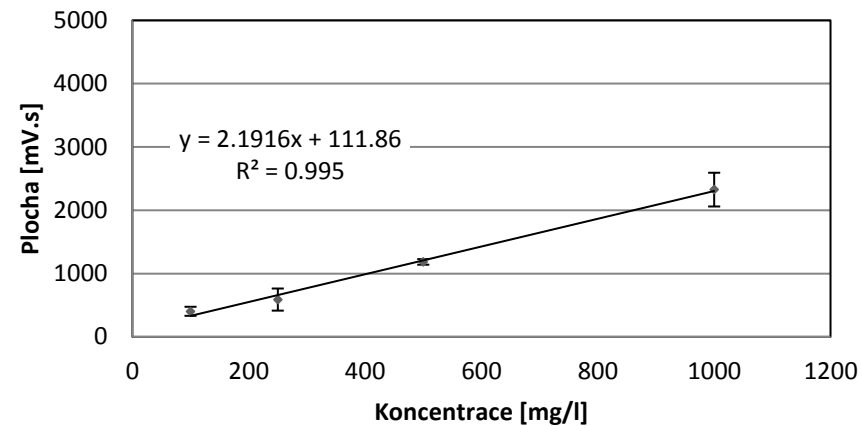
Obrázek 46: L(-)-PLA v ACN



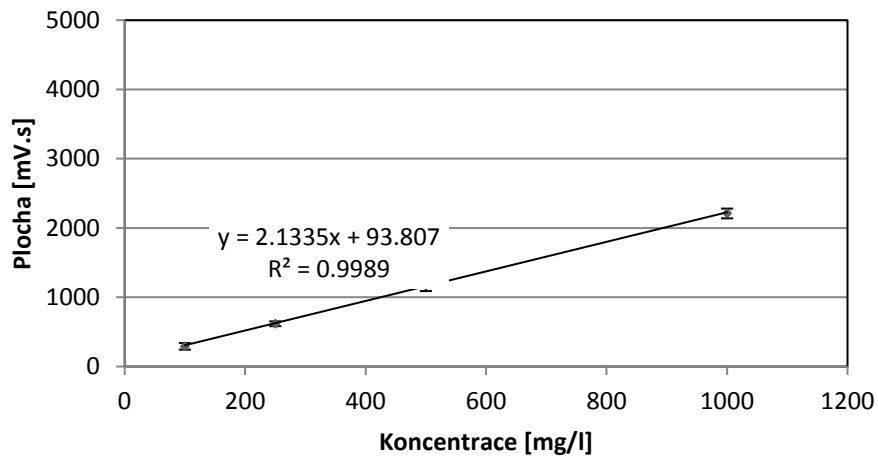
Obrázek 47: L(-)-PLA v ACN po odečtu signálu blanku



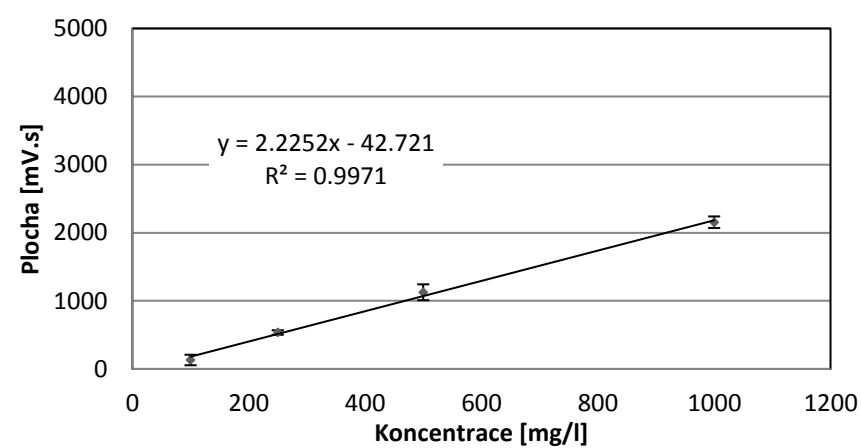
Obrázek 48: D(+)-PLA v EtOH



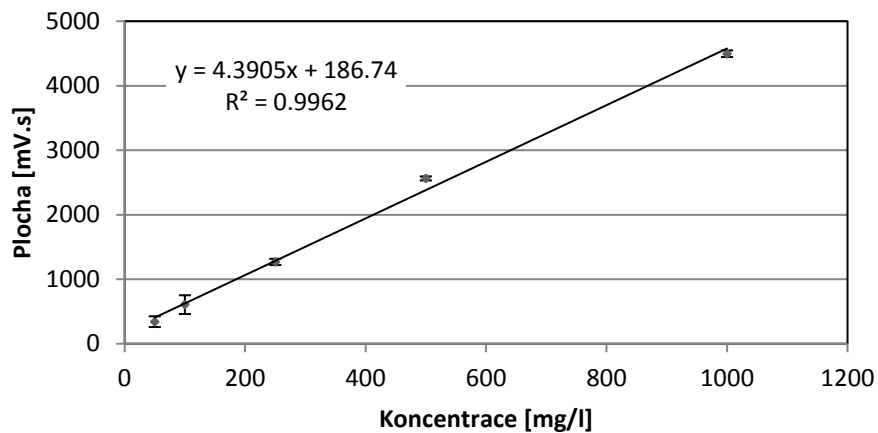
Obrázek 49: D(+)-PLA v EtOH po odečtu signálu blanku



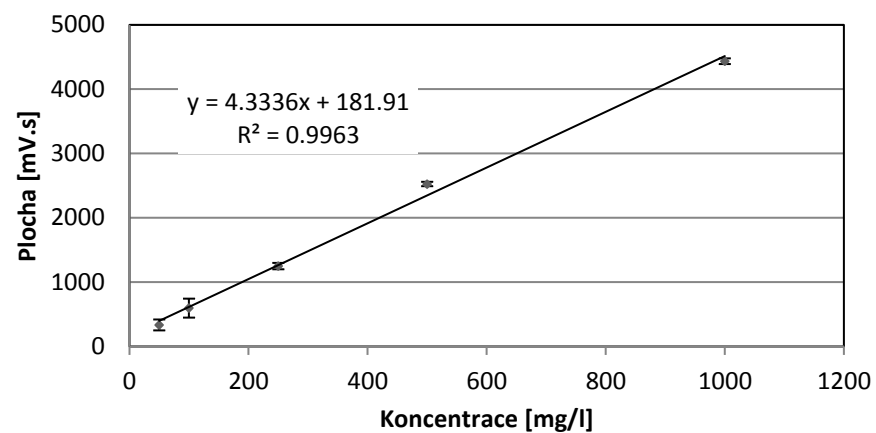
Obrázek 50: L(-)-PLA v EtOH



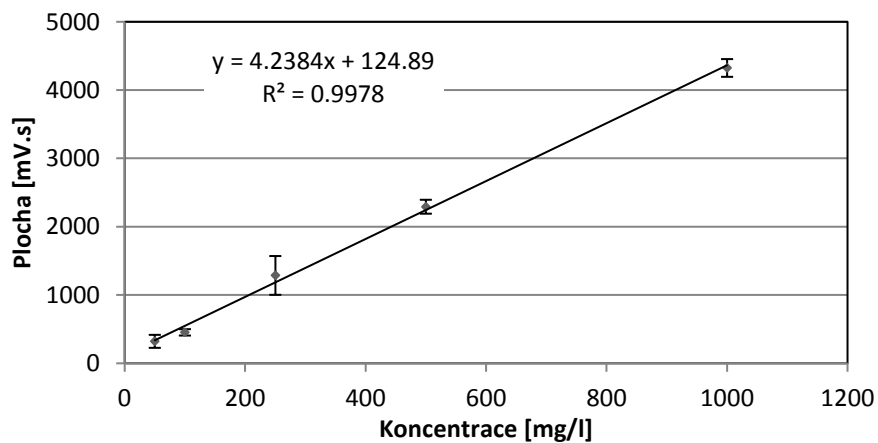
Obrázek 51: L(-)-PLA v EtOH po odečtu signálu blanku



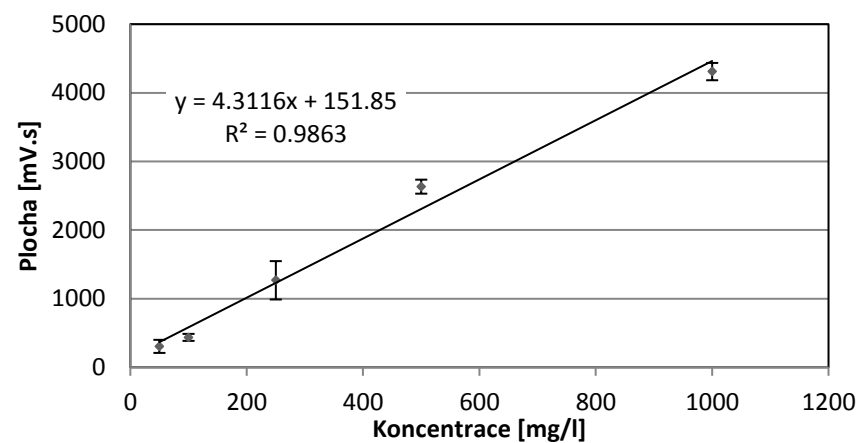
Obrázek 52: D(+)-PLA v H₂O



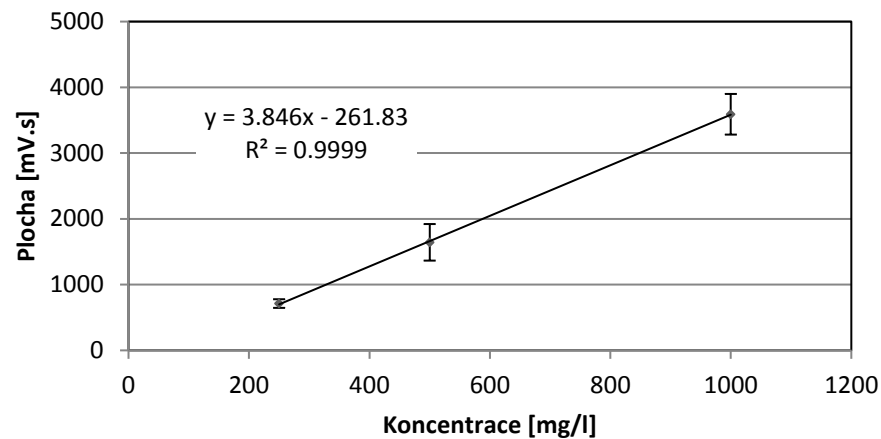
Obrázek 53: D(+)-PLA v H₂O po odečtu signálu blanku



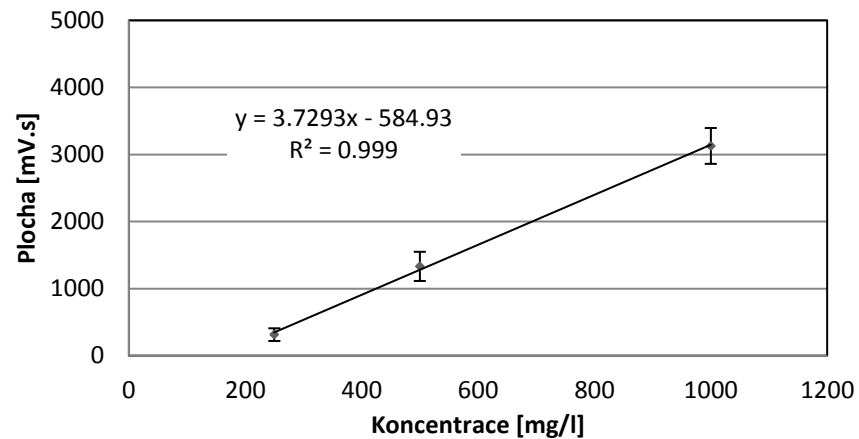
Obrázek 54: L(-)-PLA v H₂O



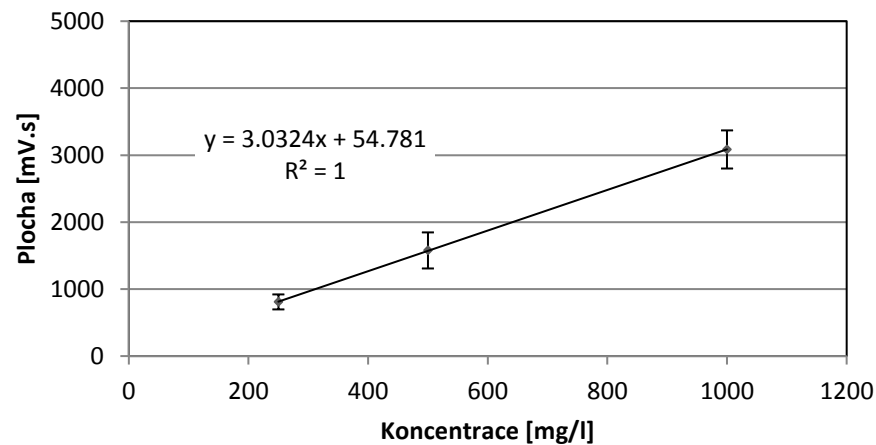
Obrázek 55: L(-)-PLA v H₂O po odečtu signálu blanku



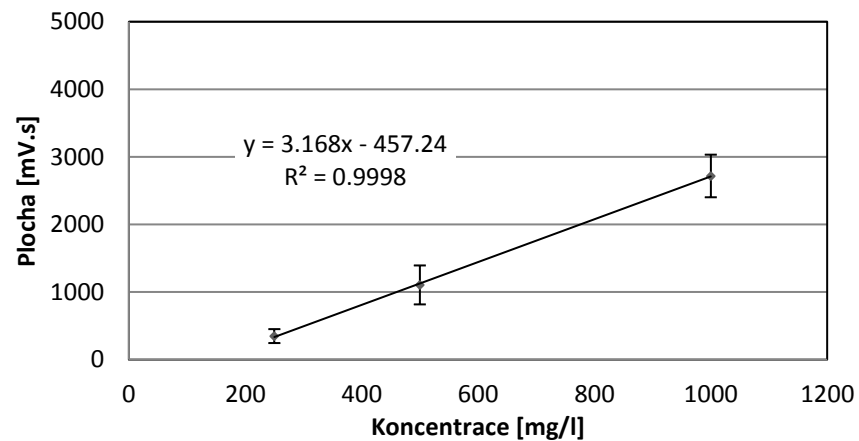
Obrázek 56: D(+)-PLA v hexan:EtOH (19:1)



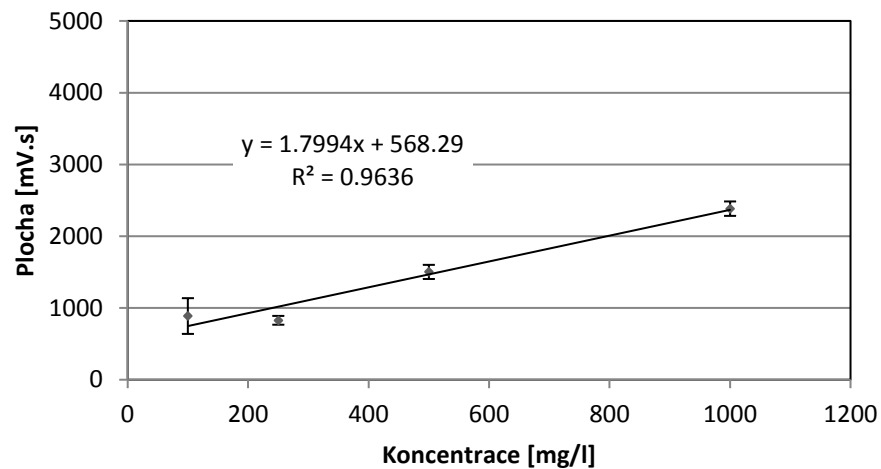
Obrázek 57: D(+)-PLA v hexan:EtOH (19:1) po odečtu signálu blanku



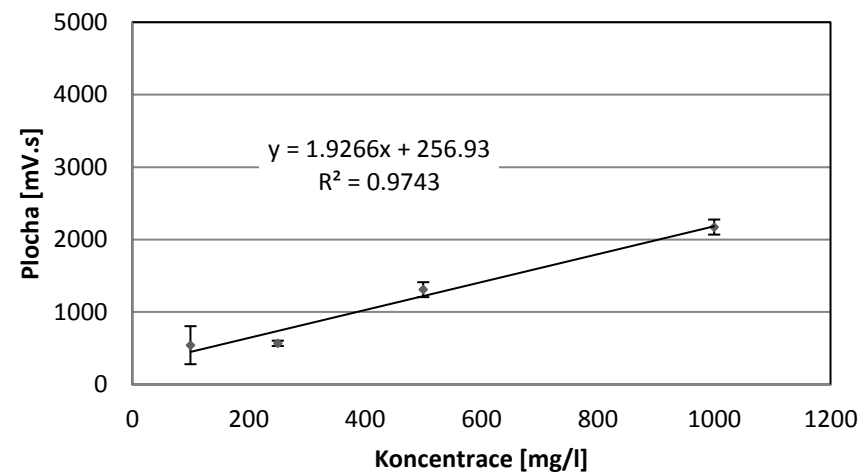
Obrázek 58: L(-)-PLA v hexan:EtOH (19:1)



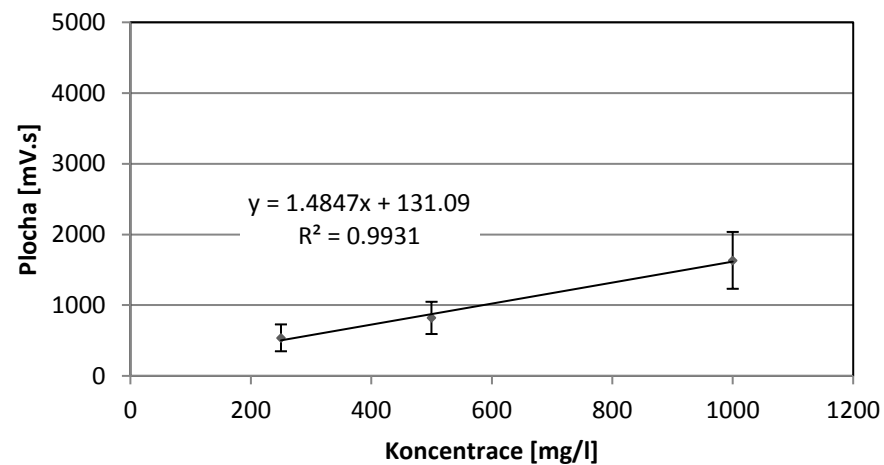
Obrázek 59: L(-)-PLA v hexan:EtOH (19:1) po odečtu signálu blanku



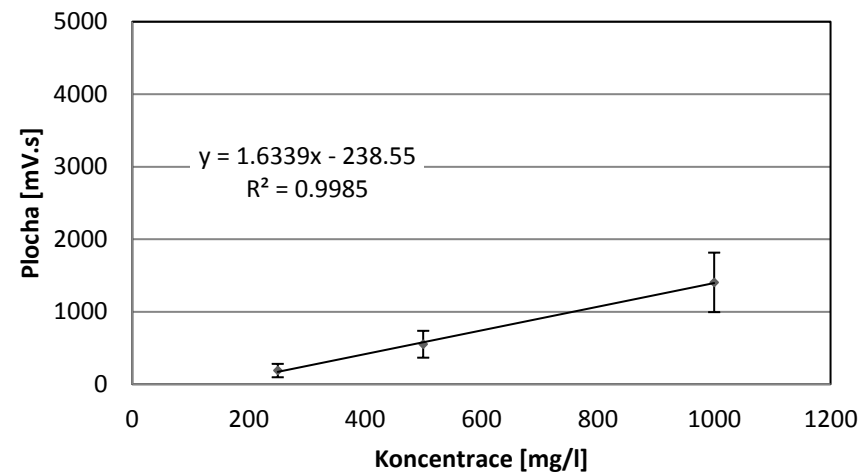
Obrázek 60: D(+)-PLA v i-PrOH



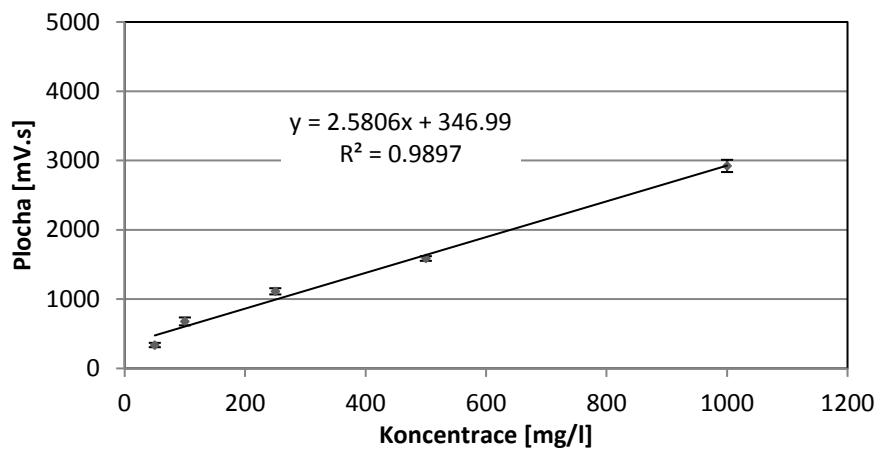
Obrázek 61: D(+)-PLA v i-PrOH po odečtu signálu blanku



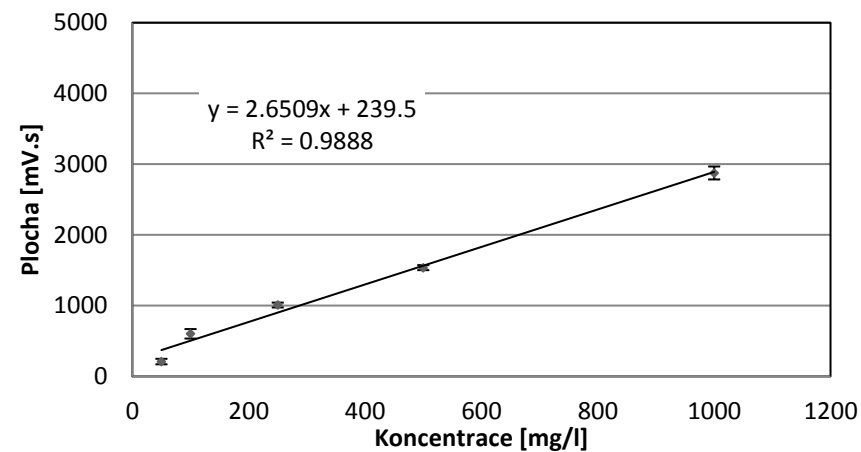
Obrázek 62: L(-)-PLA v i-PrOH



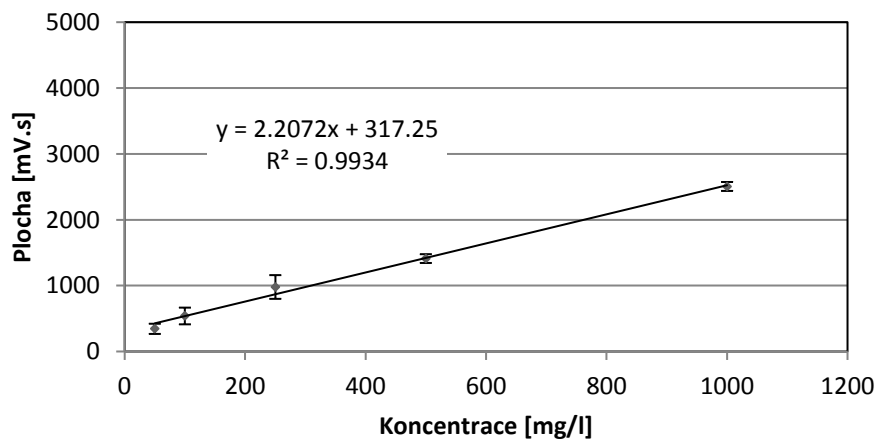
Obrázek 63: L(-)-PLA v i-PrOH po odečtu signálu blanku



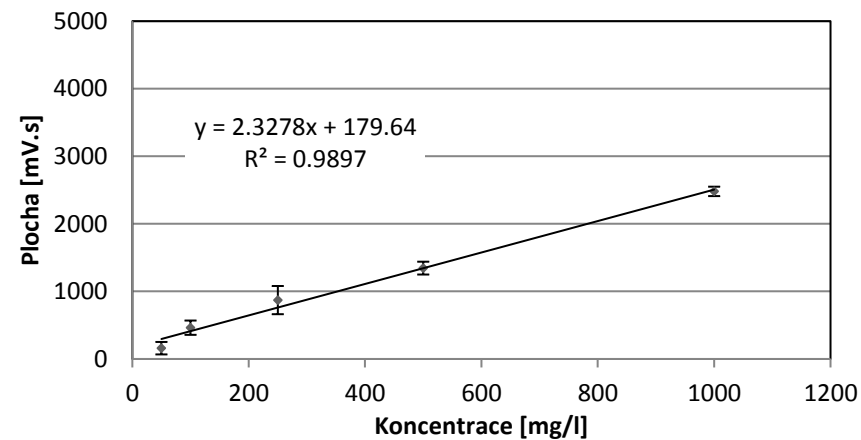
Obrázek 64: D(+)-PLA v MeOH



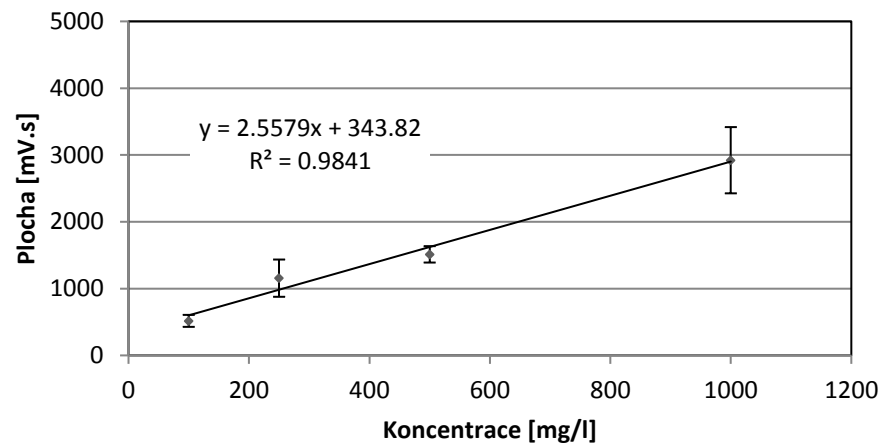
Obrázek 65: D(+)-PLA v MeOH po odečtu signálu blanku



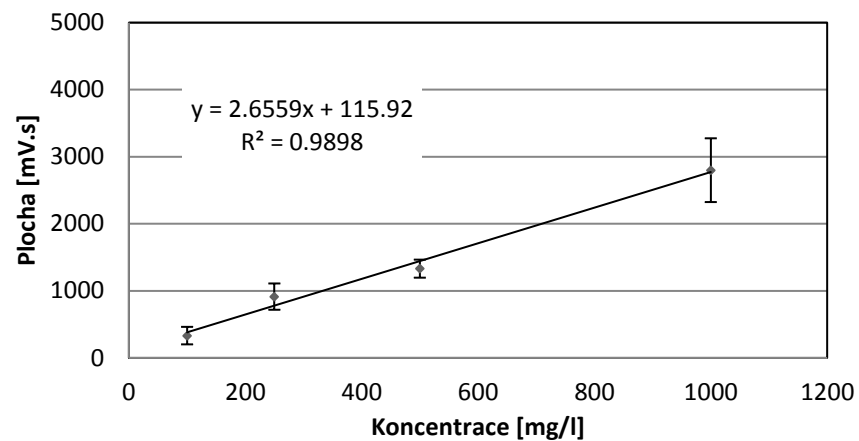
Obrázek 66: L(-)-PLA v MeOH



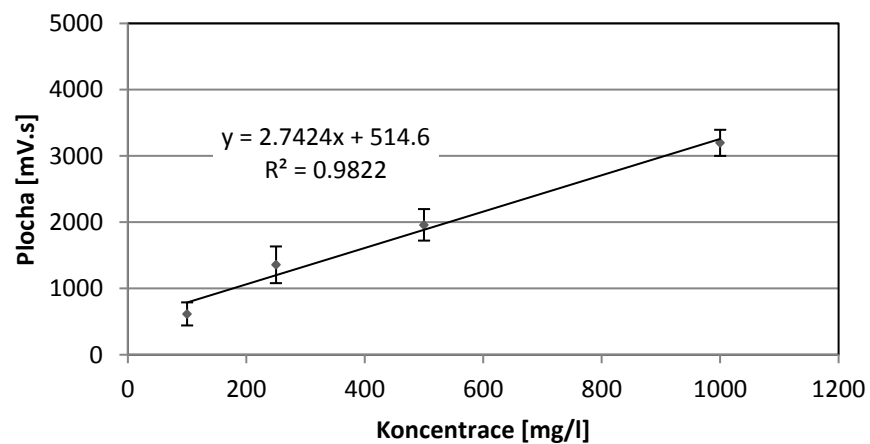
Obrázek 67: L(-)-PLA v MeOH po odečtu signálu blanku



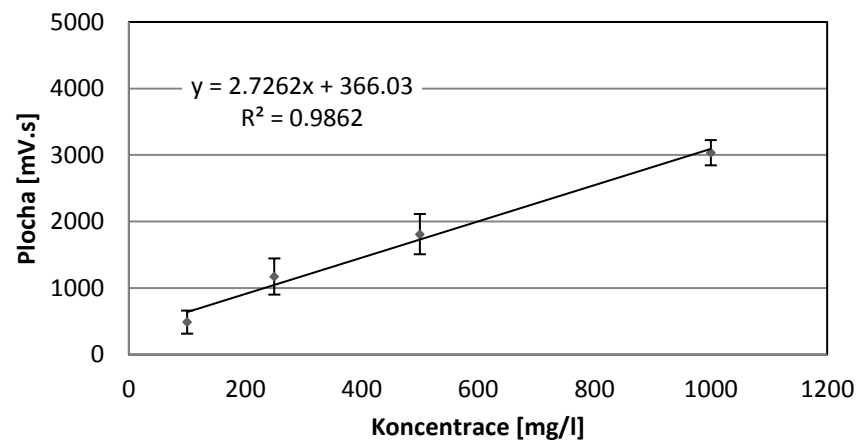
Obrázek 68: D(+)-PLA v n-PrOH



Obrázek 69: D(+)-PLA v n-PrOH po odečtu signálu blanku

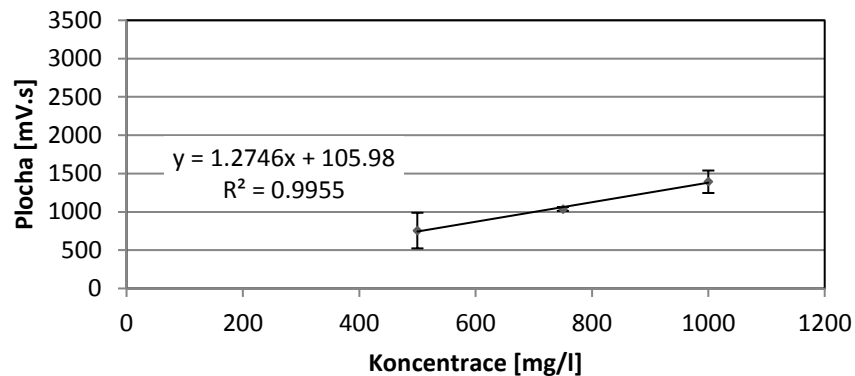


Obrázek 70: L(-)-PLA v n-PrOH

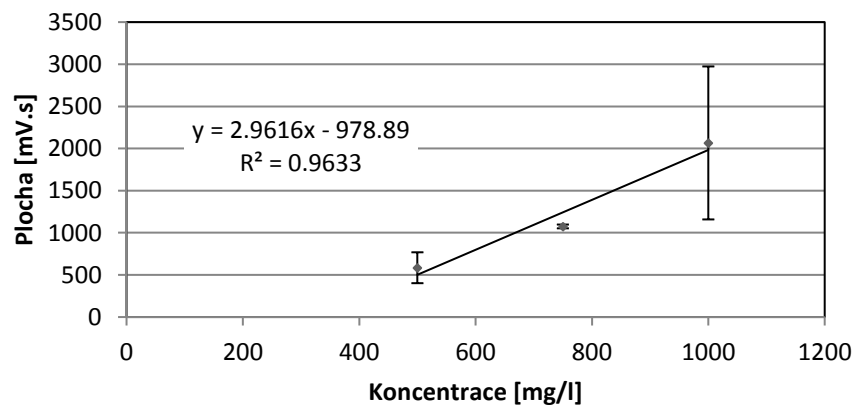


Obrázek 71: L(-)-PLA v n-PrOH po odečtu signálu blanku

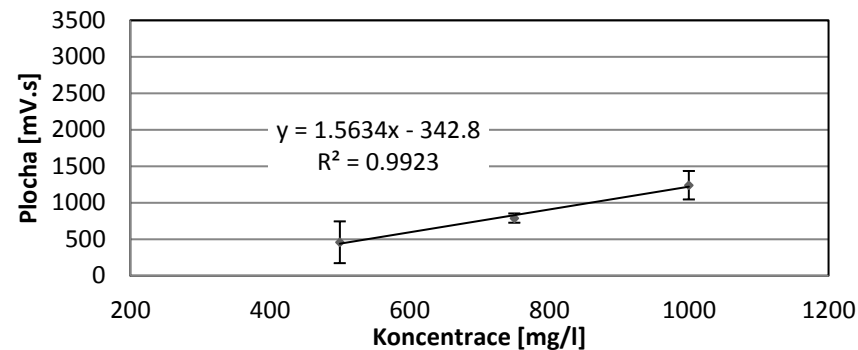
7.2. Závislost plochy signálu na koncentraci felodipinu



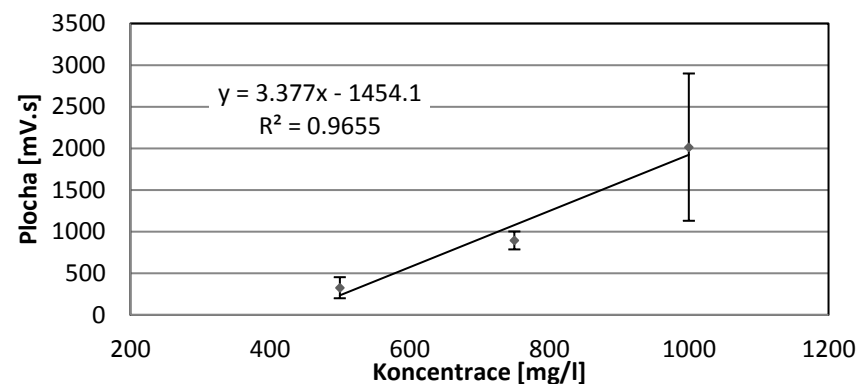
Obrázek 72: Závislost plochy na koncentraci S(-)-felodipinu v EtOH



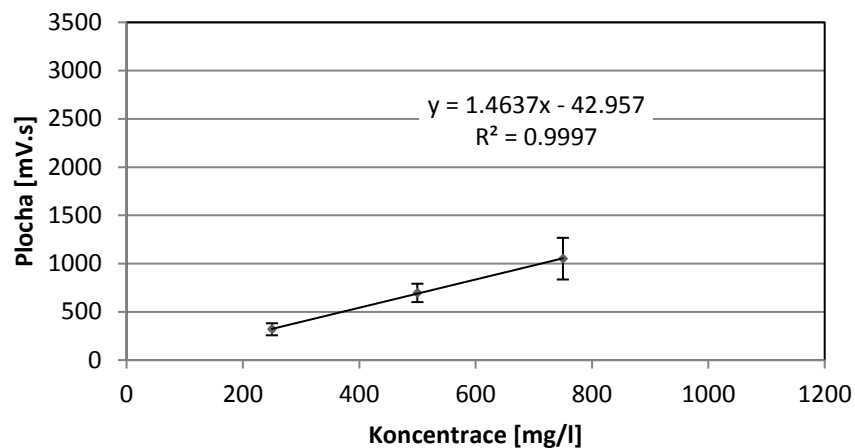
Obrázek 74: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v EtOH



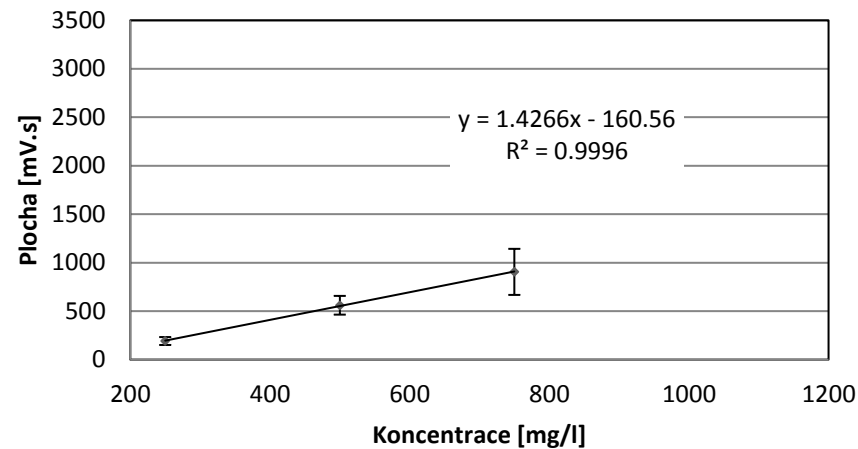
Obrázek 73: Závislost plochy na koncentraci S(-)-felodipinu v EtOH po odečtu signálu blanku



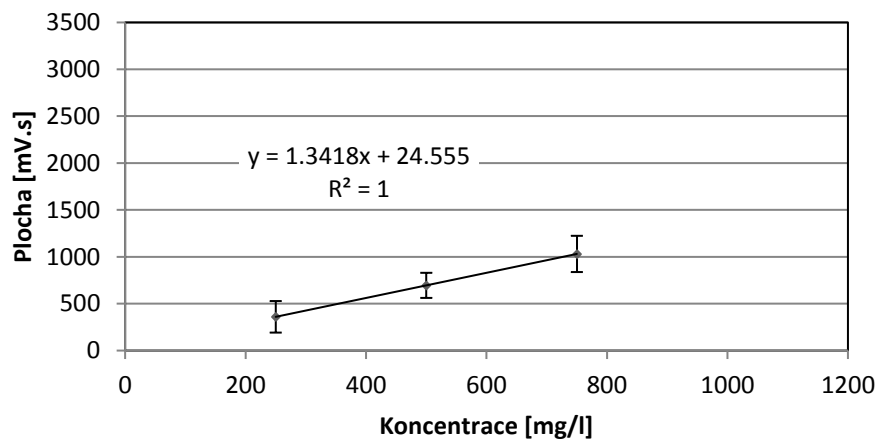
Obrázek 75: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v EtOH po odečtu signálu blanku



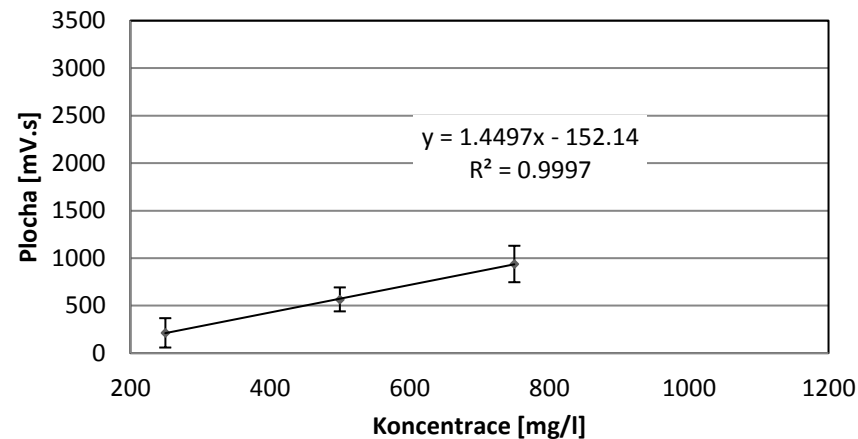
Obrázek 76: Závislost plochy na koncentraci S-(-)-felodipinu v EtOH:H₂O (11:9)



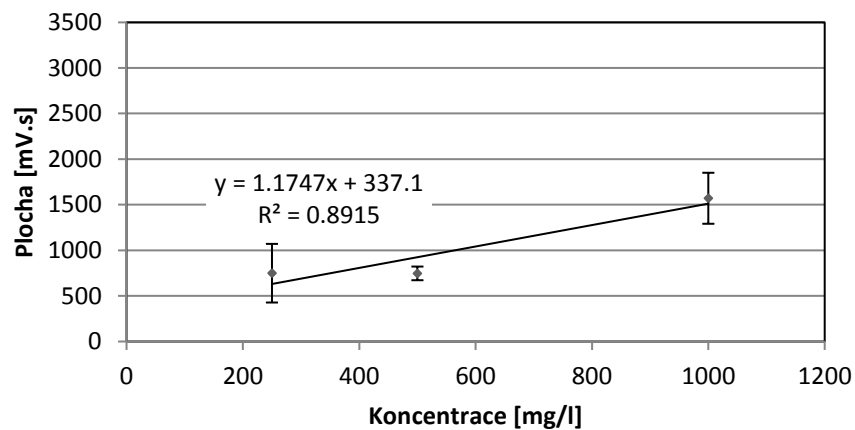
Obrázek 77: Závislost plochy na koncentraci S-(-)-felodipinu v EtOH:H₂O (11:9) po odečtu signálu blanku



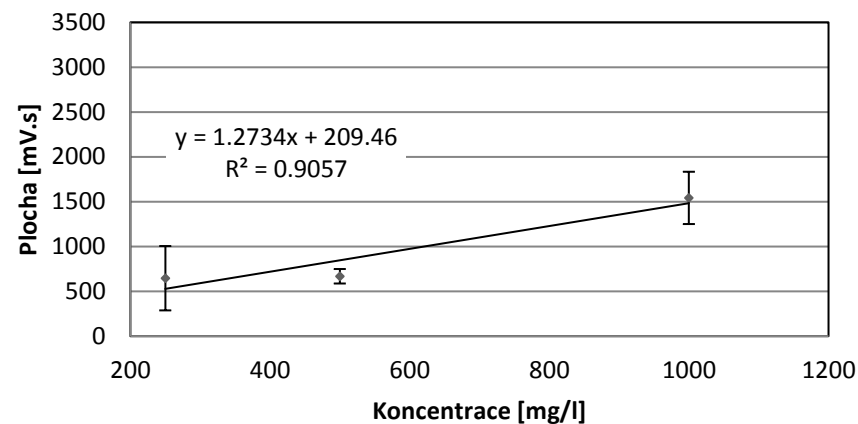
Obrázek 78: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v EtOH:H₂O (11:9)



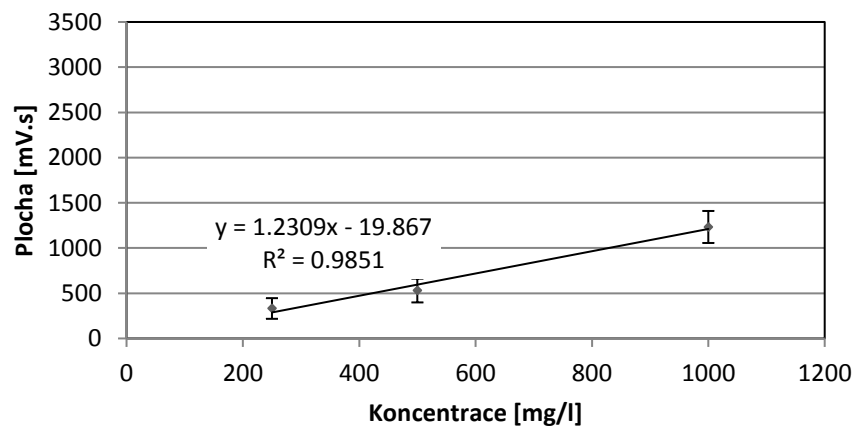
Obrázek 79: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v EtOH:H₂O (11:9) po odečtu signálu blanku



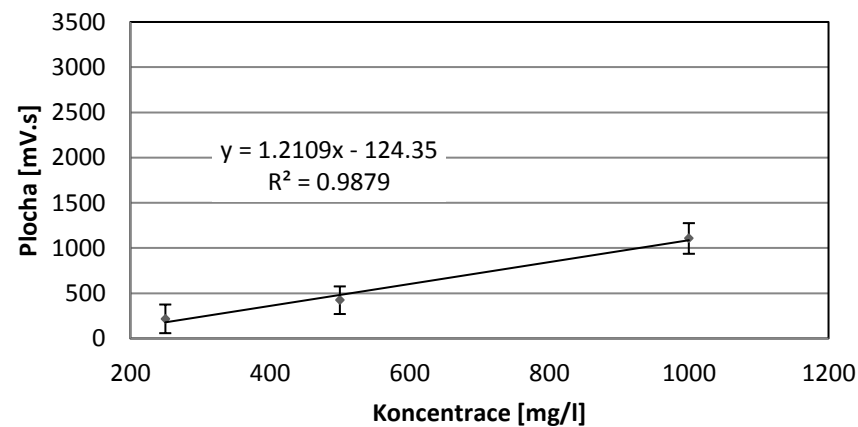
Obrázek 80: Závislost plochy na koncentraci S-(-)-felodipinu v i-PrOH



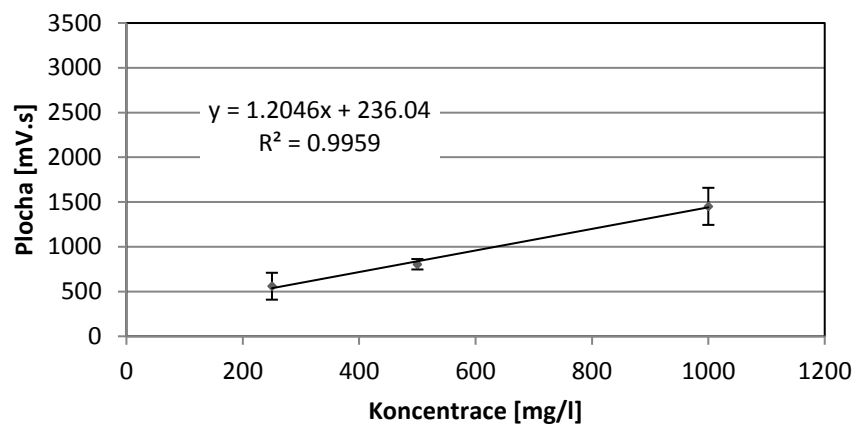
Obrázek 81: Závislost plochy na koncentraci S-(-)-felodipinu v i-PrOH po odečtu signálu blanku



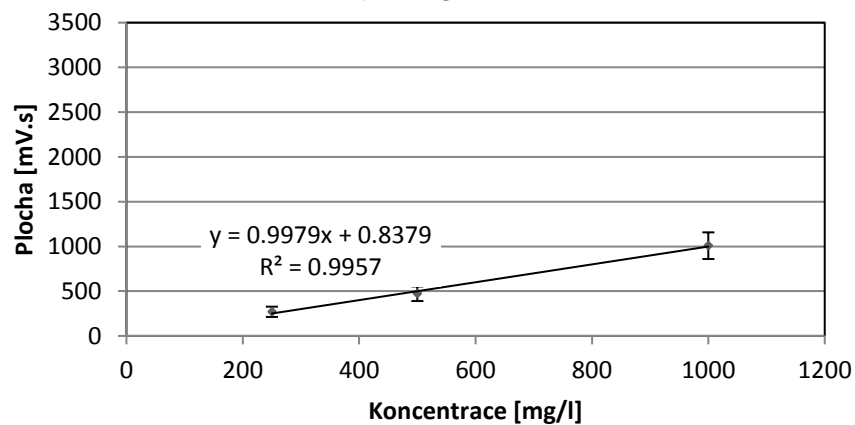
Obrázek 82: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v i-PrOH



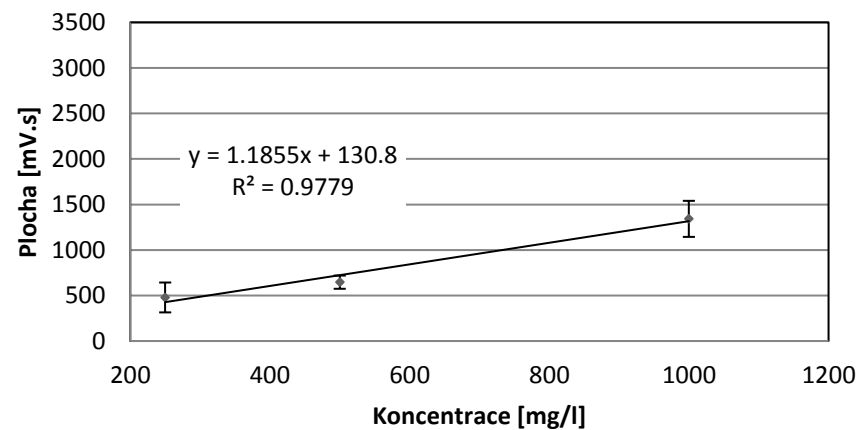
Obrázek 83: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v i-PrOH po odečtu signálu blanku



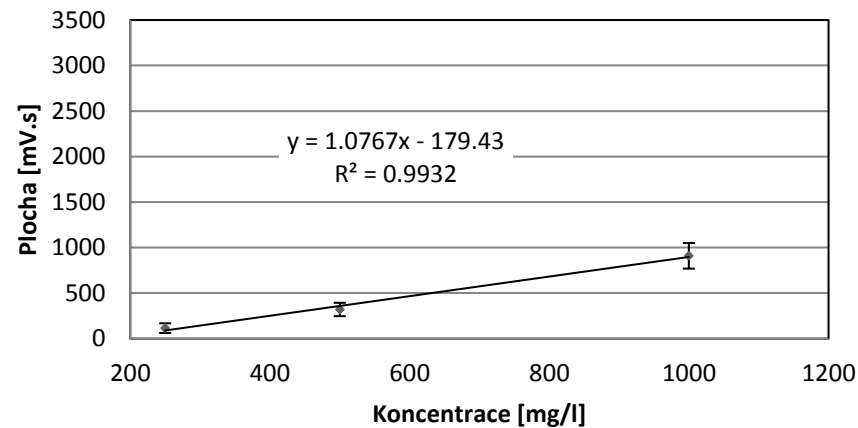
Obrázek 84: Závislost plochy na koncentraci S-(-)-felodipinu v n-PrOH



Obrázek 86: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v n-PrOH

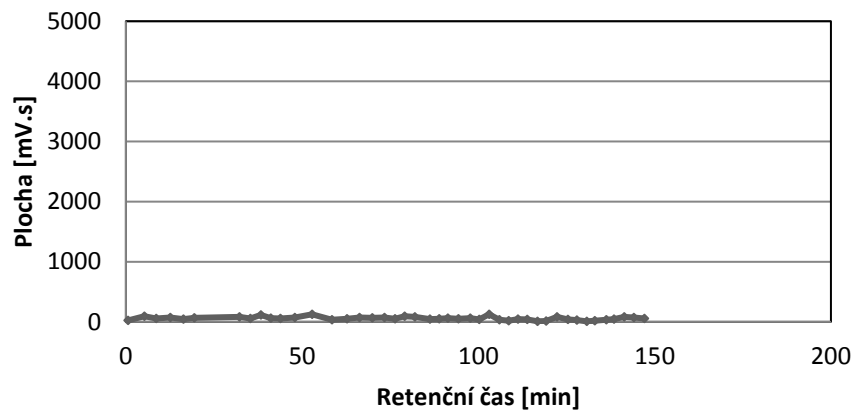


Obrázek 85: Závislost plochy na koncentraci S-(-)-felodipinu v n-PrOH po odečtu signálu blanku

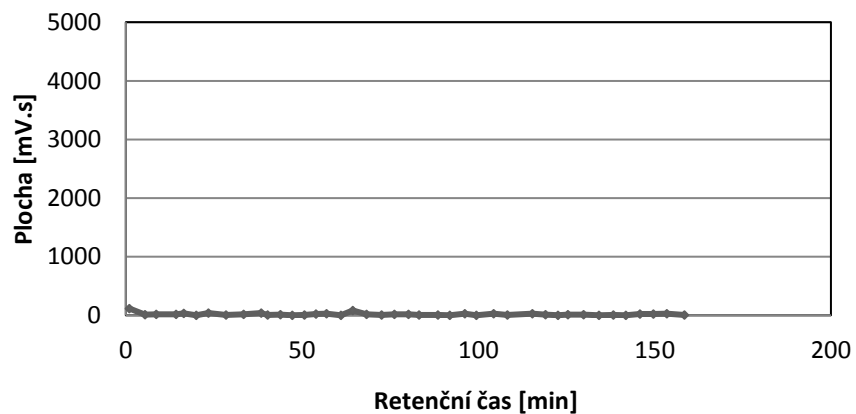


Obrázek 87: Závislost plochy na koncentraci R-(+)-felodipinu v n-PrOH po odečtu signálu blanku

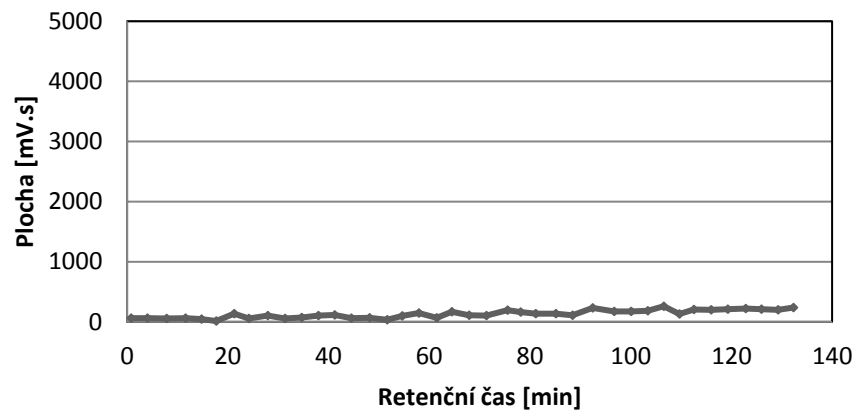
7.3. Kolísání blanku v čase u kyseliny fenylmléčné



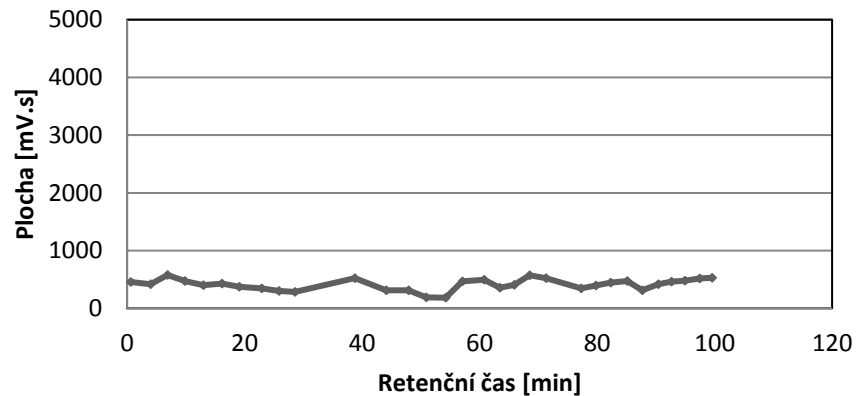
Obrázek 88: Kolísání blanku u kyseliny fenylmléčné v ACN



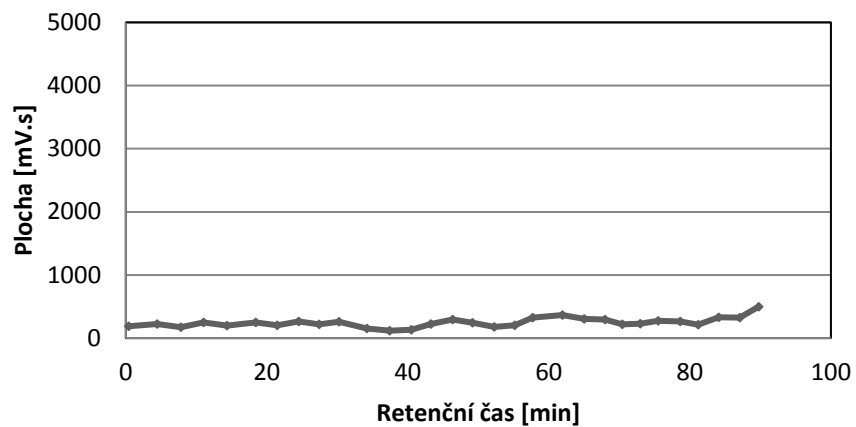
Obrázek 90: Kolísání blanku u kyseliny fenylmléčné v H₂O



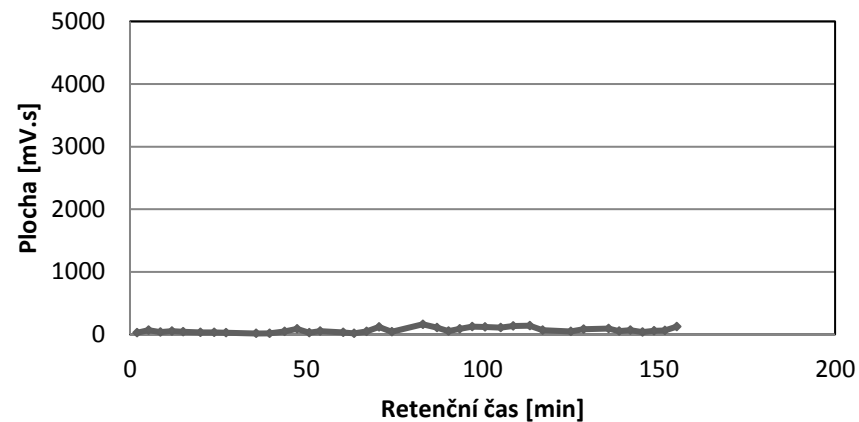
Obrázek 89: Kolísání blanku u kyseliny fenylmléčné v EtOH



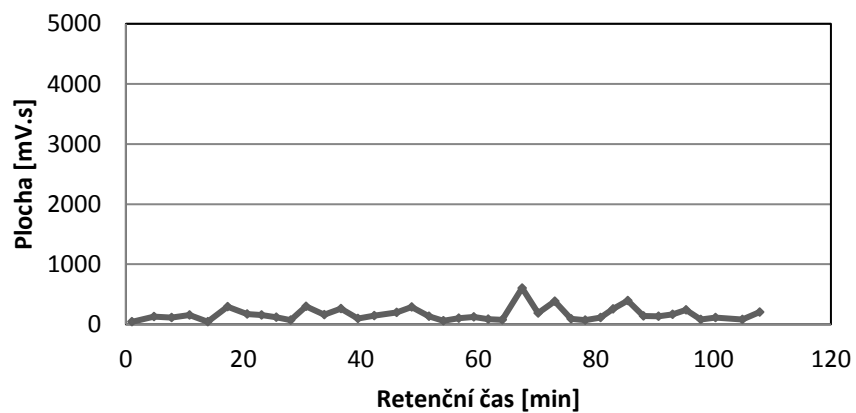
Obrázek 91: Kolísání blanku u kyseliny fenylmléčné v hexan:EtOH (19:1)



Obrázek 92: Kolísání blanku u kyseliny fenylmléčné v i-PrOH

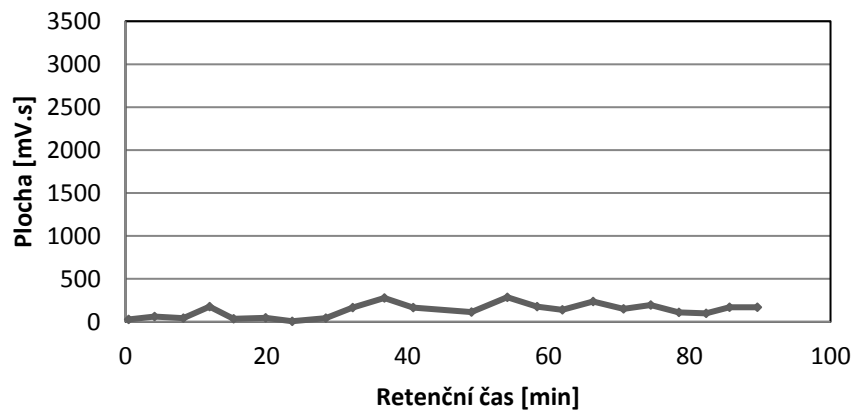


Obrázek 93: Kolísání blanku u kyseliny fenylmléčné v MeOH

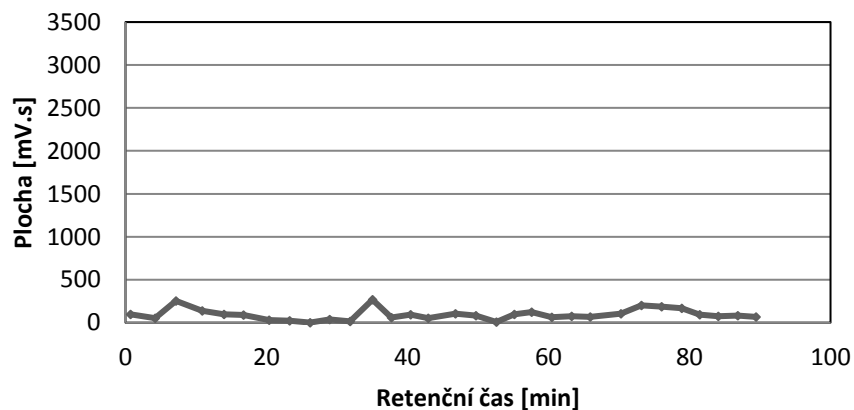


Obrázek 94: Kolísání blanku u kyseliny fenylmléčné v n-PrOH

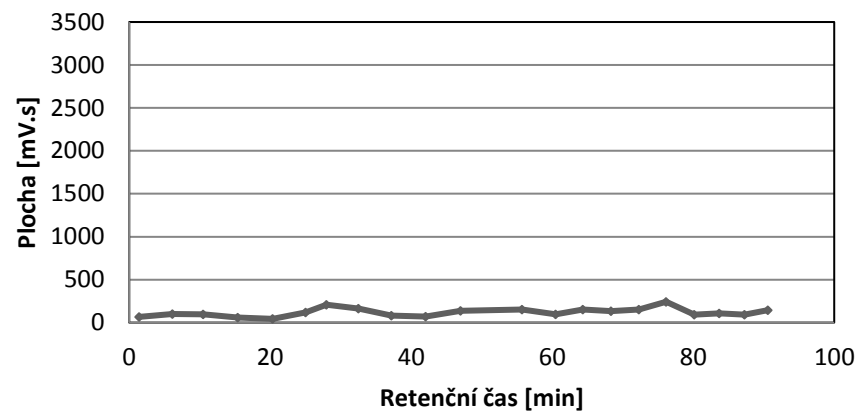
7.4. Kolísání blanku v čase u felodipinu



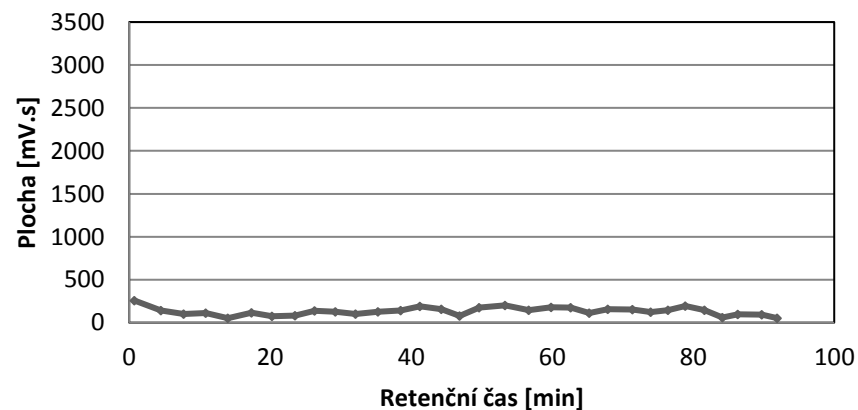
Obrázek 95: Kolísání blanku u felodipinu v EtOH



Obrázek 97: Kolísání blanku u felodipinu v i-PrOH



Obrázek 96: Kolísání blanku u felodipinu v EtOH:H₂O (11:9)



Obrázek 98: Kolísání blanku u felodipinu v n-PrOH

7.5. Konformery kyseliny fenylmléčné (Gibbsova energie a optická otáčivost)

Tabulka 10: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů R-(+)-fenylmléčné kyseliny v acetonitrilu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost		Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti (DZ)	Parciální otáčivost (DZ)
		DZ	TZ				
R-phelact-030	0	105,28	103,90	1	32,89%	34,6242	105,28
R-phelact-047	0,013306368	11,59	6,09	0,595766	19,59%	2,2709	70,30
R-phelact-008	0,020571808	90,26	90,79	0,4490186	14,77%	13,3289	74,68
R-phelact-003	0,035238745	173,19	174,31	0,2537124	8,34%	14,4510	85,56
R-phelact-042	0,044545039	305,97	293,43	0,1766171	5,81%	17,7724	101,29

Tabulka 11: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů S-(-)-fenylmléčné kyseliny v acetonitrilu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost		Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti (DZ)	Parciální otáčivost (DZ)
		DZ	TZ				
S-phelact-027	0	-105,05	-103,67	1	32,98%	-34,6421	-105,05
S-phelact-040	0,013197522	-11,60	-6,10	0,5982953	19,73%	-2,2887	-70,07
S-r008	0,020626231	-90,41	-90,93	0,4480685	14,78%	-13,3589	-74,52
S-phelact-003	0,035238745	-173,21	-174,33	0,2537124	8,37%	-14,4918	-85,41
S-phelact-097	0,044327348	-306,01	-293,46	0,1781199	5,87%	-17,9745	-101,26

Tabulka 12: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů R-(+)-fenylmléčné kyseliny v ethanolu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost		Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti (DZ)	Parciální otáčivost (DZ)
		DZ	TZ				
R-phelact-001	0	157,91	157,01	1	29,12%	45,9835	157,91
R-phelact-047	0,007755245	10,78	5,31	0,7394506	21,53%	2,3212	95,36
R-phelact-008	0,01551049	88,50	89,19	0,5467872	15,92%	14,0914	93,72
R-phelact-003	0,030721655	174,06	175,20	0,3024798	8,81%	15,3316	103,11
R-phelact-111	0,041198038	306,00	293,44	0,2011911	5,86%	17,9276	117,74

Tabulka 13: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů S-(-)-fenylmléčné kyseliny v ethanolu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost		Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti (DZ)	Parciální otáčivost (DZ)
		DZ	TZ				
S-phelact-001	0	-157,96	-157,06	1	28,37%	-44,8060	-157,96
S-phelact-040	0,007564765	-10,79	-5,32	0,7449531	21,13%	-2,2800	-95,13
S-phelact-008	0,01532001	-88,34	-89,04	0,5508561	15,63%	-13,8034	-93,50
S-phelact-003	0,030612809	-173,53	-174,67	0,303764	8,62%	-14,9520	-102,85
S-phelact-085	0,040925925	-305,58	-293,02	0,2033333	5,77%	-17,6247	-117,56

Tabulka 14: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů R-(+)-fenylmléčné kyseliny ve vodě

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost		Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti (DZ)	Parciální otáčivost (DZ)
		DZ	TZ				
R-phelact-030	0	122,23	120,92	1	59,72%	72,9936	122,23
R-s001	0,047266178	162,84	161,96	0,1588678	9,49%	15,4491	127,80
R-phelact-067	0,050966926	11,86	6,31	0,1375563	8,21%	0,9743	115,50
R-phelact-051	0,05752487	93,00	93,60	0,1065683	6,36%	5,9186	113,79
R-phelact-060	0,069960473	220,19	216,32	0,0656784	3,92%	8,6363	118,55

Tabulka 15: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů S-(-)-fenylmléčné kyseliny ve vodě

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost		Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti (DZ)	Parciální otáčivost (DZ)
		DZ	TZ				
S-r030	0	-122,53	-121,21	1	76,69%	-93,9665	-122,53
S-phelact-001	0,068110099	-162,64	-161,77	0,0705831	5,41%	-8,8036	-125,17
S-phelact-040	0,071293831	-11,89	-6,35	0,0623569	4,78%	-0,5686	-118,94
S-phelact-008	0,077824564	-93,65	-94,27	0,0483606	3,71%	-3,4732	-117,90
S-phelact-010	0,090069688	-220,31	-216,44	0,0300266	2,30%	-5,0731	-120,44

Tabulka 16: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů R-(+)-fenylmléčné kyseliny v hexanu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost		Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti (DZ)	Parciální otáčivost (DZ)
		DZ	TZ				
R-phelact-064	0	25,11	21,38	1	43,37%	10,8892	25,11
R-phelact-009	0,008952546	14,17	13,57	0,705782	30,61%	4,3370	20,58
R-phelact-018	0,045306958	-604,43	-597,47	0,1714564	7,44%	-44,9415	-36,50
R-phelact-030	0,049007706	151,32	152,43	0,1484561	6,44%	9,7419	-22,74
R-phelact-042	0,060436488	314,2	301,09	0,0951506	4,13%	12,9648	-7,62

Tabulka 17: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů S-(-)-fenylmléčné kyseliny v hexanu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost		Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti (DZ)	Parciální otáčivost (DZ)
		DZ	TZ				
S-phelact-054	0	-25,1	-21,37	1	43,39%	-10,8903	-25,10
S-phelact-009	0,008952546	-14,15	-13,55	0,705782	30,62%	-4,3331	-20,57
S-phelact-099	0,045198112	604,61	597,63	0,1721843	7,47%	45,1685	36,75
S-phelact-014	0,048980495	-151,69	-152,79	0,1486134	6,45%	-9,7810	22,93
S-phelact-020	0,060218797	-313,22	-300,13	0,0959602	4,16%	-13,0409	7,73

Tabulka 18: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů R-(+)-fenylmléčné kyseliny v methanolu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost		Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti (DZ)	Parciální otáčivost (DZ)
		DZ	TZ				
R-phelact-030	0	101,18	99,85	1	44,88%	45,4067	101,18
R-phelact-067	0,010666863	13,00	7,52	0,660226	29,63%	3,8518	66,11
R-phelact-008	0,018095572	87,53	88,28	0,4944489	22,19%	19,4224	71,03
R-phelact-066	0,032898566	170,88	171,99	0,2779067	12,47%	21,3116	82,44
R-phelact-111	0,042422551	307,74	295,20	0,1918272	8,61%	26,4923	98,90

Tabulka 19: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů S-(-)-fenylmléčné kyseliny v methanolu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost		Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti (DZ)	Parciální otáčivost (DZ)
		DZ	TZ				
S-phelact-027	0	-101,20	-99,88	1	31,25%	-31,6224	-101,20
S-phelact-082	0,010694075	-12,98	-7,50	0,6595271	20,61%	-2,6750	-66,14
S-phelact-008	0,018149994	-87,39	-87,89	0,4934027	15,42%	-13,4734	-71,01
S-phelact-003	0,032816932	-170,73	-171,84	0,2787911	8,71%	-14,8731	-82,44
S-phelact-085	0,042476974	-307,11	-294,58	0,1914213	5,98%	-18,3695	-98,84

7.6. Konformery R-felodipinu (Gibbsova energie a optická otáčivost)

Tabulka 20: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů R-(+)-felodipinu v acetonitrilu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost (DZ)	Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti	Parciální otáčivost
R-felo-0029	0	-197,65	1	39,13%	-77,3433	-197,65
R-felo-0007	0,015047896	-277,07	0,556721267	21,79%	-60,3605	-226,05
R-felo-0073	0,043266104	5373,09	0,185631303	7,26%	390,3023	370,48
R-felo-0006	0,045960031	-3553,47	0,167153087	6,54%	-232,4304	26,99
R-felo-0038	0,055048634	-8113,68	0,117350558	4,59%	-372,5880	-444,34

Tabulka 21: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů R-(+)-felodipinu v ethanolu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost (DZ)	Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti	Parciální otáčivost
R-felo-0029	0	-198,36	1	39,12%	-77,5955	-198,36
R-felo-0018	0,017796246	3770,70	0,500243051	19,57%	737,8798	1125,09
R-felo-0073	0,040490542	5453,43	0,206808282	8,09%	441,1845	1649,46
R-felo-0020	0,047783194	-7392,15	0,155702849	6,09%	-450,2461	893,70
R-felo-0038	0,056028244	-8191,89	0,112960425	4,42%	-361,9870	374,26

Tabulka 22: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů R-(+)-felodipinu ve vodě

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost (DZ)	Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti	Parciální otáčivost
R-felo-0029	0	-197,04	1	27,86%	-54,8972	-197,04
R-felo-0007	0,010857343	-277,17	0,655349317	18,26%	-50,6075	-228,76
R-felo-0051	0,039021128	4633,18	0,218980876	6,10%	282,6712	339,27
R-felo-0065	0,040626599	-6378,19	0,205716008	5,73%	-365,5625	-325,09
R-felo-0005	0,042504185	4035,02	0,191218678	5,33%	214,9672	41,99

Tabulka 23: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů R-(+)-felodipinu v hexanu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost (DZ)	Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti	Parciální otáčivost
R-felo-0066	0	-2945,91	1	24,55%	-723,0759	-2945,91
R-felo-0002	0,011211091	-3097,31	0,646387977	15,87%	-491,4082	-3005,35
R-felo-0005	0,017823458	1369,28	0,499713517	12,27%	167,9491	-1986,73
R-felo-0013	0,043946388	353,64	0,180780681	4,44%	15,6920	-1804,90
R-felo-0148	0,052055381	330,78	0,13185045	3,24%	10,7050	-1690,38

Tabulka 24: Energie, optické otáčivosti a pravděpodobnosti zastoupení prvních pěti z dosud nalezených nejstabilnějších konformerů R-(+)-felodipinu v methanolu

ID konformeru	Gibbs. energie (relativní) [eV]	Optická otáčivost (DZ)	Boltzmann	Pravděpodobnost	Příspěvek k celkové otáčivosti	Parciální otáčivost
R-felo-0029	0	-197,10	1	25,72%	-50,6994	-197,10
R-felo-0007	0,015728181	-276,45	0,542173913	13,95%	-38,5541	-225,00
R-felo-0065	0,043483795	-6310,93	0,184065108	4,73%	-298,8001	-873,93
R-felo-0051	0,044028023	4759,26	0,18020719	4,64%	220,6111	-341,45
R-felo-0123	0,044109657	963,73	0,179635518	4,62%	44,5311	-229,06

7.7. Seznam skriptů

- 1 - hcs-extract.php
- 2 - rename.php
- 3 - hlavicka-geom.php
- 4 - fronta.sh
- 5 - zmattransform.sh
- 6 - orez-radku.php
- 7 - energy-extraction.php
- 8 - ordered-zmat.php
- 9 - hlavicka-rot.php

Skripty jsou k dispozici na příloženém CD.